

# Rolle des Chemerin-Chemerinrezeptorsystems in Glukosehomöostase und Neoplasie

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

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



vorgelegt von

Sandy Hallmann

aus Dessau-Roßlau

2016

Diese Arbeit wurde angefertigt von Januar 2013 bis April 2016 unter der Leitung von Dr. Carsten Grötzinger in der Arbeitsgruppe "Tumortargeting" an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum in der Medizinischen Klinik m.S. Hepatologie, Gastroenterologie.

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

Disputation am 14.07.2016

## DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Carsten Grötzinger, der mit großem Engagement mein Projekt betreut hat und mir mit hilfreichen Anregungen sowie fachlicher Unterstützung stets zur Seite stand. Gleichzeitig gilt mein Dank Prof. Dr. Wiedenmann, an dessen Klinik die Arbeit durchgeführt wurde.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Rupert Mutzel der Freien Universität Berlin, für die Übernahme des Zweitgutachtens und der damit verbundenen Betreuung.

Vielen Dank auch an meine Kollegen Sarah Erdmann sowie Dr. Asja Wagener für die großartige Zusammenarbeit und Unterstützung im Rahmen des INNO-TRACE Projektes. Hierbei möchte ich mich im Besonderen bei Sarah Erdmann für die Durchführung der radioaktiven Arbeiten und bei Dr. Asja Wagener für die Hilfe bei den Tierexperimenten bedanken.

Ich danke Dr. Lars Niederstadt und Sarah Erdmann auch für die vielen Gespräche und die freundschaftliche Unterstützung in allen Lebenslagen.

Außerdem möchte ich mich bei den gesamten Mitarbeitern der Abteilung „Tumor Targeting“ Yvonne Giesecke, Samantha Exner sowie Dr. Jan Lennart Körner sehr herzlich bedanken, die durch ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag und regen Erfahrungsaustausch sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzlicher Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Dr. Dipl. Biol. Thore Dietrich vom Deutschen Herzzentrum Berlin für die Möglichkeit und Hilfe bei der Organentnahme vom Schwein.

Darüber hinaus gebührt besonderen Dank meiner Familie für den moralischen Rückhalt sowie meinem Lebenspartner Patrick Reinicke für seine unerlässliche Geduld, Liebe und Unterstützung.

Berlin, den 14.04.2016

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs).....	1
1.1.1. Struktur und Funktion von GPCRs.....	1
1.1.2. GPCR-vermittelte Signalwege .....	2
1.2. Chemerin und Chemerin-Rezeptoren .....	5
1.2.1. Chemokin-like Rezeptor 1 und dessen Ligand .....	5
1.2.2. Physiologische Funktionen von Chemerin & CMKLR1 .....	6
1.2.3. Die Chemerin-Rezeptoren CCRL2 und GPR1 .....	6
1.3. GPCRs als Tumortargets.....	7
1.3.1. GPCRs als Arzneimitteltargets.....	7
1.3.2. Xenograft-Modelle und Nah-Infrarotfluoreszenz Bildgebung .....	9
1.3.3. CMKLR1 als Tumortarget .....	11
1.3.4. Charakterisierung stabiler Chemerin-Varianten .....	12
1.4. Glukosehomöostase.....	14
1.4.1. Regulierung des Blutzuckerspiegels .....	14
1.4.2. Glukosehomöostase und deren klinische Relevanz bei Diabetes .....	16
1.4.3. Die Rolle von Glucagon bei Diabetes.....	17
1.4.4. Chemerin und dessen Wirkung auf den Glukosemetabolismus.....	18
<b>2. Ziel dieser Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>3. Material</b> .....	<b>22</b>
3.1. Geräte .....	22
3.2. Chemikalien .....	23
3.2.1. Medien für die Zellkultur.....	23
3.2.2. Puffer und Lösungen.....	24
3.2.3. Kits .....	26
3.2.4. Peptide .....	27
3.3. Enzyme.....	28
3.4. Antikörper.....	28
3.5. Tissue Array .....	30
3.6. Oligonukleotide .....	30
3.6.1. Primer und Sonden für die quantitative Real-Time PCR .....	30
3.6.2. Primer für die Amplifizierung von Plasmid-DNA.....	32

---

3.7. Plasmide.....	32
3.7.1. Kommerzielle Plasmide.....	32
3.7.2. Generierte Plasmide.....	33
3.8. Organismen .....	33
3.8.1. Schwein (sus scrofa) .....	33
3.8.2. Maus (mus musculus).....	34
3.8.3. Primäre Zellen .....	34
3.8.4. Eukaryotische Zelllinien.....	35
3.8.5. Prokaryontische Zelllinien .....	37
3.9. Software.....	37
<b>4. Methoden.....</b>	<b>38</b>
4.1. Zellkultur.....	38
4.1.1. Kultivierung von Zelllinien .....	38
4.1.2. Einfrieren und auftauen von Zelllinien.....	38
4.1.3. Kultivierung von humanen pankreatischen Inselzellen.....	39
4.1.4. stabile Transfektion .....	39
4.1.5. Isolation pankreatischer Inselzellen aus der Maus .....	39
4.1.6. Isolation pankreatischer Inselzellen aus dem Schwein.....	40
4.2. Zelluläre Assays.....	41
4.2.1. Ca <sup>2+</sup> -Mobilisierung .....	41
4.2.2. Internalisierungsassay (EGFP-Translokation) .....	42
4.2.3. Stimulationsassay mit pankreatischen Nagerzelllinien.....	42
4.2.4. Stimulationsassay mit humanen Inselzellen .....	43
4.2.5. Migrationsassay .....	43
4.2.6. Proliferationsassay.....	44
4.3. Radioaktive Bindungsstudien .....	44
4.3.1. Iodierung von Peptiden .....	44
4.3.2. Membranisolation aus Zellen .....	45
4.3.3. Radioaktiver Bindungsassay.....	45
4.4. Molekularbiologische Methoden .....	46
4.4.1. Polymerasekettenreaktion – PCR.....	46
4.4.2. Restriktion und Ligation von DNA .....	46
4.4.3. Elektrophoretische Trennung von DNA.....	46
4.4.4. Herstellung chemisch kompetenter Escherichia Coli.....	47
4.4.5. Transformation von Escherichia Coli mittels Hitzeschockmethode .....	47

4.4.6.	Präparation von Plasmid-DNA.....	47
4.4.7.	RNA-Isolation.....	48
4.4.8.	Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT).....	48
4.4.9.	Quantitative Real-Time PCR.....	48
4.4.10.	Sequenzierung nach Sanger.....	50
4.5.	Immunhistochemische Methoden.....	50
4.5.1.	Immunfluoreszenz an Zelllinien.....	50
4.5.2.	Immunfluoreszenz an Kryo-Gewebeschnitten.....	51
4.6.	Proteinbiochemische Methoden.....	52
4.6.1.	Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen.....	52
4.6.2.	Quantifizierung von Proteinen.....	52
4.6.3.	SDS-PAGE.....	52
4.6.4.	Coomassie-Färbung.....	53
4.6.5.	Western Blotting.....	53
4.6.6.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay - ELISA.....	54
4.7.	Tierexperimentelles Arbeiten.....	54
4.7.1.	Inokulation von Tumoren.....	54
4.7.2.	Kleintierbildgebung – Nah-Infrarotfluoreszenz (NIRF) Bildgebung.....	55
4.8.	Kurvenfitting für die Berechnung von IC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub> -Werten.....	56
4.9.	Statistik.....	56
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
5.1.	Das Chemerin-Chemerinrezeptorsystem in der Tumordiagnostik.....	57
5.1.1.	Expression des Chemerin-Chemerinrezeptorsystems in humanen Zelllinien..	57
5.1.2.	Expression von CMKLR1 im humanen Mammakarzinom.....	61
5.1.3.	Expressionsanalyse an DU4475/SW13-Xenografts.....	63
5.1.4.	Charakterisierung stabiler Chemerin-Varianten in vitro.....	66
5.1.5.	Charakterisierung der NIRF-Sonden in vitro.....	68
5.1.6.	Testung stabiler Chemerin-Sonden mittels NIRF-Bildgebung an DU4475/SW13-Xenograftmodellen in vivo.....	73
5.1.7.	Charakterisierung der scrambled NIRF-Sonden in vitro.....	77
5.1.8.	NIRF-Bildgebung an DU4475/SW13-Xenograftmodellen mit spezifischen Chemerin-Sonden im Vergleich zu scrambled Varianten.....	79
5.2.	CMKLR1 in der Glukosehomöostase.....	86
5.2.1.	Validierung von pankreatischen Nagerzellmodellen für die Insulin- und Glucagon-Sekretion.....	86

5.2.2. Einfluss des Chemerin-Chemerinrezeptorsystems auf die physiologische Funktion in pankreatischen Nagerzellmodellen .....	90
5.2.3. Einfluss des Chemerin-Chemerinrezeptorsystems auf die physiologische Funktion von primären pankreatischen Inselzellen .....	93
5.2.4. Charakterisierung der Expression von Chemerin-Rezeptoren in verschiedenen Spezies .....	96
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>100</b>
6.1. Chemerin-Rezeptoren in Tumoren .....	100
6.1.1. Der Chemerin-Rezeptor CMKLR1 als Tumortarget im Mammakarzinom .....	100
6.1.2. Expression von CMKLR1 in DU4475-Xenografts.....	102
6.1.3. Der Einsatz von stabilisierten Chemerin-9-Analoga für die zielgerichtete Tumordiagnostik .....	103
6.1.4. Die spezifischen stabilisierten Chemerin-Sonden ermöglichen eine in vivo-Bildgebung an CMKLR1-positiven Tumoren.....	105
6.1.5. Ausblick: Einsatz der Chemerin-Sonden für die klinische Anwendung.....	108
6.2. Die Rolle der Chemerin-Rezeptoren in der Glukosehomöostase .....	111
6.2.1. Physiologische Funktion pankreatischer Nagerzellmodelle.....	111
6.2.2. Expression und Funktion von Chemerin-Rezeptoren in pankreatischen Nagerzelllinien .....	112
6.2.3. Expression und Funktion von Chemerin-Rezeptoren in primären humanen pankreatischen Inseln .....	113
6.2.4. Expression von Chemerin und Chemerin-Rezeptoren in Geweben.....	115
<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>118</b>
7.1. Summary.....	119
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XXV</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>XXVIII</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>XXIX</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>XXX</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>XLIII</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEPTOREN (GPCRS)

### 1.1.1. STRUKTUR UND FUNKTION VON GPCRS

Die Weiterleitung von äußeren Reizen in das Zellinnere erfolgt mittels Rezeptoren, welche sich in der Zellmembran befinden. Durch diese Ligand/Rezeptor-Interaktion werden sogenannte sekundäre Botenstoffe aktiviert, die wiederum weitere Signalkaskaden auslösen (Signaltransduktion) oder inhibieren und so zu einer spezifischen Zellantwort führen können [1]–[3]. Die Zellantwort kann sowohl aus einer Veränderung des inneren Milieus der Zelle als auch aus einer veränderten Transkription verschiedener Gene bestehen.

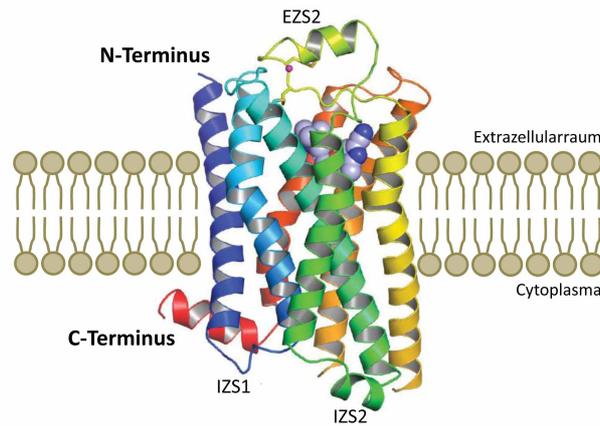
G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen mit ca. 900 bekannten GPCR-codierenden Genen die größte Familie der Zelloberflächen-Rezeptoren im humanen Genom dar [4], [5].

Aufgrund ihrer Diversität zählen GPCRs zu den Hauptregulatoren der interzellulären Kommunikation und spielen in fast jeder physiologischen Zellantwort eine Rolle. Sie vermitteln die Antworten auf eine Vielzahl von extrazellulären, strukturell sehr vielfältigen Signalmolekülen, wie zum Beispiel Hormonen, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter oder Licht. Die chemische Natur derer Liganden umfasst ebenfalls ein breites Spektrum, dazu gehören unter anderem Proteine, Peptide, Aminosäurederivate, Zucker, anorganische Ionen, Nukleoside und Nukleotide sowie Fettsäuren [6]–[8].

Nahezu jede physiologische Funktion im Organismus (kardiovaskulär, respiratorisch, muskulär, endokrin) wird durch die Aktivität verschiedener GPCRs beeinflusst [9]–[12].

Trotz der verschiedenartigen physiologischen Funktionen besitzen alle GPCRs gemeinsame strukturelle Merkmale, aufgrund derer sie der Superfamilie der Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren zugeordnet werden [1], [2], [13]–[15]. Sieben alpha-helikale Transmembrandomänen verbinden über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen den extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus) und den intrazellulären Carboxyterminus (C-Terminus) (Abb. 1). Wenige Rezeptoren bilden eine Ausnahme dieser Regel. So ist zum Beispiel bei den Adiponectinrezeptoren AdipoR1/AdipoR2 der N-Terminus intrazellulär und der C-Terminus extrazellulär lokalisiert [16], [17].

Die Einteilung der GPCRs erfolgt in sechs Unterfamilien. Die Klasse mit dem höchsten Vorkommen im Menschen (ca. 76 %) stellt die Klasse A, die *rhodopsin-like family*, dar [19], [20]. Bakteri-*rhodopsin* war der erste Rezeptor, dessen Proteinsequenz und Struktur durch Kristallstrukturanalyse bestimmt werden konnte [21]–[23].



**Abb. 1: Struktur eines GPCRs.** Darstellung des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors mit gebundenem Cyanopindolol (N-Terminus: blau; C-Terminus: rot).  $\text{Na}^+$ -Ionen sind pink und Disulfidbrücken gelb aufgezeigt. EZS: Extrazelluläre Schleife, IZS: Intrazelluläre Schleife. Modifiziert nach [18].

Zur Klasse B zählen Calcitonin/Glucagonrezeptor-ähnliche Rezeptoren, wie zum Beispiel die Sekretinrezeptor-Familie und Adhäsionsrezeptoren. Der Unterfamilie C gehören unter anderem die metabotropen Glutamatrezeptoren sowie die GABA-Rezeptoren und der Klasse F die *Frizzled*-Rezeptoren sowie die *Taste2*-Rezeptoren an [5], [24]. Die Pheromonrezeptoren der Klasse D und die cAMP-Rezeptoren der Klasse E konnten in Säugetieren bisher nicht nachgewiesen werden [5], [25]–[27].

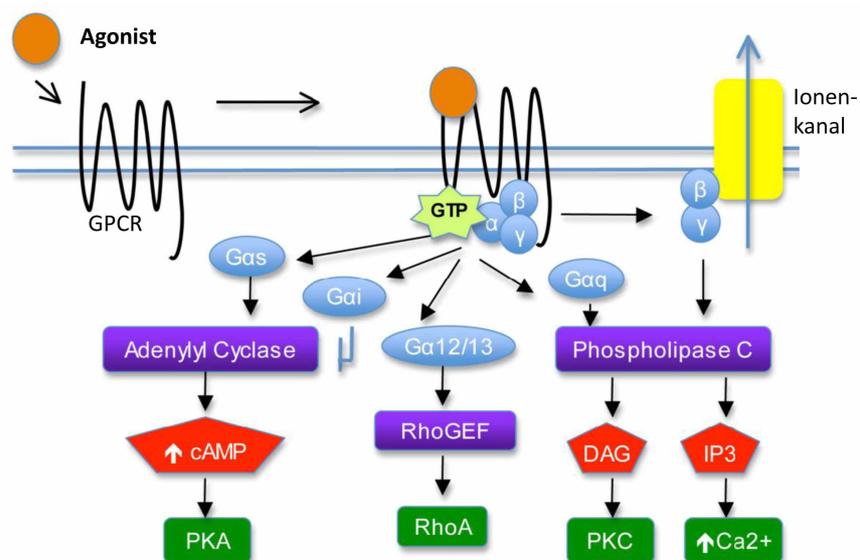
Es wurden etwa 140 Rezeptorgene identifiziert, denen bis heute noch kein Ligand zugeordnet werden konnte [28]. Da 40 % aller pharmakologischen Wirkstoffe über GPCRs agieren, ist die Aufklärung der Funktion dieser sogenannten „orphan“-Rezeptoren als potentielle neue *Targets* für die pharmazeutische Industrie besonders interessant [2], [28]–[31].

### 1.1.2. GPCR-VERMITTELTE SIGNALWEGE

Binden extrazelluläre Signalmoleküle (Liganden) an einen GPCR, so erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung aufgrund derer er in der Lage ist, mit heterotrimeren GTP-Bindungsproteinen (G-Proteine) zu interagieren. Hierbei stellen bei den meisten GPCRs die zweite und dritte intrazelluläre Schleife und die proximale Region des C-Terminus die wichtigsten Strukturen für die Aktivierung der G-Proteine dar [32], [33]. G-Proteine sind an der Cytosolseite der Plasmamembran lokalisiert und dienen als Überträgermoleküle (*Second Messenger*). Je nach Rezeptor oder Zielprotein existieren verschiedene spezifische G-Proteine, wobei die prinzipielle Grundstruktur nahezu identisch ist. G-Proteine bestehen aus drei Proteinuntereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Die  $\text{G}\alpha$ -Untereinheit bildet die Hauptschnittstelle zwischen G-Protein und Rezeptor.

Im nicht angeregten, inaktiven Zustand hält die  $G\alpha$ -Untereinheit GDP gebunden. Wird der Rezeptor durch einen spezifischen Liganden aktiviert, ändert sich dessen Konformation an der dritten intrazellulären Schleife, wodurch an der  $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins GDP freigesetzt und an dessen Stelle GTP gebunden wird. Dies führt zu einer Abspaltung der  $G\alpha$ -Untereinheit vom  $\beta\gamma$ -Komplex und somit zu einer Dissoziation des heterotrimären G-Proteins [1].

In Säugetieren sind 21  $G\alpha$ -, 6  $G\beta$ - und 12  $G\gamma$ -Untereinheiten bekannt [1], [34]. Die  $G\alpha$ -Untereinheit wird wiederum je nach Subtyp ( $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{12/13}$ ,  $G\alpha_q$ ) von unterschiedlichen Effektoren aktiviert. Abb. 2 zeigt die schematische Darstellung der unterschiedlichen G-Protein-vermittelten Signalweiterleitungswege nach GPCR-Aktivierung durch einen Signaltransduktions-Aktivator (Agonist). Bestimmte Agonisten können hierbei spezifische Konformationsänderungen und Signalkaskaden auslösen. Der Signalweg der Proteinkinase A (PKA) wird über die Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration durch die Untereinheiten  $G\alpha_s$  und  $G\alpha_i$  beeinflusst.  $G\alpha_s$  führt zu einer Aktivierung der Adenylylzyklen, was zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus führt. Im Gegensatz hierzu inhibiert  $G\alpha_i$  die Adenylylzyklase, wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration sinkt [35]. Der Ras-Signalweg hingegen wird über  $G\alpha_{12/13}$  und Rho-GEF aktiviert [36].



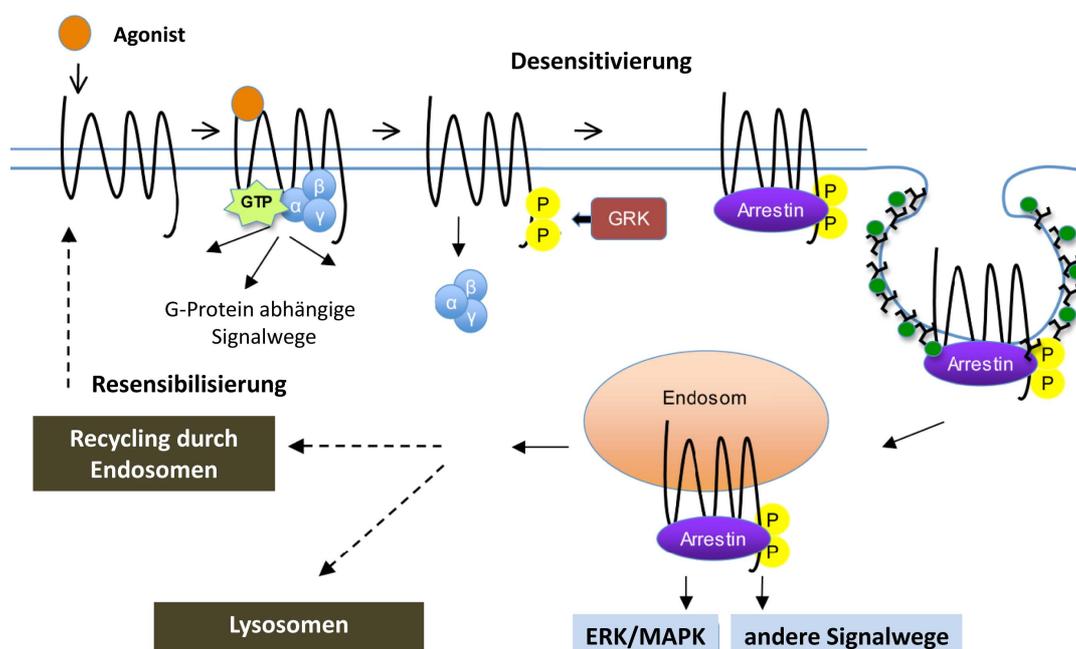
**Abb. 2: Schematische Darstellung der G-Protein-vermittelten Signalübertragung nach GPCR-Aktivierung durch einen Agonisten.** DAG: 1,2-Diacylglycerin; IP3: Inositol-1,4,5-Triphosphat; RhoA: *Ras homolog family member A*; PKA: Proteinkinase A; PKC: Proteinkinase C;  $G\alpha$ :  $G\alpha$ -Untereinheiten. Modifiziert nach [37].

$G\alpha_q$ -gekoppelte GPCRs üben ihre Wirkung über verschiedene plasmagebundene Phospholipasen C (PLC) aus. Das so mobilisierte Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) diffundiert durch das Cytosol, bindet an Ionenkanäle am endoplasmatischen Retikulum und bewirkt damit die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium [35]. Zusätzlich aktiviert  $G\alpha_q$  die Synthese von Diacylglycerin. Diacylglycerin und freies Kalzium aktivieren die Proteinkinase C, welche wiederum weitere Zielproteine phosphoryliert.

Der G $\beta\gamma$ -Komplex steuert G-Protein-gekoppelte Ionenkanäle. Weiterhin ist er befähigt, Phospholipasen der Klasse C zu aktivieren [38].

Die Kombinationsmöglichkeit der G $\alpha$ , G $\beta$  und G $\gamma$ -Untereinheiten ermöglicht eine große Vielfalt an zellulären Funktionen [1], [34]. Es ist bekannt, dass ein GPCR aufgrund der Diversität der G-Proteine in unterschiedlichen Geweben zu verschiedenen Effekten führen kann [39], [40].

Neben der Signalweiterleitung über G-Proteine, können GPCRs nach Aktivierung auch G-Protein-unabhängig internalisiert werden (Abb. 3). Durch regulatorische GPCR-Kinasen wird der aktivierte Rezeptor phosphoryliert und die Anbindung des zytosolischen Adaptermoleküls Arrestin begünstigt. Über Clathrin und den Clathrin-Adaptoren AP2 kommt es zur Internalisierung und somit zur Wanderung des Rezeptors von der Zelloberfläche ins Zellinnere in Form von Endosomen (*clathrin-coated pits*). Da der Rezeptor nun nicht mehr in der Zellmembran lokalisiert ist, kommt es zu einer Unterbrechung (Desensibilisierung) des G-Protein-abhängigen Signalweges [1], [41]–[43]. Nach der Translokation kann der GPCR intrazellulär in Lysosomen abgebaut oder über Endosomen als funktionale Rezeptoren zurück an die Zelloberfläche transportiert werden (*Recycling* beziehungsweise Resensibilisierung). Des Weiteren können intrazellulär unterschiedliche Signalkaskaden über das am Rezeptor gebundene Arrestin reguliert werden, zum Beispiel die Mitogen aktivierenden Protein-Kinasen (MAPK) oder Tyrosinkinasen der Src-Familie und kleine G-Proteine [2], [44]–[46].



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Arrestin-vermittelten GPCR-Internalisierung (G-Protein-unabhängige Signaltransduktion) nach GPCR-Aktivierung durch Agonisten.** GRK: GPCR Kinase; ERK: extrazellulär regulierte Kinase; AP2: Clathrin-Adapterprotein-2; MAPK: Mitogen aktivierende Protein-Kinase. Modifiziert nach [37].

Nach einer Arrestin-Rekrutierung ist der G-Protein-abhängige Signalweg blockiert. Agonisten, die nur einen der beiden Signalwege aktivieren, entweder über G-Proteine oder Arrestin, werden als „*biased*“ Agonisten bezeichnet [47].

## 1.2. CHEMERIN UND CHEMERIN-REZEPTOREN

### 1.2.1. CHEMOKIN-LIKE REZEPTOR 1 UND DESSEN LIGAND

Im Jahr 1996 wurde das humane Gen des *Chemokine-like receptor 1* (CMKLR1, früher auch als ChemR23 bezeichnet) zum ersten Mal kloniert [48], [49]. CMKLR1 wird der Klasse A der GPCRs zugeordnet. CMKLR1-mRNA konnte zunächst in Thymus, Milz, Knochenmark, fetaler Leber und Lymphdrüsen nachgewiesen werden [48]. Spätere Untersuchungen zeigten eine Expression in weiteren hematopoetisch und Immunsystem-assoziierten Geweben, wie zum Beispiel Makrophagen, unreifen dendritischen Zellen, plasmazytoiden dendritischen Zellen, Leukozyten, Adipozyten, Endothelzellen sowie in natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die den Oberflächenmarker CD56 tragen [50]–[55].

Im Jahr 2003 wurde CMKLR1 durch Wittamer et al. nach der Isolation von Chemerin aus humaner Aszitesflüssigkeit und dessen Identifikation als natürlichen Liganden von CMKLR1 deorphanisiert [56].

Chemerin, auch bekannt als *retinoic acid receptor responder protein 2* (RARRES2) oder *tazarotene-induced gene 2 protein* (TIG2), wird als 163 Aminosäuren umfassendes Vorläuferprotein (Pre-pro-Chemerin) gebildet und nach der N-terminalen Trunkierung von 20 Aminosäuren als Pro-Chemerin sekretiert [55]–[57]. Aktiviert wird Pro-Chemerin durch Abspaltung der sechs C-terminalen Aminosäuren, welche über Serinproteasen der Gerinnungs- und Entzündungskaskade sowie der Fibrinolyse vermittelt wird [55]. Die Signaltransduktion nach Aktivierung des CMKLR1 durch Chemerin erfolgt über  $G\alpha_i$ , woraus eine Verringerung der intrazellulären cAMP-Konzentration und eine Phosphorylierung der p42-p44 MAP-Kinasen resultiert [56].

2004 gelang die Identifikation von Chemerin-9 (Chem-9), einem Nonapeptid ( $^{149}\text{YFPGQFAFS}^{157}$ ) aus dem aktiven Chemerin [58]. Chem-9 ist in der Lage, CMKLR1 im nanomolaren Bereich zu aktivieren und ist somit mit der Affinität des nativen Chemerin vergleichbar. Der metabolische Abbau von Chem-9 durch Proteasen limitiert dessen Verwendung in pharmakologischen Studien. Shimamura et al. gelang 2009 die Entwicklung eines stabileren murinen Chem-9-Analogons durch Modifizierung der relevanten Proteaseschnittstellen und der Verwendung nicht-natürlicher Aminosäuren [59].

### 1.2.2. *PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON CHEMERIN & CMKLR1*

CMKLR1 zeigt strukturelle Ähnlichkeit mit Rezeptoren für chemische Lockstoffe [49] und wird in Zellen des Immunsystems exprimiert. Entsprechend regt Chemerin CMKLR1-positive plasmazytoide dendritische Zellen und Makrophagen zur Zellmigration an und dirigiert diese sowohl zu verletzen als auch entzündeten Geweben. Damit agiert Chemerin als proinflammatorisches Chemoattractant in der angeborenen und erlernten Immunantwort [52], [55], [60]. Kontroverse Ergebnisse zeigen eine entzündungshemmende Wirkung von Chemerin durch Reduktion der Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Monozyten in Mäusen und damit eine verminderte Immunreaktion [61].

### 1.2.3. *DIE CHEMERIN-REZEPTOREN CCRL2 UND GPR1*

CMKLR1 ist nicht der einzige Rezeptor, der eine hohe Affinität zu Chemerin aufweist (Abb. 4). GPR1 (*G protein-coupled receptor 1*) und CCRL2 (*C-C chemokine receptor-like 2*) binden ebenfalls spezifisch Chemerin.

Im Jahr 2008 wurde GPR1 als Chemerin-Rezeptor identifiziert. Chemerin bindet und aktiviert GPR1 mit einer ähnlichen Affinität wie CMKLR1 [62], wobei bis heute Chemerin den einzig bekannten Ligand für GPR1 darstellt [63]. Exprimiert wird GPR1 in Fett- und Muskelgewebe, sowie in Leber, Niere, Darm und Geweben des zentralen Nervensystems [64], [65]. Die biologische Funktion des GPR1 ist nur geringfügig bekannt [66]. Rourke et al. zeigten 2014 einen Einfluss von GPR1 auf den Glukosemetabolismus, wobei Mäuse bei dem *knock-out* von GPR1 unter Hochfettdiät (HFD) eine deutlich verschlechterte Glukosetoleranz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen entwickelten [63].

CCRL2 stellt den dritten bekannten Rezeptor für Chemerin dar [68] und bindet Chemerin mit ähnlicher Affinität wie CMKLR1 oder GPR1 [67]. CCRL2 wurde im Gewebe der Milz, des Herzens, in Endothelzellen der Lunge sowie in Leukozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Mastzellen und dendritischen Zellen gefunden [67]–[69]. Die Bindung von Chemerin an CCRL2 führt zu keiner bisher bekannten Signalwegs-Aktivierung. Es wird vermutet, dass Chemerin an CCRL2-positive Zellen bindet, um das gebundene Chemerin benachbarten CMKLR1-exprimierenden Zellen zu präsentieren und so die Bioverfügbarkeit für andere Chemerin-Rezeptoren zu erhöhen [65]. CCRL2-*knock-out*-Mäuse zeigten eine normale Rekrutierung von zirkulierenden dendritischen Zellen zur Lunge, jedoch eine fehlerhafte Migration von Antigen-beladenen dendritischen Zellen der Lunge zu Lymphknoten des Mittelfells [70]. Weitere Liganden für CCRL2 sind die Chemokine CCL2, CCL5, CCL7, CCL8 sowie CCL19 [67].

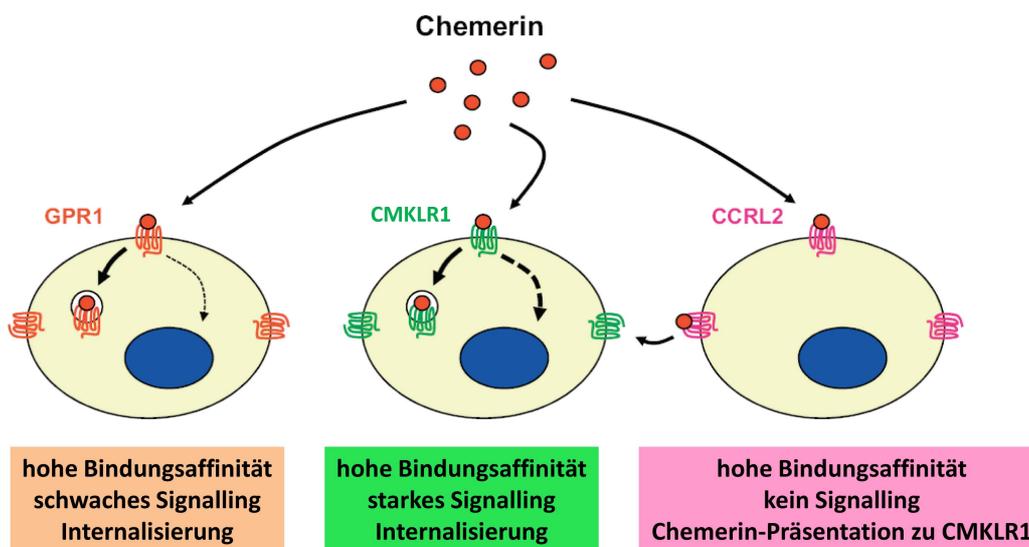


Abb. 4: Überblick über das *Signalling* der Chemerinrezeptoren GPR1, CMKLR1 und CCRL2. Modifiziert nach [67].

## 1.3. GPCRS ALS TUMORTARGETS

### 1.3.1. GPCRS ALS ARZNEIMITTELTARGETS

GPCRs stellen eine Gruppe der wichtigsten Arzneimitteltargets dar [71]. Viele Liganden aktivieren nach deren Bindung an den Rezeptor bevorzugt einen von mehreren möglichen Signalkaskaden. Aufgrund dieser funktionalen Selektivität besteht die Möglichkeit, Signalwegs-spezifische Therapeutika zu generieren. Ca. 90 % der pharmakologischen Wirkstoffe beeinflussen die Signalweiterleitung von GPCRs, wobei inzwischen mehr als 40 % der verschriebenen Arzneimittel gegen GPCRs gerichtet sind und einen Umsatz von mindestens 50 Milliarden \$ weltweit verzeichnen [72]–[74].

Seit der Entdeckung des Onkogens *mas* sind GPCRs auch als potentielle Tumortargets interessant [75]. Sowohl in Geweben als auch in Zellkulturen von Primärtumoren und Metastasen unterschiedlicher Entitäten wurde die Überexpression verschiedener GPCRs nachgewiesen. Hierzu zählen unter anderem das Plattenepithelkarzinom, das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, das Melanom, das Kolonkarzinom, Tumore der Brust, der Prostata und des Magens [76], [77].

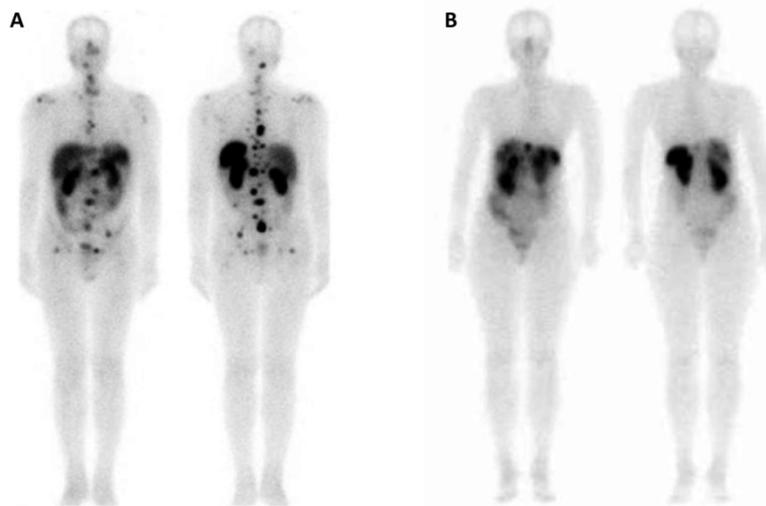
Bei der Behandlung von Tumoren kommt heute die operative Entfernung, Radiotherapie und die Chemotherapie zum Einsatz. Hierbei wird die Chemotherapie oft zusätzlich nach dem operativen Eingriff, zum Beispiel zur Behandlung von Metastasen, angewendet. Diese Therapieform ist nicht tumorzellspezifisch. Zytotoxika greifen, neben Zellen des Verdauungstraktes und der Haar-

follikel, verschiedene schnell wachsende Zellen im Organismus an. Die optimale Krebstherapie ist eine spezifisch gerichtete Behandlung, bei der das zytotoxische Therapeutikum ausschließlich an Tumorzellen bindet. Aus diesem Grund ist die Identifikation von hoch exprimierten Zielstrukturen und deren spezifischen Liganden von zentraler Bedeutung [78].

Ein weiterer Vorteil von GPCRs als Arzneimitteltargets besteht in der guten Ligandenzugänglichkeit aufgrund ihrer Lokalisation in der Zellmembran. Mit dem breiten Ligandenspektrum besteht ein großer Spielraum für die Leitstruktur-Entwicklung. Am interessantesten hierfür sind kleine Moleküle (*small molecules*) und Peptide. Sie können als Forschungsmaterial für vorklinische Studien dienen, als biopharmazeutische Produkte eingesetzt und im *High Throughput Screening* großer Substanzbibliotheken identifiziert werden [72], [79]. Hierfür stehen, aufgrund ihrer regulatorischen Funktion in unterschiedlichen Signaltransduktionswegen, verschiedene *Screeningassays* zu Verfügung (zum Beispiel Kalzium-*Imaging*, cAMP,  $\beta$ -Arrestin-Translokation).

Die Vorteile von Peptiden bestehen in der hohen Selektivität, der geringen Immunogenität, der geringen Toxizität, der sehr guten Gewebegängigkeit, ohne dabei die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, und den geringen Synthesekosten im Vergleich zu größeren Proteinen oder Antikörpern. Somit ist eine ausreichende Verteilung im Körper und ein guter Zugang zum Zielorgan gewährleistet. Eine Anreicherung im Gehirn und die damit verbundenen Nebenwirkungen können dabei für die meisten Peptide ausgeschlossen werden. Mehr als 100 Peptid-basierte Arzneimittel sind bisher kommerziell verfügbar [80]. Ein Nachteil bei der therapeutischen und diagnostischen Anwendung von Peptiden besteht jedoch in der geringen Stabilität, begründet durch den Abbau durch endogene Peptidasen. Die Veränderung der Aminosäuresequenz kann Peptide sowohl in ihrer Stabilität als auch in ihrer Affinität optimieren [81].

Das bekannteste Beispiel für Peptid-basierte Arzneimittel gegen GPCRs in der Tumorthherapie sind Somatostatinanaloga. So wird in mehr als 80 % von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (GEP-NET) der Somatostatinrezeptor (SSTR) überexprimiert [82]. Der Somatostatinrezeptor-2 ist von den fünf Isoformen (SSTR1-SSTR5) der am häufigsten exprimierte [83], [84]. Deren Ligand, Somatostatin, wurde bereits 1973 identifiziert und kommt in zwei Isoformen (SS-14; SS-28) vor [85]. Beide Peptide agieren natürlicherweise als Neurotransmitter, als Regulatoren der zellulären Sekretion, des Zellwachstums sowie der Neuromodulation und haben Einfluss auf die Nährstoffaufnahme [86]. Nach Applikation von Somatostatin wurde bei SSTR-positiven Tumoren ein antiproliferativer Effekt gezeigt [87]. Octreotid, das erste kommerziell verfügbare Somatostatinanalogon (Sandostatin®), besitzt eine zyklische 8-Aminosäurenstruktur, ist stabiler gegenüber Proteasen im Vergleich zu Somatostatin und bindet mit hoher Affinität an SSTR2 und SSTR5 [88]–[90]. In der Klinik findet es Anwendung in der Therapie von neuroendokrinen Tumoren (NET) und gastroenteropankreatischen (GEP) Tumoren [88], [91].



**Abb. 5: Optische Bildgebung mittels Octreoscan® zur Detektion von Tumoren und Metastasen.** Szintigraphie mit  $^{111}\text{In}$ -DPTA-[D-Phe<sup>1</sup>]-Octreotid. **A:** 49-jähriger Patient, 12 Monate nach Entfernung eines GEP-NET, wobei die Metastasen im Knochen deutlich sichtbar sind. **B:** 54-jährige Frau mit einem pankreatischen NET und Lebermetastasen [90].

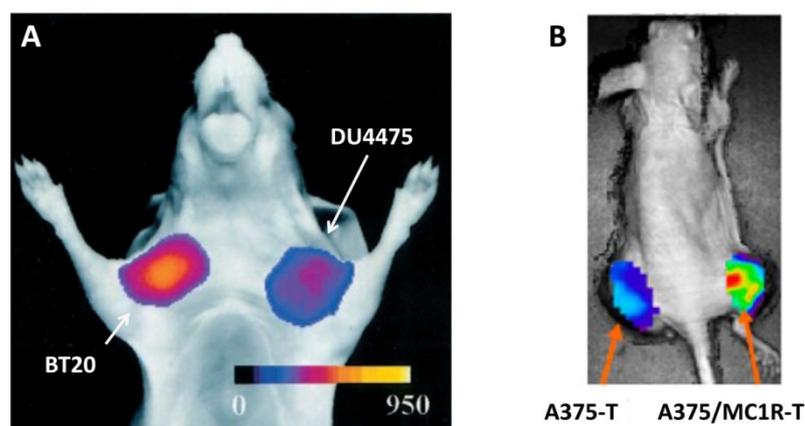
Neben der zielgerichteten Tumorthherapie ist die Diagnostik ein weiteres Einsatzgebiet für Octreotid (Abb. 5). Für diese Anwendung wurde Octreotid durch ein Radioisotop markiert (Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie oder Octreoscan®). Hierfür wird der Komplexbildner Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) an Octreotid gekoppelt und mit  $^{111}\text{Indium}$  beladen ( $^{111}\text{In}$ -DPTA-[D-Phe<sup>1</sup>]-Octreotid) [92], [93]. Die Bindung des radiomarkierten Peptids an den Rezeptor ermöglicht eine Detektion des Tumors und die Lokalisation von Metastasen durch Positron-Emissions-Tomografie (PET). Hierbei ist die hohe Affinität des Liganden zum Rezeptor und dessen Bindung und Anreicherung im Tumor (durch zum Beispiel Internalisierung) von größerer Wichtigkeit als die physiologische Aktivierung des Rezeptors durch den Liganden. Als weitere Anwendung für das Octreoscan® ist neben der Diagnostik die Strahlentherapie zu nennen. Dabei können Tumorzellen durch die Kopplung von Octreotid an die DNA-Doppelstrangbruch-induzierenden  $\beta$ -Emitter  $^{90}\text{Yttrium}$  oder  $^{177}\text{Lutetium}$  direkt abgetötet werden [94], [95].

### 1.3.2. XENOGRAFT-MODELLE UND NAH-INFRAROTFLUORESCENZ BILDGEBUNG

Bei der operativen Entfernung von malignem Tumorgewebe ist die Unterscheidung zwischen gesundem und tumorösem Gewebe essentiell. Tumore der Brust sind häufig nicht tastbar und das Randgewebe des Biopsiematerials besteht zu 5 bis 49 Prozent aus Tumorzellen [96], [97]. Die Nah-Infrarotfluoreszenz (NIRF)-Bildgebung repräsentiert eine innovative optisch basierte Technologie zur Kontrastierung von Tumorgewebe. Sie gewann in den letzten Jahren sowohl als prä- als auch als intra-operative *Imaging*methode an Bedeutung [98], [99]. Hierfür werden NIRF-Farbstoffe beziehungsweise Kontrastmittel an einen Liganden gekoppelt, der spezifisch an einen

Rezeptor im Tumor bindet. Durch die Anreicherung dieses Konjugats im Tumor kann dieser gegen umgebenes Gewebe abgegrenzt werden. Nach Anregung emittiert das Kontrastmittel Photonen höherer Wellenlänge, welche mit einer Kamera aufgefangen und zu einem Bild verarbeitet werden können [100], [101]. Wellenlängen im Nahinfrarotbereich (650 - 900 nm) weisen eine geringe Absorption durch Hämoglobin und Wasser auf und können so mehrere Millimeter in das Gewebe eindringen [102]. Dieses Licht ist für das menschliche Auge nicht wahrnehmbar und beeinträchtigt damit nicht das Sichtfeld während eines operativen Eingriffs. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass keine Radioaktivität benötigt wird. Es wurden bereits NIRF-Kontrastgeber für Krebszellen, Wächterlymphknoten, neurologische Krankheiten und kardiovaskuläre Erkrankungen entwickelt [97], [102]–[105].

Eine etablierte Methode zur Erforschung von Tumoren *in vivo* stellt das Xenograft-Modell der Maus dar. Hierbei werden humane Tumorzellen in immunsupprimierte Mäuse injiziert, beziehungsweise transplantiert, wobei zwischen dem orthotopen und dem subkutanen Tumormodell unterschieden wird [106]. Bei einem orthotopen Xenograft-Modell werden die Tumorzellen direkt in das, dem Ursprungsgewebe anatomisch entsprechende, Gewebe der Maus implantiert. Bei subkutanen Tumormodellen werden die Zellen unter die Haut der Maus injiziert. Je nach Fragestellung stehen verschiedene immunsupprimierte Mausstämme zur Verfügung. Die am häufigsten verwendeten Mausmodelle sind die athymische T-Zell-defiziente RjOrl:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup> Nacktmaus [107] und die B- und T-Zell-defiziente NOD.CB17-Prkdc<sup>scid</sup>/NcrCrI -Maus [108]. Biopsie- beziehungsweise Resektionsmaterial von humanen Tumoren kann ebenfalls erfolgreich in diese Mausmodelle transplantiert werden [109]. Mit Hilfe von Xenograft-Modellen können Substanzen, gekoppelt an ein Kontrastmittel, für die Diagnostik oder klinisch aktive Substanzen zur Behandlung von Krebserkrankungen *in vivo* getestet werden [110].



**Abb. 6: NIRF-Bildgebung an Xenograft-Mausmodellen.** **A:** Orthotopes Xenograft-Modell an der Brustkrebszelllinie DU4475 (rechts) sowie der Adenokarzinomzelllinie BT20 (links) [100]. **B:** MC1R-Xenograft-Modell subkutaner Tumore. Links ist ein Tumor mit einer niedrigen MC1R-Expression und rechts mit einer MC1R-Überexpression gezeigt [111].

Die NIRF-Bildgebung an Xenograft-Mausmodellen findet in der Detektion von invasiven Tumoren [100] sowie in der *in vivo*-Verifizierung von Tumortargets Anwendung [112]. Beispielsweise konnte ein spezifischer Peptidligand für den GPCR Melanocortinrezeptor-1 (MC1R), welcher in Melanomen überexprimiert wird, identifiziert und in Xenograft-Tumoren von MC1R-positiven Zelllinien *in vivo* angereichert werden [111] (Abb. 6).

### 1.3.3. CMKLR1 ALS TUMORTARGET

Verschiedene Studien identifizierten CMKLR1 als potentiell Tumorziel. Die Gruppe von Pachynski verzeichnete 2012 eine Tumorsuppression bei einer Chemerin-überexprimierenden Melanomzelllinie im Vergleich zur identischen Wildtyp-Zelllinie [113]. Für diesen Effekt war das Vorhandensein von CMKLR1 und NK-Zellen essentiell. Im Gegensatz hierzu zeigten Wang et al. (2014) eine Migrationssteigerung und erhöhte Expression von pro-invasiven Genen (IL-6; VEGF) durch Chemerin bei Magenkrebszelllinien [114].

Chemerin wird auf mRNA- beziehungsweise Proteinebene in einigen Tumorgeweben (Plattenepithelkarzinom, Melanom sowie in Tumoren der Brust, Prostata, Lunge und des Dickdarms) im Vergleich zum Normalgewebe geringer exprimiert [113], [115], [116].

Bei Melanomen korreliert eine erhöhte endogene Expression von Chemerin mit einem deutlich verbesserten Therapieerfolg *in vivo* [113]. Dagegen geht die Überexpression von Chemerin in Plattenepithelkarzinomen der Zunge mit Angiogenese und einer schlechteren Prognose für Tumorkranke einher [117]. Weitere tumorwachstumssteigernde Effekte von Chemerin wurden bei Untersuchungen an Glioblastomen und Lungenkarzinomen gefunden [118], [119]. Diese kontroversen Ergebnisse lassen vermuten, dass der Einfluss von Chemerin abhängig vom Tumortyp und weiteren individuellen Einflussfaktoren ist.

Quirino Schefer konnte im Verlauf seiner Doktorarbeit 2012 in unserer Arbeitsgruppe eine Überexpression von CMKLR1 in 50 % der getesteten ösophagealen Plattenepithelkarzinome (8/16) sowie in 50 % der pankreatischen Adenokarzinome (5/10) im Vergleich zum Normalgewebe zeigen (Abb. 7) [120].

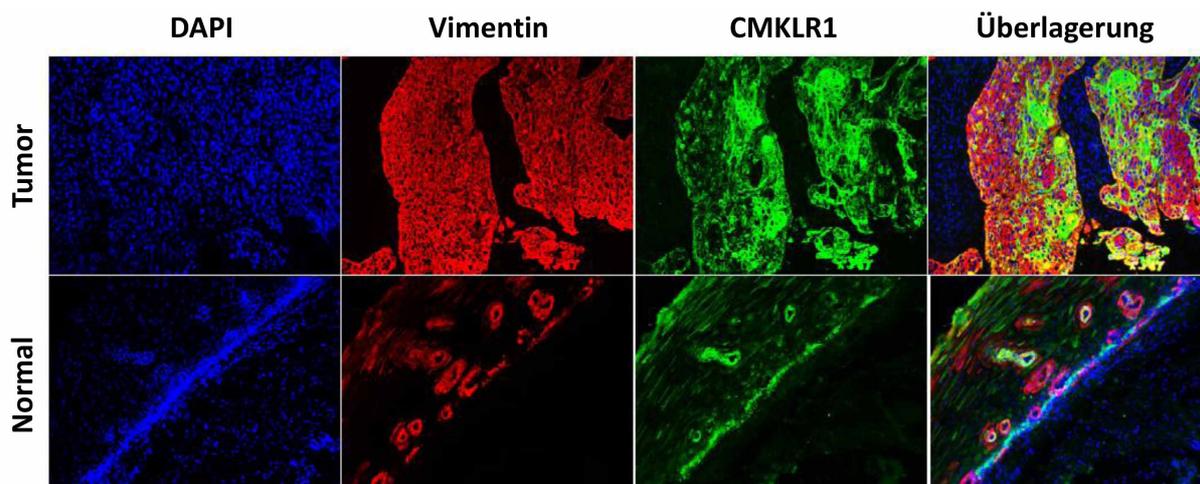


Abb. 7: Expression von CMKLR1 im humanem ösophagialen Plattenzellkarzinom. Vergleich der Expression von CMKLR1 zum Normalgewebe. grün: CMKLR1; rot: Vimentin (anti-Zytokreatin zur Zytoplasmafärbung); blau: Zellkerne (DAPI) [120].

### 1.3.4. CHARAKTERISIERUNG STABILER CHEMERIN-VARIANTEN

Der Rezeptor CMKLR1 ist mit verschiedenen pathophysiologischen Zuständen assoziiert und stellt außerdem ein potentiellles Tumortarget dar. Als Ausgangspunkt für die Entwicklung Peptid-basierter Arzneimittel werden in den meisten Fällen natürliche Liganden der GPCRs verwendet. Die pharmazeutische Anwendung von Chem-9, zum Beispiel in der peptidbasierten Tumordiagnostik durch bildgebende Verfahren, ist aufgrund dessen geringer Serumstabilität schwierig.

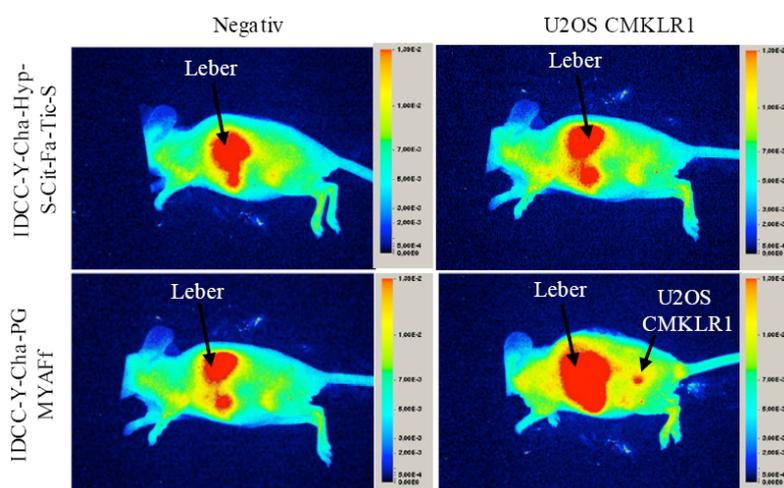
Tab. 1: Stabilisierung von humanem Chem-9 durch den Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren und D-Aminosäuren. Die funktionelle Analyse der Peptide erfolgte durch  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung in HEK 293A-Zellen, stabil transfiziert mit CMKLR1 und  $G\alpha_{16}$ . Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von Duplikatmessungen aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten. Die Ermittlung der Halbwertszeit in 25 % humanem Serum erfolgt über eine lineare Regression der Signalfächen in Abhängigkeit von der Zeit. D-Aminosäuren sind in kleinen Buchstaben dargestellt. Ac: N-terminale Acetylierung. Nicht-natürliche Aminosäuren: Cit: L-Citrullin; Cha: L-Zyklohexylalanin; Hyp: L-Hydroxyprolin; Tic: L-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-3-carboxylsäure. [121]

Peptid	Aminosäuresequenz	EC <sub>50</sub> [nM]	Halbwertszeit [min]
Chemerin-9	Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser	1,21 $\pm$ 0,4	24 $\pm$ 6
CG34 (stabiles Chem-9)	Ac Tyr <b>Cha</b> <b>Hyp</b> Gly <b>Cit</b> Phe <b>ala</b> <b>Tic</b> Ser	0,29 $\pm$ 0,16	14994 $\pm$ 3670
CG36 (stabiles Chem-9)	Ac Tyr <b>Cha</b> Pro Gly Met Tyr Ala Phe phe	0,3 $\pm$ 0,17	17427 $\pm$ 4389

Eine etablierte Methode zur Erhöhung der Stabilität und Halbwertszeit im Serum ist die systematische Substitution oder Deletion einzelner Aminosäuren in einem Peptid. Dies wird durch die

gezielte Entfernung von Protease-Erkennungssequenzen sowie durch den Einsatz nicht-natürlicher Aminosäuren und D-Aminosäuren erreicht [122]–[124].

Diese Strategie verfolgte auch Sebastian Bandholtz in seiner Dissertation [121]. Als Resultat konnte Sebastian Bandholtz zwei Chemerin-Analoga (CG34 und CG36) generieren und patentieren [125] (WO2013117581 A1), die eine hohe Serumstabilität aufweisen und aufgrund der daraus resultierenden hohen biologischen Verfügbarkeit für den Einsatz *in vivo* geeignet waren. Tab. 1 zeigt die Aminosäuresequenzen, die EC<sub>50</sub>-Werte und die Halbwertszeiten der generierten Peptide im Serum. Weiterhin wurde in einem ersten *in vivo*-Vorversuch dessen Bindung an CMKLR1-positiven Tumoren gezeigt (Abb. 8). Aufgrund der starken Hydrophobizität zeigten die Peptide eine erhöhte Anreicherung in der Leber.



**Abb. 8:** NIRF-Bildgebung von CMKLR1-positiven Tumoren durch Applikation der IDCC-gekoppelten Chem-9-Varianten in NMRI nu/nu Mäusen. Applikation von 20 mmol/kg. U2OS-Zellen, welche CMKLR1 stabil exprimierten, wurden subkutan in die Flanken appliziert. Die Mäuse der Negativkontrolle trugen keinen Tumor. [121]

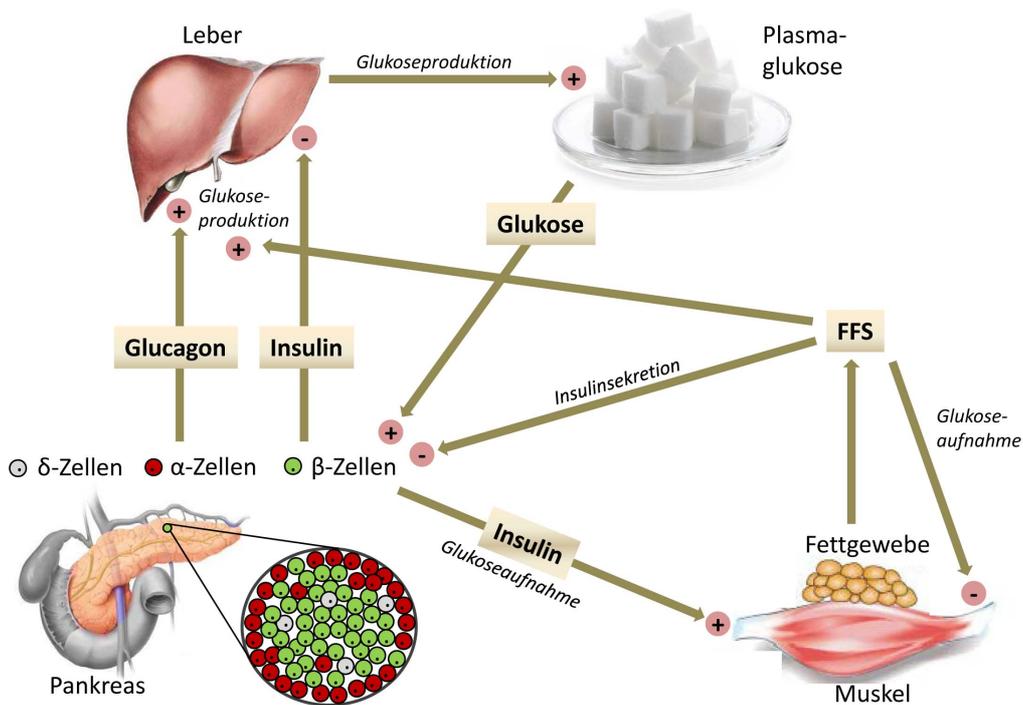
## 1.4. GLUKOSEHOMÖOSTASE

### 1.4.1. REGULIERUNG DES BLUTZUCKERSPIEGELS

Als Glukosehomöostase wird die Regulation des Blutzuckerspiegels innerhalb physiologischer Grenzen bezeichnet. Die Plasmaglukosekonzentration liegt normalerweise in einem Bereich zwischen 4 und 7 mM [126]. Dieser physiologische Bereich wird durch ein sensibles Zusammenspiel zwischen Glukoseabsorption im Darm und Glukoseproduktion der Leber sowie durch Aufnahme und Metabolismus in peripherem Gewebe konstant gehalten. Abb. 9 zeigt die Wechselwirkung zur Aufrechterhaltung und Regulation des Blutzuckerspiegels unter Beteiligung verschiedener Organe.

Die Regulation und Kontrolle dieses Gleichgewichtes erfolgt im Wesentlichen durch die Hormone Insulin und Glucagon, die beide in der Bauchspeicheldrüse produziert werden. Die Hauptfunktion der Glukosehomöostase-Regulation übernehmen die Langerhans-Inseln des Pankreas. Dies sind hoch vaskularisierte Mikroorgane, bestehend aus verschiedenen Zelltypen, die Glucagon ( $\alpha$ -Zellen; human: 40 %), Insulin ( $\beta$ -Zellen; human: 50 %), Somatostatin ( $\delta$ -Zellen; human: 10 %) und pankreatisches Peptid (PP-Zellen; human: <1 %) sekretieren [127]. Insgesamt umfasst der endokrine Teil des Pankreas etwa ein bis zwei Prozent der Masse des gesamten Pankreas, wobei ein gesunder Erwachsener etwa eine Million dieser Mikroorgane besitzt [128]. Die durchschnittliche Größe der Inseln variiert zwischen 100 und 500  $\mu\text{m}$ , wobei eine Insel aus 1000 bis 3000 Zellen besteht [129]–[131].

Bei erhöhtem Blutzuckerspiegel sezernieren die pankreatischen  $\beta$ -Zellen Insulin, welches die Glukoseproduktion in der Leber inhibiert und über den Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) die Glukoseaufnahme in Muskel und Fettgewebe begünstigt (Abb. 9). Weiterhin stimuliert Insulin die Lipogenese (Energiespeicherung durch Aufnahme von Triglyceriden in die Zelle) und hemmt die Lipolyse (Energiebereitstellung durch Freisetzung von Fettsäuren in die Zirkulation) sowie die Glykogenolyse (Abbau von Glykogen zu Glukose) [132].



**Abb. 9: Wechselwirkung und Regulation des Glukosemetabolismus durch verschiedene Organe.** Insulin wird bei erhöhtem Blutzuckerspiegel von den  $\beta$ -Zellen der pankreatischen Inselzellen sekretiert, senkt daraufhin die Glukoseproduktion in der Leber und erhöht die Glukoseaufnahme in Fettgewebe und Muskel. Insulin hemmt die Freisetzung der freien Fettsäuren (FFS) aus den Fettzellen. Bei niedrigem Blutzuckerspiegel wird die Insulinproduktion reduziert. Gleichzeitig wird Glucagon ausgeschüttet, welches die Glukoseproduktion in der Leber stimuliert. FFS reduzieren ebenfalls die Glukoseaufnahme im Muskel sowie die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen und erhöhen die Glukoseproduktion in der Leber. Modifiziert nach [126].

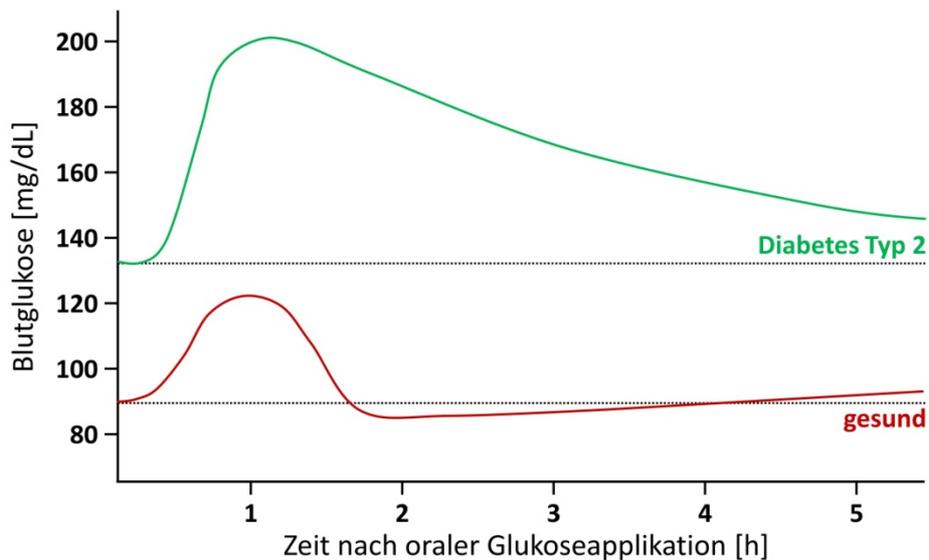
Glukose ist ein wichtiger metabolischer Treibstoff für das Gehirn. Da das Gehirn Glukose nicht speichern oder selbst synthetisieren kann, besteht eine starke Abhängigkeit von zirkulierender Glukose im Blut. Ein Abfall der arteriellen Glukosekonzentration wird von der hepatischen Pfortader, dem *Glomus caroticum* und verschiedenen Arealen im Gehirn erkannt [133]. Als physiologische Reaktion wird die Insulinsekretion gedrosselt. Ein Abfall des Plasmaglukoselevels unter die physiologische Grenze (hypoglykämischen Bedingungen;  $< 3,6$  mM) bewirkt die Sekretion des Hormons Glucagon von pankreatischen  $\alpha$ -Zellen, welches neben der Glykogenolyse auch die Glukoneogenese (Neusynthese von Glukose) aktiviert und als gegenregulatorisches Hormon zu Insulin agiert [134]–[136]. Inhibiert wird die Glucagonsekretion von Insulin, GLP-1 (Glucagon-like Peptid 1), Somatostatin sowie durch Hyperglykämie (Blutglukose nüchtern  $> 7$  mM) [137]–[139]. Bestimmte Aminosäuren wie L-Arginin zeigen hingegen einen stimulatorischen Effekt auf die Glucagonsekretion [140].

Bei hypoglykämischen Bedingungen erfolgt neben der Glucagonproduktion außerdem die Aufspaltung von Fett (Triglyceriden) in Glycerin und freie Fettsäuren als alternative Energielieferanten. Freie Fettsäuren stimulieren wiederum die Glukoneogenese und hemmen die Glykolyse (Abbau von Monosacchariden wie zum Beispiel Glukose).

### 1.4.2. GLUKOSEHOMÖOSTASE UND DEREN KLINISCHE RELEVANZ BEI DIABETES

Eine der klinisch relevantesten Störungen im Regelsystem der Glukosehomöostase ist Diabetes mellitus. Diabetes mellitus nimmt heute fast epidemische Ausmaße an. Im Jahr 2014 lag die globale Prävalenz bei 9 % der über 18-Jährigen und 2012 war Diabetes die direkte Ursache für 1,5 Millionen Todesfälle (WHO). Gemäß des jeweiligen Phänotyps wird unter anderem zwischen Typ 1 und Typ 2 Diabetes unterschieden. Typ 1 Diabetes ist gekennzeichnet durch einen Insulinmangel aufgrund einer voranschreitenden Autoimmunreaktion, die zur immunvermittelten Zerstörung der pankreatischen  $\beta$ -Zellen führt. Diabetes mellitus Typ 2, auch Altersdiabetes genannt, umfasst 90 % der weltweiten Diabeteserkrankungen (WHO). Er tritt im hohen Alter auf oder ist das Resultat von Übergewicht und körperlicher Inaktivität. Eine Vorstufe von Diabetes mellitus Typ 2 ist die Insulinresistenz, die durch eine mangelnde Antwort der Insulinrezeptoren der Insulin-Zielzellen (Leber-, Muskel-, Fettzellen) auf Insulin gekennzeichnet ist. Die Folge ist ein erhöhter Insulinspiegel bei noch physiologischen Blutzuckerwerten [141]. Von einem manifesten Diabetes mellitus Typ 2 wird gesprochen, wenn die produzierte Insulinmenge nicht mehr ausreicht, um den Blutzuckerspiegel zu regulieren und eine zunehmende Insulinsekretionsstörung der  $\beta$ -Zellen auftritt. Abb. 10 zeigt den zeitlichen Verlauf der Blutglukosekonzentration während eines oralen Glukosetoleranztests bei einer gesunden Person und einem Patienten mit Typ 2 Diabetes. Hier zeichnet sich besonders deutlich die unzureichende Regulierung der Blutzuckerwerte bei Diabetes mellitus Typ 2 ab.

Patienten mit Diabetes mellitus haben ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [135]. Die intensive glykämische Kontrolle durch externe Insulingabe bei Diabetespatienten ist mit einem erhöhtem Risiko für Hypoglykämie verbunden [135], [142]. So steigt bei Hypoglykämie neben der Glucagonsekretion auch die Ausschüttung von Noradrenalin und Adrenalin, wodurch verschiedene kardiovaskuläre Effekte (Herzinsuffizienz, Blutdruckanstieg, Herzfrequenzsteigerung) begünstigt werden [135], [143]–[146]. Des Weiteren wurde während der Hypoglykämie eine signifikante Erhöhung von Entzündungsmarkern (Interleukin-6 [IL-6], IL-8, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )) beobachtet, was wiederum zu endothelialen Schädigungen und Gerinnungsstörungen führen kann [135]. Doch nicht nur die Insulintherapie stellt ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar. Adipositas, als wichtigste Ursache für Diabetes mellitus Typ 2, wird ebenfalls mit erhöhtem Blutdruck und einem gesteigerten Risiko für koronare Herzerkrankungen und Schlaganfall assoziiert [147]. Zusammenhängend betrachtet, stellen Fettleibigkeit, Bluthochdruck, Insulinresistenz und erhöhte Blutzuckerkonzentrationen entscheidende Risikofaktoren des Metabolischen Syndroms dar und gehen mit einem erhöhten Risiko für koronare Herzerkrankungen einher [148].



**Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Blutglukose während eines oralen Glukosetoleranztests bei einer gesunden Person und einem Patienten mit Typ 2 Diabetes.** Dabei nimmt der Patient zum Zeitpunkt „null“ eine definierte Menge an Glukose zu sich. Diabetespatienten zeigen eine deutlich höhere Nüchtern-Glukosekonzentration im Vergleich zum gesunden Individuum. Während des Glukosetoleranztestes können bei Diabetespatienten Werte von bis zu 200 mg/dL (11 mM) erreicht werden. Außerdem dauert es deutlich länger, bis die Blutglukosekonzentration wieder den Startwert erreicht. (modifiziert nach [themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org))

Zur gängigsten Therapie des absoluten Insulinmangels bei Diabetes mellitus Typ 2 zählt eine regelmäßige Blutzuckerselbstkontrolle in Kombination mit einer subkutanen Injektion von Insulin in das Unterhautfettgewebe. Des Weiteren wurde die intraportale Transplantation isolierter Inseln bereits erfolgreich demonstriert. Ein großer Vorteil besteht dabei in der resultierenden Insulin-Unabhängigkeit in über 90 % der Diabetespatienten und der damit verbundenen verbesserten glykämischen Kontrolle bei sehr geringen chirurgischen Risiken [129], [149].

### 1.4.3. DIE ROLLE VON GLUCAGON BEI DIABETES

Studien belegen, dass nicht ausschließlich  $\beta$ -Zellen, sondern auch  $\alpha$ -Zellen für den gestörten Glukosemetabolismus bei Diabetespatienten verantwortlich und damit pathophysiologisch relevant sind. Schon vor 30 Jahren formulierten Unger und Orci (1975) eine bihormonelle Hypothese zur Erklärung der Pathophysiologie von Diabetes mellitus [150]. Nach deren Vermutung ist Diabetes ein Resultat von Insulinresistenz in Kombination mit einer stark erhöhten Glucagonsekretion, was wiederum eine gesteigerte hepatische Glukoseproduktion und damit eine Hyperglykämie zur Folge hat. Diese Hypothese konnte durch verschiedene klinische und experimentelle Studien belegt werden. So wurden in Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und 2 extrem hohe Glucagonkonzentrationen, eine sogenannte Hyperglucagonämie, diagnostiziert [140], [151], [152]. Bei einigen Patienten konnte während der Mahlzeiten ein Anstieg des Glucagonspiegels ver-

zeichnet werden, beziehungsweise bei einem niedrigen Blutzuckerspiegel zeigte sich eine gestörte Glucagonausschüttung [140]. Dies verdeutlicht die Fehlregelung der Signalweiterleitung in den Inselzellen bei Diabetes mellitus und zeigt, dass Glucagon ein sinnvolles therapeutisches *Target* zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 darstellt. Metformin, ein Suppressor des hepatischen Glucagon-Signalwegs, wird bereits klinisch eingesetzt [153].

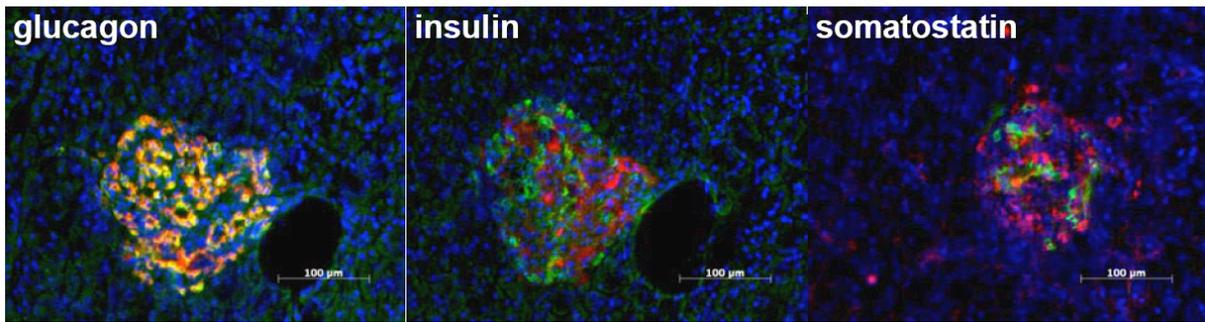
Dieses unregelmäßige Verhalten der  $\alpha$ -Zellen tritt nicht auf, wenn die Insulinwerte im Normalbereich liegen [154]. Dies wiederum suggeriert, dass die Abnormalität in der Glucagonfreisetzung sowohl für das hyperglykämische Krankheitsbild bei Diabetes mellitus als auch für die gestörte Insulinsekretion relevant zu sein scheint.

#### 1.4.4. CHEMERIN UND DESSEN WIRKUNG AUF DEN GLUKOSEMETABOLISMUS

Aktuelle Studien konnten zeigen, dass Chemerin in Adipozyten exprimiert sowie mit Fettleibigkeit und dem Metabolischen Syndrom assoziiert wird. Das CMKLR1-Chemerin-System scheint damit einen Einfluss auf die Insulinresistenz und Glukosetoleranz auszuüben [63], [155]–[159].

So bewirkt ein *knock-out* von CMKLR1 eine verringerte Nahrungsaufnahme, eine verschlechterte Glukosetoleranz sowie eine Abnahme der Glukose-stimulierten Insulinsekretion [155]. Kontroverse Ergebnisse hierzu lieferten Studien von Rouger et al. (2013) und Gruben et al. (2014) [157], [159]. Hier resultierte ein *knock-out* von CMKLR1 weder in einer verschlechterten Glukose- oder Insulintoleranz noch in einer veränderten Nahrungsaufnahme. Allerdings wurde bei diesen Mäusen ein erhöhter Fettanteil gemessen. Ein *knock-out* des Liganden Chemerin förderte hingegen eine Glukoseintoleranz [158].

Bozaoglu et al. (2007) zeigten, dass während der Differenzierung von 3T3-Adipozyten Chemerin hoch- und CMKLR1 herunterreguliert wird [53]. Der *knock-down* von Chemerin oder CMKLR1 durch siRNA hingegen resultierte in einer verminderten Expression von relevanten Adipozyt-assoziierten Genen [160]. Studien von Takahashi et al. (2008) zeigten eine gesteigerte und Studien von Kralisch et al. (2009) eine verminderte Glukoseaufnahme in 3T3-Adipozyten durch Chemerin und lieferten somit kontroverse Ergebnisse [161], [162]. Bei fettleibigen Individuen der Fette Sandratte mit Typ 2 Diabetes wurde außerdem eine Überexpression von CMKLR1 nachgewiesen [163].



**Abb. 11: Expression von CMKLR1 in humanen pankreatischen  $\alpha$ -Zellen.** Kryoschnitte von humanem Pankreas wurden mit einem anti-CMKLR1-Antikörper (Cy3, grün) und mit Antikörpern gegen entweder Glucagon, Insulin oder Somatostatin (Cy2, rot) gefärbt. Ko-Lokalisationen erscheinen gelb und Zellkerne blau (DAPI-Färbung). [120]

Bei immunhistochemischen Färbungen an humanem Pankreasgewebe konnte in unserer Arbeitsgruppe eine Ko-Lokalisation von CMKLR1 und den Glucagon-exprimierenden  $\alpha$ -Zellen in pankreatischen Inselzellen festgestellt werden (Abb. 11) [120].

Immunhistologische Untersuchungen von CMKLR1 an murinen pankreatischen Inselzellen wurden bisher in der Literatur nur von Takahashi et al. (2011) mit einer Ko-Lokalisation von CMKLR1 und den Insulin-exprimierenden  $\beta$ -Zellen publiziert [158].

## 2. ZIEL DIESER ARBEIT

Das Chemerin-Chemerinrezeptorsystem spielt in verschiedenen pathophysiologischen Zuständen eine wesentliche Rolle. Anhand der bisherigen Ergebnisse, die in unserer Arbeitsgruppe generiert wurden (vgl. Kapitel 1.3.4 und 1.4.4) wurden folgende Ziel- beziehungsweise Fragestellungen formuliert:

### 1. Optimierung targetspezifischer Sonden für die optische NIRF-Bildgebung

Eine frühzeitige Erkennung und die anschließende vollständige Entfernung von Tumoren ist entscheidend für eine hohe Überlebensrate der Patienten. Dass GPCRs in einigen Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert sind und für gerichtetes Tumortargeting interessante Zielstrukturen darstellen, wurde am Beispiel des Somatostatin-Rezeptors bereits erfolgreich demonstriert [90].

Die Überexpression von CMKLR1 in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen [120] zeigt dessen Potential als vielversprechendes *Target* für die Tumorthherapie und -diagnostik. Hoch spezifische und affine Liganden für CMKLR1 konnten bereits durch Substitutionsanalysen an Chemerin-9 charakterisiert werden [121], [125]. Ziel dieser Arbeit war es, diese Peptide als gerichtete Sonden für die bildgebende Diagnostik von Krebserkrankungen nutzbar zu machen. Dabei stand außerdem die Charakterisierung neuer Tumorentitäten für CMKLR1 im Fokus.

Durch Expressionsuntersuchungen an humanen Tumorzelllinien sollten geeignete endogene CMKLR1-positive Zelllinien bestimmt werden. Anhand dieser Ergebnisse sollte ein Xenograft-Mausmodell an immundefizienten Mäusen mit CMKLR1-positiven Zelllinien etabliert werden.

Für die klinische Anwendung *in vivo* wäre die spezifische Anreicherung der Sonden im Tumor und eine geringe unspezifische Anreicherung in anderen Organen von zentraler Bedeutung. Weiterhin wäre eine praxistaugliche Zirkulationsdauer und damit eine verminderte Ausscheidung über die Blase wünschenswert. Dies sollte durch Veränderung der Hydrophobizität der Konjugate über verschiedene Linker erreicht werden. Zu diesem Zweck sollte ein Spektrum an Peptidkonjugaten mit unterschiedlichen Linkern designt und im Xenograft-Modell mittels optischer NIRF-Bildgebung untersucht werden. Diese stabilen Farbstoff-gekoppelten Liganden sollten den Xenograft-Mausmodellen injiziert werden, um deren Bindung an die Tumoren mittels NIRF-*Imaging* zu visualisieren und damit deren Potential für die Detektion von Tumoren und ihrem Einsatz in der klinischen Diagnostik zu evaluieren.

## 2. Einfluss des Chemerinrezeptors CMKLR1 auf die Glucagonsekretion

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass Chemerin, ein natürlicher Ligand von CMKLR1, im Pankreas exprimiert wird und den Fettstoffwechsel sowie die Glukosehomöostase beeinflusst. In unserer Arbeitsgruppe wurde CMKLR1 mit Hilfe eines validierten Antikörpers auf humanen pankreatischen  $\alpha$ -Zellen lokalisiert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob diese Ko-Lokalisation mit einem regulatorischen Einfluss von Chemerin auf die Glucagonsynthese im Zusammenhang steht. Eine unmittelbare Verbindung würde für eine direkte Wirkung von Chemerin auf den Glukosestoffwechsel hinweisen und CMKLR1 zu einem interessanten *Target* für die Behandlung von Diabetes mellitus machen.

Zur Beantwortung dieser Frage sollten zunächst Glucagon-Sekretionsuntersuchungen nach Chemerin-Stimulation an glucagonproduzierenden  $\alpha$ -Zelllinien erfolgen. In weiterführenden Experimenten sollten humane pankreatische Inselzellen als primäres Stimulationsmodell etabliert werden, um das regulatorische Wechselspiel zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen organismusnah abzubilden.

Aus der Literatur waren weitere Chemerinrezeptoren bekannt: GPR1 [62] und CCRL2 [164]. Im Zuge dieser Doktorarbeit sollten außerdem die Rolle und Lokalisation dieser Rezeptoren durch mRNA-Expressionsstudien an Zelllinien und Geweben untersucht werden. Dabei sollten die Unterschiede zwischen den Spezies Mensch, Maus und Schwein herausgestellt werden.

## 3. MATERIAL

### 3.1. GERÄTE

Tab. 2: Geräte

Gerät	Hersteller
2100 Bioanalyzer	Agilent (Palo Alto, USA)
BIND® Reader	SRU Biosystems (Woburn, USA)
Bio-Rad CFX96 Real-Time-System	Bio-Rad Laboratories (Berkeley, USA)
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH (Hanau, DE)
CellCelector	Aviso (Jena , DE)
CellLux, Cellular Imaging System	Perkin Elmer (Waltham, USA)
ChemiDoc MD Imaging System	Bio-Rad Laboratories (Berkeley, USA)
Cytospin 3	Thermo Scientific (Waltham, USA)
DNA-Agarosegel-Systeme	Peqlab (Erlangen, DE)
Einfrierbehälter für die Zellkultur „Mr.Frosty“	Thermo Fisher Scientific (Rochester, USA)
EnVision 2103 Multilabel Reader	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Excelsior ES Tissue Processor	Thermo Scientific (Waltham, USA)
FlowStar LB513, Radio Flussdetektor für dieHPLC	Berthold (Wildbad, DE)
Gefriermikrotom Frigocut 2800	Reichert-Jung (Wien, A)
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr (Biberach an der Riss, DE)
Gefrierschrank, -80°C	Thermo Scientific (Waltham, USA)
GeneFlash	Syngene (Alexandria, USA)
IN Cell Analyzer 1000	GE Healthcare (Waukesha, USA)
Kryostat Leica CM3050S	Leica Biosystems (Nussloch, DE)
Kühlschrank, 4°C	Liebherr (Biberach an der Riss, DE)
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, DE)
MicroBeta 2	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Microplate Washer ELx405 Select CW	BioTek (Winooski, USA)
Mikroskop Axiophot	Zeiss (Oberkochen, DE)
Mikroskop Axiovert 100 (LSM510)	Zeiss (Oberkochen, DE)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss (Oberkochen, DE)
Mikroskop Observer Z1	Zeiss (Oberkochen, DE)
Mikroskop Stemi 2000	Zeiss (Oberkochen, DE)
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, DE)
Pearl Imager	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
pH-Meter 761 Calimatic	Knick (Berlin, DE)
Photometer	Eppendorf (Hamburg, DE)
Power Washer 384	Tecan (Männedorf, CH)

Rocking Platform WT16	Biometra (Goettingen, DE)
Simpli Nano	GE Healthcare (Waukesha, USA)
Sorvall Ultra Pro 80	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Spectra max Plus 384	Molecular Devices (Biberach, DE)
Sterilwerkbank LaminAir	Heraeus Instruments GmbH (Hanau, DE)
Thermocycler	Biometra (Göttingen, DE)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, DE)
Thermoshake Laborschüttler	Gerhardt GmbH & Co. KG (Königswinter, DE)
Tischzentrifuge 3722L	Fisher Scientific (Waltham, USA)
TRANS-BLOT SD	Bio-Rad Laboratories (Berkeley, USA)
Ultra-Turrax T8	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, DE)
Vakuumstation Multiscreen <sub>HTS</sub>	Millipore (Billerica, USA)
Vibramax 100 Schüttler	Heidolph (Schwabach, DE)
Wallac Wizard 1470, Gamma Counter	Perkin Elmer (Waltham, USA)

## 3.2. CHEMIKALIEN

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), VWR (Darmstadt), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

### 3.2.1. MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Tab. 3: Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen.

Proteinbezeichnung	Puffer
Ciprobay	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, DE)
DMEM, 1 g/L Glukose	Biochrom AG (Berlin, DE)
DMEM, 4,5 g/L Glukose	Biochrom AG (Berlin, DE)
Fetal Bovine Serum	Biochrom AG (Berlin, DE)
G 418-BC, 25.000 U/ mL	Biochrom AG (Berlin, DE)
GlutaMAX	Gibco (Carlsbad, USA)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (1X) w/o Phenolred	Biochrom AG (Berlin, DE)
JetPEI	Polyplus transfection (Illkirch Cedex, FR)
Matrigel - Basement Membrane Matrix High Concentration	Corning (New York, USA)
McCoy's 5A modified Medium	Biochrom AG (Berlin, DE)
Natriumpyruvat	Biochrom AG (Berlin, DE)
nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom AG (Berlin, DE)
PBS Dulbecco 1x, w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG (Berlin, DE)
PIM(ABS) humanes Serum	Prodo labs (Californien, USA)

PIM(G) Glutamin/Glutathion-Mix	Prodo labs (Californien, USA)
PIM(S) Medium	Prodo labs (Californien, USA)
Poly-D-Lysin	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Quantum 263, mit L-Glutamin	PAA (Pasching, AT)
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG (Berlin, DE)
RPMI 1640 Medium, glukosefrei	Gibco (Carlsbad, USA)
RPMI 1640 1x Medium mit 20 mM HEPES	Biochrom AG (Berlin, DE)
Trypsin/EDTA Solution 1x	Biochrom AG (Berlin, DE)

### 3.2.2. PUFFER UND LÖSUNGEN

Tab. 4: Puffer und Lösungen.

Puffer	Zusammensetzung	
2xYT Medium	1,6% (w/v)	bacto-Trypton
	1% (w/v)	Hefeextrakt
	0,5% (w/v)	NaCl
5x SDS-PAGE Probenpuffer	250 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	5% (w/v)	SDS
	45% (w/v)	Glycerol
	500 mM	DTT
	0,12%	Bromphenolblau
6x Probenpuffer für die Gelelektrophorese	6 x	TAE
	60 % (w/v)	Glycerol
	0,05 % (w/v)	Bromphenolblau
AI-Puffer	0,3 M	Tris
	20 % (v/v)	Methanol
All-Puffer	0,025 M	Tris
	20 % (v/v)	Methanol
C1-Puffer	130 mM	NaCl
	5 mM	KCl
	10 mM	Hepes
	2mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	Glucose
CCMB80 (pH 6,4)	10 mM	Kaliumacetat
	80 mM	CaCl <sub>2</sub>
	20 mM	MnCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 % (w/v)	Glycerin
Coomassie-Färbelösung	30 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau G250
Coomassie-Fixierlösung	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

Isolutionslösung für pankreatische Inseln aus dem Schwein	1 mg/ml	Liberase DL
	150 µg/ml	DNase I
Isolutionslösung für pankreatische Inseln aus der Maus	20 mg/L	Nafamostat mesylate (Biozol, Eching, DE)
	in HBSS	
K-Puffer	1 mg/mL	Collagenase P
	in HBSS	
KRBH-Puffer (pH 7,4)	0,04 M	6-Aminohexansäure
	20 % (v/v)	Methanol
	119 mM	NaCl
	4,7 mM	KCl
	25 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	1,2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1,2 mM	MgCl <sub>2</sub>
	2,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
LB-Medium	10 mM	HEPES
	0,2 % (w/v)	BSA
	1 % (w/v)	bacto-Trypton
Lysis-Puffer	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	1 % (w/v)	NaCl
	100 mM	Tris-HCl pH 8,8
Membran-Bindungs-Puffer	1 % (w/v)	SDS
	1 Protease-Tablette: Protease Inhibitors cOmplete (Roche, Basel, CH) auf 50 ml	
Membran-Isolations-Puffer	50 mM	HEPES pH 7,4
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 % (w/v)	BSA
PBS (pH 7,4)	1 Protease-Tablette: Protease Inhibitors cOmplete (Roche, Basel, CH) auf 50 ml	
	5 mM	TrisHCl (pH 7,6)
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
PBS-T (pH 7,4)	1 mM	EGTA
	1 Protease-Tablette: Protease Inhibitors cOmplete (Roche, Basel, CH) auf 50 ml	
	140 mM	NaCl
	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Radioaktiver Wasch-Puffer	2,7 mM	KCl
	1,76 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	140 mM	NaCl
	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
SDS-PAGE Bottom Buffer (pH 8,8)	2,7 mM	KCl
	1,76 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,1 % (v/v)	Tween 20
SDS-PAGE Top Buffer (pH 8,25)	50 mM	Tris-HCl pH 7,4
	125 mM	NaCl
	0,05 % (w/v)	BSA
SDS-PAGE Bottom Buffer (pH 8,8)	0,2 M	Tris-HCl
	0,1 M	Tris-HCl
	0,1 M	Tricin
SDS-PAGE Top Buffer (pH 8,25)	0,1 % (w/v)	SDS

SOC	2 % (w/v)	bacto-Trypton
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	10 mM	MgSO <sub>4</sub>
	20 mM	Glucose
Stripping-Puffer (pH 2,67)	0,5 M	Glycin
TAE	40 mM	Tris-HCl
	20 mM	Essigsäure
	1 mM	EDTA (pH 8)
TBS-T (pH 7,4)	50 mM	Tris-HCl PH 7,4
	150 mM	NaCl
	0,1 % (v/v)	Tween 20
Western Blot Blockierlösung	5 % (w/v)	Trockenmilchpulver in TBS-T

### 3.2.3. KITS

Tab. 5: Kits.

Kit	Hersteller
Chemerin ELISA (human)	DRG Instruments (Marburg, DE)
Chemerin ELISA (Maus)	DRG Instruments (Marburg, DE)
Fast Start TaqMan® Probe Master	Roche (Basel, CH)
Glucagon ELISA	DRG Instruments (Marburg, DE)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Insulin ELISA (human)	DRG Instruments (Marburg, DE)
Insulin ELISA (Maus)	DRG Instruments (Marburg, DE)
Insulin ELISA (Ratte)	DRG Instruments (Marburg, DE)
NucleoBond Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel (Düren, DE)
Phusion High Fidelity DNA Polymerase Kit	Finnzymes Reagents (Vantaa, FI)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, DE)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, DE)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, DE)
RiboPure Kit	Ambion Inc. (Austin, USA)
RNAqueous-Micro Kit	Ambion Inc. (Austin, USA)
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen (Hilden, DE)
Sso Fast EvaGreen Supermix	Bio-Rad Laboratories (Berkeley, USA)

## 3.2.4. PEPTIDE

Alle verwendeten Peptide (siehe Tab. 6) wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma peptides & elephants (Potsdam, DE) synthetisiert. Der Farbstoff (ITCC) wurde von IC Discovery (Berlin, DE) bezogen.

**Tab. 6: Molekulare Sonden und Peptide für *Imaging*-Experimente.** grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Die *scrambled* (scr) Peptide bestehen aus den identischen Aminosäuren analog zu dem jeweiligen Peptid, wobei diese aber zufällig in ihrer Reihenfolge vertauscht wurden.

Peptid	Aminosäuresequenz		
Chemerin-9	H <sub>2</sub> N Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser OH		
<b>CG34</b> (stabiles Chem-9)	Ac Tyr Cha Hyp Gly Cit Phe ala Tic Ser OH		
<b>CG36</b> (stabiles Chem-9)	Ac Tyr Cha Pro Gly Met Tyr Ala Phe phe OH		
<b>CG35</b>	ITCC-	<b>AHX-</b>	CG34
<b>CG46</b>	ITCC-		CG34
<b>CG47</b>	ITCC-	<b>TTDS-</b>	CG34
<b>CG75</b>	ITCC-	<b>PEG11-</b>	CG34
<b>CG77</b>	ITCC-	<b>LysCap-</b>	CG34
<b>CG37</b>	ITCC-	<b>AHX-</b>	CG36
<b>CG48</b>	ITCC-		CG36
<b>CG49</b>	ITCC-	<b>TTDS-</b>	CG36
<b>CG76</b>	ITCC-	<b>PEG11-</b>	CG36
<b>CG78</b>	ITCC-	<b>LysCap-</b>	CG36
<b>CG61</b> ( <i>scrambled</i> CG34)	Ac Cit Gly Ser ala Hyp Tyr Tic Phe Cha OH		
<b>CG60</b> ( <i>scrambled</i> CG36)	Ac Met Tyr phe Cha Phe Ala Gly Pro Tyr OH		
<b>CG63</b> (scrCG35)	ITCC-	<b>AHX-</b>	CG61
<b>CG80</b> (scrCG77)	ITCC-	<b>LysCap-</b>	CG61
<b>CG81</b> (scrCG75)	ITCC-	<b>PEG11-</b>	CG61
<b>CG79</b> (scrCG49)	ITCC-	<b>TTDS -</b>	<b>CG60</b>

### 3.3. ENZYME

Tab. 7: Enzyme.

Enzym	Hersteller
Collagenase P	Roche (Basel, CH)
DNase I	AppliChem (Omaha, USA)
Liberase DL	Roche (Basel, CH)
Phusion Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes (Rochester, USA)
DNA-Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, USA)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Ipswich, USA)

### 3.4. ANTIKÖRPER

Tab. 8: Primäre Antikörper. WB: Western Blot. IF: Immunfluoreszenz.

Primär-antikörper	Beschreibung	Hersteller	Verdünnung
anti- $\beta$ -Actin	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen $\beta$ -Actin; # A5441; Klon AC15	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	WB: 1:50.000
anti-GAPDH	Monoklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen GAPDH; #2118; Klon 14C10	Cell Signalling (Danvers, USA)	WB: 1:1000
anti-Glucagon	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Glucagon; # G2654; Klon K79bB10	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	IF-Zellen: 1:2000 IF-Gewebe: 1:2000
anti-Glucagon	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Glucagon; # NB100-91782 1000 $\mu$ g/mL	Novus Biologicals (Littleton, USA)	IF-Zellen: 1:400 IF-Gewebe: 1:400
anti-GPR1	Polyklonaler Antikörper aus Maus gegen GPR1; # SAB1401159 250 $\mu$ g/mL	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	IF-Zellen: 1:250
anti-hCCRL2	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen humanes CCRL2; immunogene Peptidsequenz: FLDGTFSKYLRCRFHLRSNTPL QPRGQSAQGTSREEPDHSTEV; # HPA043238 500 $\mu$ g/mL	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)	IF-Zellen: 1:500 IF-Gewebe: 1:500 WB: 1:500

anti-hCMKLR1	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen humanen CMKLR1; immunogene Peptidsequenz: NERTSMNERETGML; # 10325 1000 µg/mL	Cayman Chemical (Michigan, USA)	IF-Zellen: 1:5000 IF-Gewebe: 1:100 WB: 1:10.000
anti-hCMKLR1 #21-86	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen humanen CMKLR1; immunogene Peptidsequenz: SSWPTHSQMDPVG Y 600 µg/mL	Eurogentec (Lie'ge, B) [120]	IF-Zellen: 1:200 IF-Gewebe: 1:200 WB: 1:300
anti-mCMKLR1	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen murinen CMKLR1; # LS-C106194; Klon BZ194 500 µg/mL	Biozol (Eching, DE)	IF-Zellen: 1:20 IF-Gewebe: 1:10
anti-Insulin	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Insulin; immunogene Peptidsequenz: humanes Insulin; # Mob234; Klon K36ac10	Biotrend (Köln, DE)	IF-Zellen: 1:1000 IF-Gewebe: 1:800
anti-Insulin	Polyklonaler Antikörper aus Meerschweinchen gegen Insulin; immunogene Peptidsequenz: Schweineinsulin; #A0564 2770 µg/mL	Dako (Glostrup, DK)	IF-Zellen: 1:1000 IF-Gewebe: 1:1000

Tab. 9: Sekundäre Antikörper. WB: Western Blot. IF: Immunfluoreszenz.

Sekundärantikörper	Beschreibung	Hersteller	Verdünnung
GaGp-Cy3	<i>goat</i> anti-Meerschweinchen IgG (H+L)-Cy3 1,5 mg/mL	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	IF-Zellen: 1:500 IF-Gewebe: 1:200
GaM-Cy2	<i>goat</i> anti-Maus IgG + IgM (H+L)-Cy2 1,5 mg/mL	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	IF-Zellen: 1:400
GaM-Cy3	<i>goat</i> anti-Maus IgG + IgM (H+L)-Cy3 0,75 mg/mL	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	IF-Zellen: 1:1000 IF-Gewebe: 1:400
GaM-POD	<i>goat</i> anti-Maus IgG (H+L) gekoppelt mit Horseradish Peroxidase 0,4 mg/mL	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	WB: 1:2000
GaRat-Cy2	<i>goat</i> anti-Ratte IgG (H+L)-Cy2 1,5 mg/mL	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	IF-Zellen: 1:200 IF-Gewebe: 1:100
GaR-Cy2	<i>goat</i> anti-Kaninchen-IgG (H+L)-Cy2 0,75 mg/mL	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	IF-Zellen: 1:1000 IF-Gewebe: 1:100

GaR-Cy3	<i>goat</i> anti-Kaninchen-IgG (H+L)-Cy3 1,5 mg/mL	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	IF-Zellen: 1:400 IF-Gewebe: 1:400
GaR-POD	<i>goat</i> anti-Kaninchen IgG (H+L) gekoppelt mit Horseradish Peroxidase 0,4 mg/mL	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)	WB: 1:10.000

### 3.5. TISSUE ARRAY

Für den Nachweis von CMKLR1 auf humanem Mammakarzinomgewebe wurde ein *Breast Tumor Frozen Tissue Array* (#T6235086; Lot No.: B202086) von der Firma BioChain (Newark, USA) verwendet. Dieser umfasste Gewebe von 37 Mammakarzinompatientinnen (duktales Karzinom; Positionen A1-E5) sowie drei gesunde Normalgewebe (Positionen E6-E8).

### 3.6. OLIGONUKLEOTIDE

#### 3.6.1. PRIMER UND SONDEN FÜR DIE QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Spezifische Oligonukleotide für die Real-Time PCR wurde mit Hilfe des UCSC Genome Browser (<http://genome-euro.ucsc.edu>) und dem Primer-BLAST-Tool von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) designiert und bei Sigma-Aldrich synthetisiert.

Tab. 10: Primer und Probes für die qPCR.

Gen	Organismus/Spezifität	Sequenz/Assay ID	Hersteller
ALG9	<i>Homo sapiens</i>	fwd: GTCTTCTGGCTTTTGTGAGCTG rev: TCACGTGCAACCCAAACTTC	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
CMKLR1	<i>Homo sapiens</i>	fwd: GGGACTGATTGGCTGAGGAC rev: ATCACCAGACCATTGCCAG	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GPR1	<i>Homo sapiens</i>	fwd: CTGGAACCGGGAAGGTACAC rev: TCCCAGCTGGACTTTCTCCT	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
UBC	<i>Homo sapiens</i>	fwd: ATTTGGGTCGCGGTTCTTG rev: TGCCTTGACATTCTCGATGGT	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
CCRL2	<i>Homo sapiens</i>	Hs00277231_m1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
CMKLR1	<i>Homo sapiens</i>	137620	Roche (Basel, CH)

GAPDH	<i>Homo sapiens</i>	4326317E-1105051	Applied Biosystems (Foster City, USA)
RARRES2	<i>Homo sapiens</i>	Hs00161209_g1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
RPS29	<i>Homo sapiens</i>	Hs03004310_g1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
CCRL2	<i>Mus musculus</i>	Mm00516914_g1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
CMKLR1	<i>Mus musculus</i>	Mm01700211_m1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
GAPDH	<i>Mus musculus</i>	Mm99999915_g1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
GPR1	<i>Mus musculus</i>	Mm02620665_s1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
RARRES2	<i>Mus musculus</i>	Mm00503579_m1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
RPS29	<i>Mus musculus</i>	Mm02342448_g1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
CCRL2	<i>Sus scrofa domestica</i>	fwd: CTTGGAGAGCAGGTTGGAAG rev: CAACCAAGAACACCGTGATG	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
CMKLR1	<i>Sus scrofa domestica</i>	fwd: GAACACAGGTCTCCTGCACA rev: GATGGAAGGGTCCCTCAAGGC	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GPR1	<i>Sus scrofa domestica</i>	fwd: GAACTGGAGGAACAGGGCTT rev: CCCAGGACAAACGCTAAACA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
OAZ1	<i>Sus scrofa domestica</i>	fwd: GAAGGAGGGGGATAAACCCAG rev: TGGGTGAGGGACATCAGGAG	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RARRES2	<i>Sus scrofa domestica</i>	fwd: AGTTCCACAAGCACCCACCC rev: GCTTTCTTCCAGTCCCTCTT	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
CCRL2	<i>Rattus norvegicus</i>	Rn01746782_g1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
CMKLR1	<i>Rattus norvegicus</i>	Rn00573616_s1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
GAPDH	<i>Rattus norvegicus</i>	Rn99999916_s1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
GPR1	<i>Rattus norvegicus</i>	Rn00564179_s1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
RARRES2	<i>Rattus norvegicus</i>	Rn01451853_m1	Life Technologies (Carlsbad, USA)
CCRL2	<i>Chinese hamster</i>	fwd: CCTCACTTTTTGCCAGTTGA rev: ATCATTCTGCCTCTCCCTGA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
CMKLR1	<i>Chinese hamster</i>	fwd: AGGGTTCAGGAGACACATGG rev: CAGCTTGAAGACGATGGTGA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GAPDH	<i>Chinese hamster</i>	fwd: CAATGACCCCTT CATTGA CC rev: GCTTTCCATTCTCAGCCT TG	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
GPR1	<i>Chinese hamster</i>	fwd: AGCATTTGGGAACTCACCAC rev: TAAAGGATGGGGTTCAAGCA	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RARRES2	<i>Chinese hamster</i>	fwd: CTGGA AAAACCCCGAGTGTA rev: CACTGGGACTCCTGAAGCTC	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### 3.6.2. PRIMER FÜR DIE AMPLIFIZIERUNG VON PLASMID-DNA

Die in Tab. 11 aufgeführten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

Tab. 11: Primer für die Amplifizierung von Plasmid-DNA.

Gen	Organismus/ Spezifität	Sequenz
CCRL2	<i>Homo sapiens</i>	Fwd: GGTGGTCTCATATGGCCAATTACACGCTGGCA Rev: GGTGGTCTCATTACACTTCGGTGGGA ATGGTC  zur Herstellung von pH-D-Kan CCRL2 nach [165]
CMKLR1	<i>Homo sapiens</i>	Fwd: GGTGGTCTCATATGGAGGATGAAGATTACAAC Rev: GGTGGTCTCATTCAAAGCATGCCGGTCTCCCT  zur Herstellung von pH-D-Kan CMKLR1 nach [165]
CMKLR1- myc	<i>Mus musculus</i>	Fwd_mutStop: GAAGAGGATCTGTGAGCAGCAAAT Rev_mutStop: TGAGATGAGTTTCTGCTCGAGCGG  zum Einfügen eines Stop-Codons hinter CMKLR1-myc nach dem Restriktionsverdau von pCMV6 mCMKLR1-myc DDK mit <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RVI (New England Biolabs) und der Ligation in pcDNA 3.1+
GPR1	<i>Homo sapiens</i>	Fwd: ATGGAAGATTTGGAGGAAACA Rev: CTTGAGCTGT TTCCAGGAGACA  zur Herstellung von pEGFP-N1 GPR1-EGFP

## 3.7. PLASMIDE

### 3.7.1. KOMMERZIELLE PLASMIDE

Tab. 12: Kommerziell bezogene Plasmide.

Plasmid	Gen	Backbone und Hersteller	Antibiotikumresistenz
pCMV6 mCMKLR1- myc DDK	CMKLR1-myc- DDK (Maus)	pCMV6 entry (Origene, Rockville, USA)	Kanamycin (prokaryotisch)
pcDNA 3.1 CMKLR1	CMKLR1 (human)	pcDNA 3.1+ (UMR, Rolla, USA)	Ampicillin (prokaryotisch) G418 (eukaryotisch)
pcDNA 3.1+	-	pcDNA 3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, USA)	Ampicillin (prokaryotisch) G418 (eukaryotisch)

pcDNA 3.1 CCRL2	CCRL2 (human)	pcDNA 3.1+ (UMR, Rolla, USA)	Ampicillin (prokaryotisch) G418 (eukaryotisch)
pcDNA 3.1 GPR1	GPR1 (human)	pcDNA 3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, USA)	Ampicillin (prokaryotisch) G418 (eukaryotisch)
pEGFP-N1	EGFP	pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, USA)	Ampicillin (prokaryotisch) G418 (eukaryotisch)

### 3.7.2. GENERIERTE PLASMIDE

Die hier aufgeführten Plasmide wurden aus den oben aufgeführten kommerziellen Plasmiden hergestellt.

Tab. 13: In dieser Arbeitsgruppe klonierte Plasmide.

Plasmid	Gen	Backbone und Quelle	Antibiotikumresistenz
pcDNA 3.1 mCMKLR1- myc	CMKLR1-myc (Maus)	kloniert aus pCMV6 entry mCMKLR1 cmc DDK in pcDNA 3.1+ mittels <i>BamHI</i> + <i>EcoRV</i>	Ampicillin (prokaryotisch) G418 (eukaryotisch)
pcDNA 4/TO Gα16	Gα16 (human)	kloniert von Quirino Schefer in pcDNA 4/TO	Ampicillin (prokaryotisch) Zeocin (eukaryotisch)
pEGFP-N1 GPR1-EGFP	GPR1-EGFP (human)	kloniert aus GPR1 pcDNA 3.1+ in pEGFP-N1 mittels <i>SmaI</i> und <i>blunt-end</i> PCR Produkt	Ampicillin (prokaryotisch) G418 (eukaryotisch)
pHD-Kan	-	pHD-Kan [165]	Kanamycin (prokaryotisch) HygromycinB (eukaryotisch)
pHD-Kan CCRL2	CCRL2 (human)	pHD-Kan, kloniert nach Schefer et al. (2014) aus CCRL2 pcDNA 3.1+	Kanamycin (prokaryotisch) HygromycinB (eukaryotisch)
pHD-Kan CMKLR1	CMKLR1 (human)	pHD-Kan, kloniert nach Schefer et al. (2014) aus CMKLR1 pcDNA 3.1+	Kanamycin (prokaryotisch) HygromycinB (eukaryotisch)

## 3.8. ORGANISMEN

### 3.8.1. SCHWEIN (*SUS SCROFA*)

Für die Isolation pankreatischer Inselzellen sowie für die Gewebeentnahme und anschließende Analyse mittels quantitativer Real-Time PCR, wurden weibliche Hausschweine (*Sus scrofa domestica*) in einem Alter von 4-6 Monaten verwendet. Die Arbeitsgruppe von Dr. Dipl. Biol. Thore

Dietrich vom Deutschen Herzzentrum Berlin hat uns freundlicherweise die Schweine zur Verfügung gestellt, wobei die Organentnahme in Zusammenarbeit und unter deren Anleitung erfolgte.

### 3.8.2. MAUS (*MUS MUSCULUS*)

Für *in vivo*-Experimente wurden weibliche Balb/c AnNCrI sowie weibliche athymische RjOrI:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup> Nacktmäuse von Charles River (Wilmington, USA) bezogen. Bei Beginn der Experimente waren die Mäuse mindestens 8 Wochen alt. Die Haltung und Pflege wurde von den Tierpflegern der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charite, Campus Virchow Klinikum, übernommen.

Die Haltung der immunsupprimierten Mäuse erfolgte unter erhöhten Hygienebedingungen in einem Scantainer (Scanbur, Karlslunde DK) in einer Umgebung mit einer kontrollierten relativen Luftfeuchtigkeit von 75 % und einer Temperatur von 32 °C. Die Tiere wurden mit Haltungsfutter gefüttert und hatten freien Zugang zum Trinkwasser.

### 3.8.3. PRIMÄRE ZELLEN

Humane pankreatische Inseln wurden von der Firma tebu-bio (Le-Perray-en-Yvelines, FR) in einer Bestellgröße von 2.500 oder 5.000 IEQ bezogen. Die Hintergrundinformationen zu den einzelnen Patienten (Spendern) sind in der nachfolgenden Tabelle gelistet.

Tab. 14: Übersicht über die Spender der humanen pankreatischen Inseln.

Spender	1	2	3	4	5	6	7	8
BMI	20,3	30,9	25,3	20,2	21,4	19	23,4	29,1
Todesursache	Schlaganfall	Motorradunfall	<i>anoxic Event</i>	Kopfverletzung	Motorradunfall	Kopftrauma	Schlaganfall	Kopfschusswunde
Geschlecht	weiblich	männlich	männlich	männlich	männlich	weiblich	weiblich	männlich
Stimulation	✓	✓	✓	✓				
RNA			✓	✓	✓	✓	✓	✓
Immunfluoreszenz						✓		
Western Blot					✓	✓		

Die Isolation von pankreatischen Inseln aus Balb/c AnNCrI-Mäusen erfolgte mittels Collagenase P (vgl. 4.1.5) und die Gewinnung von pankreatischen Inseln aus dem Schwein wurde mittels Liberase DL (vgl. Kapitel 4.1.6) durchgeführt.

### 3.8.4. EUKARYOTISCHE ZELLINIEN

Die aufgeführten Zelllinien stammen von den Firmen ATCC (Manassas, USA) oder CLS (Eppelheim, DE).

Tab. 15: Eukaryotische Zelllinien.

Zelllinie	Organismus	Herkunft	Zellkulturmedium
A549	<i>Homo sapiens</i>	Lungenkarzinom	RPMI + 10 % FCS
AGS	<i>Homo sapiens</i>	Magen, Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
AsPC1	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, Adenokarzinom-metastase	RPMI + 10 % FCS + Natriumpyruvat
Bon	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, NET	RPMI + 10 % FCS
BxPc3	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
CaCo2	<i>Homo sapiens</i>	Dickdarm, kolorectales Adenokarzinom	DMEM + 10 % FCS
Capan1	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, Adenokarzinom-metastase	RPMI + 10 % FCS
Capan2	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, Adenokarzinom	Mc Coys + 10 % FCS + Glutamax
CM17	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, Insulinom	DMEM + 10 % FCS
DU4475	<i>Homo sapiens</i>	Milchdrüse der Brust, Karzinom	RPMI + 10 % FCS
H727	<i>Homo sapiens</i>	Lunge, Karzinoid, NET	DMEM + 10 % FCS
HCT116	<i>Homo sapiens</i>	Dickdarm, kolorektales Karzinom	DMEM + 10 % FCS
HEK 293A	<i>Homo sapiens</i>	embryonale Niere	RPMI + 10 % FCS
HT29	<i>Homo sapiens</i>	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
IMR32	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn, Neuroblastom	RPMI + 10 % FCS
KRJ-1	<i>Homo sapiens</i>	Ileum, Karzinoid	Quantum 263, mit L-Glutamin
Kato III	<i>Homo sapiens</i>	Magen, Karzinom	RPMI + 10 % FCS
LCC-18	<i>Homo sapiens</i>	Dickdarm, NET	RPMI + 10 % FCS
Lan1	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn, Neuroblastom	RPMI + 10 % FCS
Lovo	<i>Homo sapiens</i>	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
LS174T	<i>Homo sapiens</i>	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	DMEM + 10 % FCS + NEA
MCF7	<i>Homo sapiens</i>	Milchdrüse der Brust, Adenokarzinom	DMEM + 10 % FCS
MDA-MB-231	<i>Homo sapiens</i>	Brust, Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS

MDA-MB-435	<i>Homo sapiens</i>	Haut, Melanom	RPMI + 10 % FCS
MDA-MB-468	<i>Homo sapiens</i>	Brust, Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
MIP101	<i>Homo sapiens</i>	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
MiaPaCa-2	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, Karzinom	DMEM + 10 % FCS
N31	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn, Neuroblastom	RPMI + 10 % FCS
N39	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn, Neuroblastom	RPMI + 10 % FCS
OE19	<i>Homo sapiens</i>	Speiseröhre, Karzinom	RPMI + 10 % FCS
PA-CLS-52	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
PL-45	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, duktales Adenokarzinom	DMEM + 10 % FCS
Panc10.05	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
QGP1	<i>Homo sapiens</i>	Pankreas, Inselzellkarzinom	DMEM + 10 % FCS
SH-SY5Y	<i>Homo sapiens</i>	Knochenmark, Neuroblastom	DMEM (4,5 g/L Glc) + 10 % FCS
SKBR-3	<i>Homo sapiens</i>	Brust, Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS + NEA + 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol + Natriumpyruvat
SK-HEP-1	<i>Homo sapiens</i>	Leber, Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
SK-MEL-1	<i>Homo sapiens</i>	Haut, Melanom	DMEM + 10 % FCS
SK-N-AS	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn, Neuroblastom	DMEM + 10 % FCS + NEA
SK-NMC	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn, Neuroepitheliom	DMEM + 10 % FCS
SW13	<i>Homo sapiens</i>	Nebenniere, Karzinom	RPMI + 10 % FCS
SW620	<i>Homo sapiens</i>	Dickdarm, kolorektales Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
T47D	<i>Homo sapiens</i>	Milchdrüse der Brust, Adenokarzinom	RPMI + 10 % FCS
U2OS	<i>Homo sapiens</i>	Knochen, Osteosarkom	McCoy's 5A + 10 % FCS + Glutamax
U87-MG	<i>Homo sapiens</i>	Gehirn, Glioblastom	RPMI + 10 % FCS
$\alpha$ TC1 Klon 6	<i>Mus musculus</i>	Pankreas, $\alpha$ -Zellen, Adenom	DMEM + 20 % FCS
$\alpha$ TC1 Klon 9	<i>Mus musculus</i>	Pankreas, $\alpha$ -Zellen, Adenom	DMEM + 20 % FCS
$\alpha$ TC1 parental	<i>Mus musculus</i>	Pankreas, $\alpha$ -Zellen, Adenom	DMEM + 20 % FCS
$\beta$ TC3	<i>Mus musculus</i>	Pankreas, Insulinom	DMEM + 20 % FCS
Min6	<i>Mus musculus</i>	Pankreas, Insulinom	DMEM + 10 % FCS + 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol
INR1G9	<i>Chinese hamster</i>	$\alpha$ -Zellen, Glucagonom	RPMI + 10 % FCS
Ins1	<i>Rattus norvegicus</i>	Pankreas, Insulinom	RPMI + 10 % FCS + Natriumpyruvat + 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol + Glutamax

### 3.8.5. PROKARYONTISCHE ZELLINIEN

Für die Klonierung und Amplifizierung von Plasmiden wurde der *Escherichia coli* Stamm TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet.

## 3.9. SOFTWARE

Tab. 16: Software.

Software	Hersteller
AssayPro	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Bio-Rad CFX Manager 3.0	Bio-Rad Laboratories (Berkeley, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc (La Jolla, USA)
ImageJ	<a href="http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html">http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html</a>
IN Cell Investigator Software 3.6	GE Healthcare (Waukesha, USA)
Photoshop CS3 Extended 10.0	Adobe (San Jose, USA)
Pearl Cam Software 2.9	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
qBase PLUS 2.4	Biogazelle (Gent, B)
SoftMax Pro 5.3	MDS Analytical Technologies (Sunnyvale, USA)
Vector NTI 10	Invitrogen GmbH (Darmstadt, DE)
WinPrep	Perkin Elmer (Waltham, USA)

## 4. METHODEN

### 4.1. ZELLKULTUR

#### 4.1.1. KULTIVIERUNG VON ZELLLINIEN

Eukaryotische Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 95 % relativer Luftfeuchte, 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Anzucht erfolgte in hydrophilen Gewebekultur-behandelten Zellkulturschalen von BD Falcon (Franklin Lakes, USA). Den Zellkulturmedien wurde, soweit nicht anders angegeben, 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt.

Zum Passagieren von adhärennten Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (0,05 %/ 0,02 % w/v in PBS) im Brutschrank inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde serumhaltiges Medium hinzugegeben und die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (130 x g, 3 min, RT) und dem Verwerfen des Überstandes vom überschüssigen Trypsin getrennt. Das entstandene Pellett wurde in frischem serumhaltigem Medium aufgenommen und die gewünschte Zellzahl in eine neue Petrischale überführt. Zelllinien, welche in Suspension wachsen (zum Beispiel DU4475), wurden direkt durch die Zentrifugation geerntet. Hier entfiel der Trypsinierungsschritt.

#### 4.1.2. EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLLINIEN

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70 – 90 % durch Trypsinierung geerntet und in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert. Anschließend wurden sie in Kryoröhrchen überführt und mit einem absteigenden Temperaturgradienten (1 °C pro Minute auf -80 °C) mit einem, Isopropanol gefüllten, Einfrierbehälter (Mr. Frosty, Nalgene) eingefroren.

Um eingefrorene Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurden diese schnell bei 37 °C aufgetaut und mit 10 mL vorgewärmtem Medium versetzt. Um das DMSO restlos zu entfernen, schloss sich ein Zentrifugationsschritt an. Das Zellpellett wurde anschließend in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturschale überführt.

#### 4.1.3. KULTIVIERUNG VON HUMANEN PANKREATISCHEN INSELZELLEN

Direkt nach der Ankunft wurde das Transportmedium der humanen pankreatischen Inselzellen (tebu-bio) mit 40 mL PIM(S) Vollmedium [PIM(S) + 1 % PIM(G) + 5 % PIM(ABS)] versetzt, in ein 50 mL Falcon überführt und durch zwei Zentrifugationsschritte (2 min; 180 x g) entfernt. Anschließend wurden die Inseln in RPMI Medium (10 % FCS) aufgenommen. Ca. 30 Inseln/*well* wurden in eine 24-*well* Platte in Zellkulturinserts mit einer Porengröße von 8 µm und einer Polycarbonat Membran (Corning, New York, USA) ausgesät. Die Kultivierung der humanen Inselzellen erfolgte in RPMI und 10 % FCS.

#### 4.1.4. STABILE TRANSFEKTION

24 h vor der Transfektion wurden ca. 200.000 Zellen in eine 6-*well* Zellkulturplatte (2 mL/*well*) ausgesät. Am Tag der Transfektion wurde das serumhaltige Medium entfernt und durch serumfreies Medium ersetzt. Die Transfektion erfolgte mit JetPEI nach Herstelleranweisungen.

Entsprechend des transfizierten Plasmids erfolgte 24 h sowie 48 h nach der Transfektion ein Mediumwechsel mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Durch wöchentliches Wechseln des Mediums mit Beibehaltung des Selektionsantibiotikums wurden tote Zellen entfernt und plasmidtragende Zellen expandiert. Ausgewählte Klone wurden maschinell mit dem Cell-Selector in eine 96-*well* Platte vereinzelt und anschließend mit der entsprechenden Nachweismethode auf die Expression des jeweiligen Gens überprüft.

#### 4.1.5. ISOLATION PANKREATISCHER INSELZELLEN AUS DER MAUS

Die Tötung der Balb/c AnNCrI-Mäuse für die Isolation pankreatischer Inselzellen erfolgte mittels zervikaler Dislokation. Der Gallen-Duct wurde freigelegt und mit einer Arterienklemme am Anfang des Dünndarms abgeklemmt. Umliegendes Gewebe wurde vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Mit einer gebogenen Pinzette wurde der Duct angehoben, eine 30½ G-Kanüle, gefüllt mit 3 mL der Isolationslösung für Mausinseln, eingeführt und die Collagenase-Lösung langsam injiziert. Anschließend wurden Kanüle sowie Klemme entfernt, der angeschwollene Pankreas mittels zwei Pinzetten vorsichtig vom Dünndarm gelöst und in ein Probengefäß (Sarstedt, Nümbrecht, DE) gegeben. Es folgte eine Inkubation für 6-8 min bei 37 °C im Wasserbad bei gelegentlichem schwenken. Um die Reaktion zu stoppen, wurde das Probengefäß sofort auf Eis gestellt

und etwas RPMI (10 % FCS) hinzugegeben. Zur weiteren Vereinzlung der pankreatischen Inseln wurde diese Suspension ca. dreimal mit einer 5 mL Spritze und einer 18 G-Kanüle aufgezogen, durch die Kanüle gepresst und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Hierbei setzten sich pankreatische Inseln als Pellett ab, wobei das Fett oben schwamm und damit abgetrennt wurde. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und verworfen und frisches RPMI (10 % FCS) zu den Inseln hinzugegeben. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit HBSS (mit 25 mM HEPES und 0,5 % BSA) sowie ein Waschschrte mit RPMI (10 % FCS). Zur Entfernung von Geweberesten wurden die Inseln vereinzelt. Das Vereinzeln der Inseln erfolgte in drei Passagen unter einem binokularem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, DE).

#### *4.1.6. ISOLATION PANKREATISCHER INSELZELLEN AUS DEM SCHWEIN*

Für die Isolation pankreatischer Inselzellen aus dem Schwein wurde ein Konsensprotokoll aus drei verschiedenen Publikationen erstellt [166]–[168]. Die gesamte Prozedur erfolgte, soweit nicht anders angegeben, auf Eis.

Die Tötung der Schweine erfolgte unter Isofluran-Inhalationsnarkose mittels intravenöser Injektion von 20 %iger KCl-Lösung (mindestens 5 mL/kg Tiergewicht). Nach der Sektion wurde der Pankreas in 100 mL eiskaltem HBSS mit 20 mg/L Nafamostat Mesylate (Trypsininhibitor) gelegt und mittels Skalpell manuell zerkleinert. Anschließend wurde der Pankreas in einen Erlenmeyerkolben mit Isolationslösung für Schweineinseln sowie 10-15 Glaskugeln (Durchmesser: 20 mm) gegeben und für 10-15 min bei 37 °C und 140 rpm auf einem Schüttler homogenisiert. Das enzymatisch verdaute Gewebe wurde anschließend durch ein Metallsieb passiert, wobei mit 100 mL kalter HBSS (inkl. 10 % FCS) nachgespült wurde. Um die isolierten Inseln vom Fett zu trennen, wurde die Suspension in 50 mL Falcons gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Hierbei setzten sich pankreatische Inseln als Pellett ab, wobei das Fett oben schwamm. Mit einer serologischen Pipette wurden die Inseln vorsichtig aufgenommen und durch ein 70 µm Nylon Zellsieb (BD Falcon, Franklin Lakes, USA) passiert. Anschließend wurden die Inseln auf dem Cell Strainer nacheinander mit 25 mL HBSS (inkl. 10 % FCS) und RPMI gespült und der Durchfluss verworfen. Der Cell Strainer wurde verkehrt herum über eine Zellkulturschale gehalten und die Inselzellen durch Zugabe von RPMI (mit 10 % FCS; 10 mM HEPES; 1 % GlutaMAX; 10 µg/ml Ciprobay) geerntet. Die Schweineinseln wurden vor der RNA-Isolation ca. 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

## 4.2. ZELLULÄRE ASSAYS

### 4.2.1. $Ca^{2+}$ -MOBILISIERUNG

Um die Aktivierung von CMKLR1 mittels  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung funktionell zu untersuchen, musste der Rezeptor an den IP3-Signaltransduktionsweg gekoppelt werden. Dies erfolgte über die zusätzliche Transfektion von  $G\alpha 16$  in die Zielzellen [169], [170].  $G\alpha 16$  ermöglicht die Stimulation der Phospholipase C, welche wiederum IP3 aktiviert. IP3 bindet an Kalziumkanälen des Endoplasmatischen Retikulums, was zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration führt. Die Detektion dieses Kalziuminfluxes erfolgt hierbei über den kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 AM (Invitrogen), welcher Kalzium chelatiert und fluriometrisch gemessen werden kann.

Hierfür wurden 40.000 Zellen/well auf Poly-D-Lysin beschichtete optische 96-well Platten (Microtest, BD Falcon) ausgesät, wobei die Zellen am Tag des Assays eine Konfluenz von ca. 80-90 % aufweisen sollten. Zunächst wurde das serumhaltige Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht (1-2 h; 37 °C) und anschließend die Zellen mit serumfreiem Medium und 2  $\mu$ M Fluo-4 AM und 2,5  $\mu$ M Probenecid für 45 min bei 37 °C beladen. Überschüssiges Fluo-4 AM wurde durch drei Waschschriffe mit C1-Puffer, gefolgt von weiteren drei Waschschriffen nach einer 20-minütigen Inkubation (im Dunklen bei RT), entfernt. Die Liganden wurden in C1-Puffer mit 1 % BSA in einer 96-well Platte verdünnt und gemeinsam mit der Zellplatte in den CellLux Imager transferiert. Die Applikation der Liganden erfolgte automatisiert und die Gesamtmesszeit pro Platte betrug 120 s. Die Vermessung erfolgte mit einem 485 nm Anregungsfilter und einem 535 nm Emissionsfilter. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels AssayPro-Software von Perkin Elmer. Bei der Auswertung wurden die erhaltenen maximalen Fluoreszenzwerte nach Ligandenapplikation (F) auf die jeweiligen Baseline-Fluoreszenzwerte ( $F_0$ ) vor Applikation normiert:

$$Ca^{2+} \text{ Reaktion} = \frac{\Delta F}{F_0} = \frac{(F - F_0)}{F_0}$$

**Formel 1: Berechnung der Kalziumreaktion.** F: maximale Fluoreszenzwerte nach Ligandenapplikation.  $F_0$ : Baseline-Fluoreszenzwerte vor Applikation.

Das Kurvenfitting zur Berechnung der  $EC_{50}$ -Werte kann dem Kapitel 4.8 entnommen werden.

#### 4.2.2. INTERNALISIERUNGSASSAY (EGFP-TRANSLOKATION)

Durch die C-terminale Fusion von EGFP an den GPCR kann die Internalisierung durch Liganden visualisiert werden. Der membranständige EGFP-markierte Rezeptor wird nach Stimulation des GPCRs durch einen Agonisten in Vesikel transloziert.

Dieser Assay wurde mit einem automatisierten Mikroskop (IN Cell Analyzer 1000, GE Healthcare) durchgeführt. Die anschließende Quantifizierung der Vesikel erfolgte mit einer Software, wodurch die Potenz ( $EC_{50}$ -Wert) eines Liganden am GPCR berechnet werden konnte.

Hierfür wurden 20.000 Zellen/well auf Poly-D-Lysin beschichtete 96-well Zellkulturplatten ausgesät, wobei die Zellen am Tag des Assays eine Konfluenz von ca. 40-50 % aufweisen sollten. Zur Vermeidung von Serumeffekten wurden die Zellen vor der Ligandenzugabe in serumfreies RPMI-Medium überführt (1-2 h; 37 °C). Die Verdünnung der Liganden erfolgte in RPMI 1640 (1x Medium mit 20 mM HEPES und 0,1 % BSA). Nach der Entfernung des Mediums, wurden je well 50  $\mu$ L der Ligandenlösung hinzugegeben und die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert (10 min bei RT), mit 0,1 % TritonX-100 permeabilisiert sowie die Zellkerne mit DAPI (0,25  $\mu$ g/ml) angefärbt. Zuletzt erfolgte ein Waschschriff mit PBS. Pro well wurden vier Bilder mit einem 20x Objektiv aufgenommen. Die verwendeten Belichtungszeiten betragen dabei 600 ms für DAPI und 800 ms für das EGFP. Die Bildanalyse erfolgt anschließend mit der IN Cell Investigator Software (GE Healthcare) im *Multi Target Analysis* Algorithmus (*granule size min.*: 0.2  $\mu$ M; *granule size max.*: 1  $\mu$ M; *scales*: 3; *sensitivity granules*: 55; *min. nucleus area*: 50  $\mu$ m<sup>2</sup>; *sensitivity nucleus*: 100; *collar radius*: 6-10). Das Ergebnis wurde als Vesikelanzahl/Zelle ausgegeben. Da der Rezeptor eine basale Internalisierung zeigte, wurden die gezählten Vesikel auf diesen Wert normalisiert (=1).

#### 4.2.3. STIMULATIONSASSAY MIT PANKREATISCHEN NAGERZELLINIEN

Die Zellaussaat zur Messung der Glucagon- und Insulinsekretion pankreatischer Zelllinien ( $\alpha$ TC1,  $\beta$ TC3, Ins1, INR, Min6) nach Substanzapplikation erfolgte in 24-well Zellkulturplatten in zelllinien-spezifischen Medium. Am Tag des Assays waren die Zellen ca. 60-90 % konfluent. Das Medium wurde durch Stimulationsmedium ausgetauscht. Hierfür wurden die zu analysierenden Stimulanzien in RPMI oder KRBH (mit je 0,5 % BSA) und unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (1 mM; 5,6 mM oder 25 mM Glukose) verdünnt. Nach 1 h bis 3 h wurden die Überstände geerntet und der Insulin- sowie Glucagongehalt mittels ELISA bestimmt.

#### 4.2.4. STIMULATIONSSASSAY MIT HUMANEN INSELZELLEN

Zur Stimulation der Insulin- bzw. Glucagonsekretion erfolgte die Aussaat humaner pankreatischer Inselzellen (tebu-bio) in einer 24-*well* Platte mit Zellkulturinserts (Corning, New York, USA) (ca. 30 Inseln/*well*). 24 h nach Ankunft der Inseln wurden die Inserts in eine leere 24-*well* Platte gesetzt, um vorhandenes Medium abfließen zu lassen. Dieser Vorgang erfolgte zwischen jedem Medium/Pufferwechsel durchgeführt. Anschließend wurden die Inserts in eine vorbereitete 24-*well* Platte mit KRBH (5,6 mM Glucose; 700  $\mu$ L/*well*) gesetzt und 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die hierbei entstandenen Überstände dienten für die Ermittlung der basalen Hormonsekretion. Die Stimulation der Inseln mit den Liganden erfolgte in KRBH mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (1 mM; 5,6 mM oder 25 mM Glukose) für 1 h bei 37 °C. Die jeweiligen Glukosekonzentrationen ohne Ligand stellten die Negativkontrollen dar. Nach der Stimulation wurden die Inseln in RPMI (10% FCS) weiterkultiviert, wobei nach einer Erholungsphase von mindestens 48 h eine erneute Stimulation erfolgte. Die Inseln wurden maximal sechsmal stimuliert. Bei wiederholten Stimulationen erfolgte eine Veränderung des Plattenlayouts, so dass individuelle Inseleffekte ausgeschlossen waren und die Inseln bei jeder Stimulation mit wechselnden Substanzen behandelt wurden.

Die Bestimmung der Insulin- sowie Glucagongehalte (basal sowie stimuliert) erfolgte mittels ELISA. Für die Auswertung wurde der Hormongehalt des Überstandes, welcher aus der Stimulation resultierte, von jedem *well* auf den zugehörigen basalen Wert (gleiches *well* und somit gleiche Inseln) normalisiert (Formel 2). Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass Schwankungen, welche durch die Diversität der Inseln (Größe, Vitalität, Anteil von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen) zustande kommen, ausgeglichen werden.

$$\text{relative Hormonsekretion} = \frac{\text{Stimulationswert}}{\text{basaler Wert}} * 100\%$$

**Formel 2:** Relative Hormonsekretion normalisiert auf die tagbezogene basale Glucagon- bzw. Insulinausschüttung [%].

#### 4.2.5. MIGRATIONSSASSAY

Für den Migrationsassay wurden MDA-MB-231-Zellen verwendet. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen in Medium aufgenommen und mittels Neubauer Zählkammer gezählt. Die zu analysierenden chemoattraktiven Substanzen wurden in 500  $\mu$ L/*well* RPMI (10 % FCS) verdünnt und in eine 24-*well* Platte vorgelegt. Anschließend wurde ein Zellkulturinsert mit einer Porengröße von 8  $\mu$ m (Corning, New York, USA) in die *wells* gestellt und  $1 \times 10^5$  Zellen in 200  $\mu$ L/*well* einge-

sät. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 6 h. Hierbei sollten die Zellen durch die Membran migrieren. Nach 6 h wurde das Insert vorsichtig herausgenommen und die migrierten Zellen für 10 min mit 4 % Formalin (Herbeta, Berlin, DE) fixiert und anschließend mit 1,8 µM DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 0,1% Triton in PBS für 10 min gefärbt. Die Fluoreszenz der Zellkerne wurde mit dem Observer Z1 Zeiss Mikroskop gemessen. Die quantitative Auswertung und die Zählung der migrierten Zellen erfolgte mittels ImageJ.

#### 4.2.6. PROLIFERATIONSASSAY

Mit diesem Test soll der Einfluss der Liganden auf die Proliferation der Zellen bestimmt werden. Zur Messung der Proliferation der Zellen wurde der Zellvitalitätsindikator AlamarBlue (Invitrogen) verwendet. In vitalen Zellen wird der Farbstoff Resazurin zu dem fluoreszierenden Farbstoff Resorufin reduziert, der spektrometrisch bestimmt werden kann.

Hierfür wurden 6.000 Zellen/*well* in 200 µL Medium mit dem entsprechenden Liganden und unterschiedlichen FCS-Konzentrationen als Positiv- beziehungsweise Negativkontrollen in 96-*well* Zellkulturplatten ausgesät. Als *blank*-Wert diente Medium ohne Zellen. Nach 24 h erfolgte ein partieller Mediumwechsel, d.h. es wurden 100 µL Medium abgenommen und im Anschluss 100 µL Medium mit FCS und dem entsprechenden Liganden in doppelter Konzentration hinzugegeben. Dieser Schritt wurde 72 h nach Zellaussaat wiederholt. Am fünften Tag wurden 100 µL Medium abgenommen, durch 100 µL 1:5 verdünntes AlamarBlue-Reagenz (Invitrogen) ersetzt (finale Verdünnung 1:10) und 1-4 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Messung erfolgte am EnVision 2103 Multilabel Reader bei einer Anregung von 495 nm und einer Emission von 572 nm.

### 4.3. RADIOAKTIVE BINDUNGSSTUDIEN

#### 4.3.1. IODIERUNG VON PEPTIDEN

Für die Iodierung von Tyrosinresten in Peptiden wurde die Chloramin-T-Methode [171] verwendet. Dabei oxidiert Chloramin-T  $^{125}\text{I}^-$  zu  $^{125}\text{I}^+$ , welches mit der anionischen Form des Tyrosins zu  $^{125}\text{I}$ -Tyrosin reagiert.

In einem Reaktionsgefäß wurden 10 nmol Peptid in 25 µL Phosphatpuffer (500 mM; pH 7,4) und radioaktives Iod ( $\text{Na}^{125}\text{I}$ ; 1 mCi) gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 µL Chlora-

min-T Lösung (1 mg/mL). Nach Schütteln des Ansatzes für ca. 15-30 s wurde die Reaktion durch die Zugabe von 4  $\mu$ L Metabisulfit (2 mg/mL) gestoppt.

Der gesamte Reaktionsansatz wurde in ein HPLC Probengefäß übertragen. Die Trennung von markiertem und unmarkiertem Peptid erfolgte mit Hilfe einer ZORBAX 300Extend-C18-Säule (Agilent) unter Verwendung eines Acetonitrilgradienten (von 25 % bis 40 %; mit 0,1 % TFA gegen Wasser bei einem Durchfluss von 1 mL/min über einen Zeitraum von 10 min. Die Produkte wurden mit dem Radioaktivdetektor (FlowStar LB 513) detektiert und anschließend fraktioniert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte im  $\gamma$ -Detektor (Wallac Wizard 1470).

Die Iodierung der Peptide wurde freundlicherweise von Sarah Erdmann durchgeführt.

#### 4.3.2. MEMBRANISOLATION AUS ZELLEN

Für die Präparation von Zellmembranen aus Monolayer Zellkulturen wurden die entsprechenden Zelllinien auf 4-6 15 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit vorgewärmtem PBS (pH 7,4) gewaschen und mit eiskaltem PBS (pH 7,4) mit 5 mM EGTA sowie einem Zell-Schaber (BD Falcon) abgelöst.

Für die Präparation von Zellmembranen aus Geweben wurden die Gewebe zunächst mit einem Hammer grob zerkleinert und anschließend in eiskaltem PBS (pH 7,4) mit 5 mM EGTA mit einem Ultra-Turrax T8-System (IKA®-Werke GmbH & Co. KG) homogenisiert.

Das Zell- oder Gewebe-Homogenat wurde anschließend für 10 min (4 °C, 200 x g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 5 mL Membran-Isolations-Puffer, erfolgte das Aufbrechen der Zellen in einem „Douncer“ durch ca. 30-maliges auf und ab bewegen des Kolben. Das Lysat wurde in einer Sorval Ultrazentrifuge für 30 min bei 4 °C und 40.000 g sedimentiert und das Pellett ein weiteres Mal in 5 mL Membran-Isolations-Puffer aufgenommen und im Douncer homogenisiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt in der Sorval Ultrazentrifuge wurde die isolierte Membran in ca. 1 mL Membran-Isolations-Puffer resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C und die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Kapitel 4.6.2).

#### 4.3.3. RADIOAKTIVER BINDUNGSASSAY

Zum Nachweis der spezifischen Bindung von Peptidliganden an den Rezeptor wurden Bindungsstudien mit <sup>125</sup>Iod-markierten Peptiden durchgeführt. Die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte unmarkierter Peptidvarianten resultierte durch kompetitive Bindungsstudien. Dabei erfolgt eine

Verdrängung des  $^{125}\text{I}$ -markierten Chemerin-9-Peptids durch entsprechende unmarkierte Liganden.

Hierfür wurden 5  $\mu\text{g}$  der isolierten Membranen (Kapitel 4.3.2) in 25  $\mu\text{L}$  Membran-Bindungs-Puffer aufgenommen, unterschiedliche Konzentrationen des unmarkierten Peptids zugegeben, mit 100.000 cpm/well des radioaktiv markierten Peptids versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in MultiScreen<sub>HTS</sub> 96-well Filterplatten (Porengröße: 1  $\mu\text{m}$ ; Glasfaser; Millipore, Billerica, USA) übertragen.

Mit Hilfe einer Vakuumstation (Millipore, Multiscreen<sub>HTS</sub>) wurde ungebundenes Peptid abgesaugt und die Platten viermal mit 4 °C Radioaktiv-Wasch-Puffer (100  $\mu\text{L}$ /well) gewaschen. Nach Trocknung der Platten und Zugabe von 40  $\mu\text{L}$  Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold F, Perkin Elmer) pro well wurde die Platte in einem MicroBeta2 Scintillator vermessen. Das Kurvenfitting zur Berechnung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte kann dem Kapitel 4.8 entnommen werden.

Der radioaktive Bindungsassay wurde freundlicherweise von Sarah Erdmann durchgeführt.

## 4.4. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

### 4.4.1. POLYMERASEKETTENREAKTION – PCR

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde das Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit (Finnzymes Reagents) verwendet. Die PCR wurde nach Protokoll des Herstellers mit den in Kapitel 3.6.2 beschriebenen Primern durchgeführt.

### 4.4.2. RESTRIKTION UND LIGATION VON DNA

Enzyme für die Ligation und Restriktion sowie die entsprechenden Puffer wurden von New England Biolabs bezogen. Die Reaktionsbedingungen wurden der Homepage des Herstellers entnommen (Kapitel 3.2.3).

### 4.4.3. ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG VON DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Plasmidverdau, PCR-Amplifizierung oder qPCR erfolgte mittels Gelelektrophorese. Hierfür wurde ein 1-2 %iges Gel aus Agarose (Serva, Heidel-

berg, DE), 1x TAE Puffer sowie 0,8 µg/mL Ethidiumbromid hergestellt. Die Proben wurden in Probenpuffer verdünnt, bei 80 V für 30-60 min elektrophoretisch in 1x TAE-Puffer aufgetrennt und mittels GeneFlash (Syngene) unter UV-Licht visualisiert.

#### 4.4.4. HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER *ESCHERICHIA COLI*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen wurden *E. coli* des Typs TOP10 (Invitrogen) verwendet. Diese wurden ü.N. bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) in LB-Medium angezogen. Am nächsten Tag wurden 250 mL 2x YT-Medium mit 1 mL Kultur angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,3-0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C, 3000 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellett vorsichtig in 80 mL eiskaltem CCMB80-Puffer gelöst. Es folgte eine Inkubation der Suspension für 20 min auf Eis. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 10 mL CCMB80-Puffer resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 4.4.5. TRANSFORMATION VON *ESCHERICHIA COLI* MITTELS HITZESCHOCKMETHODE

Für die Transformation wurden chemisch kompetente Top10 Zellen verwendet. Diese wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit dem entsprechenden Plasmid (1 ng pro 50 µL TOP10) für 30 min inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 60 s bei 42 °C und eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 500 µL SOC-Medium hinzugegeben und die Bakterien für 1 h bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und üN bei 37 °C kultiviert.

#### 4.4.6. PRÄPARATION VON PLASMID-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) beziehungsweise mittels NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) für *large scale* Anwendungen nach Herstellerprotokoll.

#### 4.4.7. RNA-ISOLATION

Die Präparation von RNA für qPCR-Experimente erfolgte für Gewebe mittels RiboPure Kit (Ambion), für Zelllinien mittels RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) beziehungsweise für pankreatische Inselzellen mittels RNAqueous-Micro Kit (Ambion) jeweils nach Angaben der Hersteller.

#### 4.4.8. REVERSE-TRANSKRIPTASE-REAKTION (RT)

Isolierte RNA wurde mittels *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 3,2 µg RNA in 80 µL cDNA (finale Konzentration: 40 ng/µL) nach dem Herstellerprotokoll transkribiert. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle für jede Probe ein Ansatz ohne reverse Transkriptase in der qPCR analysiert.

#### 4.4.9. QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit dem Bio-Rad CFX96 Real-Time-System durchgeführt. Hierfür wurde 30 ng cDNA eingesetzt. Primer-Probe-Sets für TaqMan-Amplifizierungen wurden von der Firma Life Technologies bezogen. Hierbei waren die *Housekeeping* Gene als endogene Kontrollen mit dem Farbstoff VIC und die zu analysierenden Gene mit FAM markiert (Kapitel 3.6.1). Für TaqMan-Anwendungen wurde das Fast Start TaqMan® Probe Master Kit (Roche) und für SybrGreen Experimente der Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Primer und Primer-*Probe*-Sets können dem Kapitel 3.6.1 entnommen werden. Ein Ansatz setzt sich zusammen aus:

**Tab. 17: Ansätze für die quantitative Real-Time PCR.** fwd: *forward* Primer. rev: *reverse* Primer.

	Konzentration der Stocklösung	Volumen	Endkonzentration
Master Mix	5 x	5 µL	1 x
Primer fwd (Sybr.Green) bzw. TaqMan Probe Referenzgen	10 µM	0,5 µL	0,5 µM
Primer rev (Sybr.Green) bzw. TaqMan Probe Referenzgen	20 x	0,5 µL	1 x
cDNA	10 µM	0,5 µL	0,5 µM
	20 x	0,5 µL	1 x
	40 ng/µL	0,75 µL	30 ng/µL
Wasser (nukleasefrei)	-	ad 10 µL	-

Die Chemikalien wurden in Triplikaten auf Eis in *Hard-Shell Low-Profile Thin-Wall 96-well Skirted* PCR Platten (Bio-Rad) pipettiert und mittels *Microseal 'B' Adhesive Optical Seal* (Bio-Rad) abgedichtet. Die Platten wurden anzenrifugiert und im Bio-Rad CFX96 Real-Time-System amplifiziert. Entsprechende Einstellungen wurden für TaqMan-Experimente genutzt:

Tab. 18: Temperaturverlauf für die qPCR mittels TaqMan-Sonden.

Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	-
Amplifizierung	95 °C	10 s	45 x
	60 °C	1 min Messung	
	72 °C	1 s	
Kühlung	40 °C	30 s	-

Für SybrGreen-Primer wurde das folgende Protokoll verwendet:

Tab. 19: Temperaturverlauf für die qPCR mittels SybrGreen-Sonden.

Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklus
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	-
Amplifizierung	98 °C	2 s	45 x
	60 °C	5 s Messung	
Schmelzkurve	65 → 95 °C	10 s/0,5 °C Messung	-

Um eine optimale Normalisierung zu gewährleisten, wurden für humane und Schweineproben verschiedene Referenzgene mittels qBase PLUS und der GeNorm-Funktion auf ihre Expressionsstabilität analysiert. Für die Auswertung wurden ausschließlich Referenzgene mit einem geNorm „M“-Wert kleiner als 1 verwendet [172].

Die Auswertung erfolgte mittels qBase PLUS nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Wurden mehrere Referenzgene in die Normalisierung einbezogen, so wurde zunächst das geometrische Mittel der relativen *Housekeeping*-Expression ermittelt und anschließend dieser Wert zur Normalisierung der *Target*-Gen-Expression verwendet. Anschließend wurden diese Daten auf einen  $cq$ -Wert von 34 normalisiert (entspricht der 1-fachen Expression). Dieser  $cq$ -Wert wurde gewählt, da erfahrungsgemäß bei  $cq$ -Werten über 34 von einer funktionell relevanten Protein-Expression ausgegangen

werden kann. Somit sind alle Zelllinien über 1 als potentiell positiv anzusehen. Hieraus ergibt sich folgende Tabelle:

Tab. 20: Übersicht zur Normalisierung der qPCR-Ergebnisse auf den cq-Wert 34.

Expression (x-fach)	0,015	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	<b>1</b>	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192
cq-Wert	40	39	38	37	36	35	<b>34</b>	33	32	31	30	29	28	27	26	25	24	23	22	21

#### 4.4.10. SEQUENZIERUNG NACH SANGER

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte bei LGC Genomics (Berlin, DE). Hierfür wurden 1 µg DNA und 3,5 pmol spezifische Primer in 12 µL Wasser verdünnt und LGC Genomics zur Analyse übersendet.

### 4.5. IMMUNHISTOCHEMISCHE METHODEN

#### 4.5.1. IMMUNFLUORESCENZ AN ZELLINIEN

Zur Lokalisation von Proteinen kann die Immunfluoreszenzanalyse genutzt werden. Hierbei bindet ein Antikörper spezifisch an das Zielprotein. Dieser Erstantikörper wird mit einem weiteren, Fluoreszenz-markierten Zweitantikörper detektiert.

Für den Nachweis von Rezeptoren mittels Immunfloreszenz auf Zelllinien wurden die Zellen auf Deckgläser (Ø 12 mm; R. Langenbrinck, Emmendingen, DE) am Tag vor der Färbung ausgesät. Nach einem Waschschrift in PBS erfolgte die Fixierung für 20 min mit 4 % gepuffertem Formalin in H<sub>2</sub>O (Herbeta, Berlin, DE). Nach drei weiteren Waschschriften (5 min) mit Wasser wurden die Zellmembranen mit 0,1 % Triton X-100 sowie 3 % BSA in PBS (1 h) permeabilisiert und freie Proteinbindstellen blockiert. Die sich anschließende Primärantikörper-Inkubation (verdünnt in 0,1 % Triton X-100 sowie 1 % BSA in PBS) erfolgte für 1 h in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach drei Waschschriften (0,1 % Triton in PBS) erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Cy-2 oder Cy-3, verdünnt in 0,1 % Triton X-100 sowie 1 % BSA in PBS) in einer feuchten Kammer im Dunkeln (1 h, RT). Zwei Waschschriften mit 0,1 % Triton X-100

in PBS sowie ein Waschschrift in Wasser schlossen sich an. Die Deckgläschen wurden bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit Immu-Mount (Thermo Scientific) auf Objektträger eingedeckelt. Die Auswertung der Objektträger-Präparate wurde mit einem konfokalem Lasermikroskop (LSM510, Zeiss) durchgeführt.

#### 4.5.2. IMMUNFLUORESZENZ AN KRYO-GEWEBESCHNITTEN

Die Gewebe wurden nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Humane Inselzellen wurden für histologische Untersuchungen zunächst zentrifugiert (2 min; 250 x g), in 30 µL PBS resuspendiert und anschließend in eine Einfrierform gegeben. Nach Zugabe von Tissue-Tek O.C.T Compound wurde die Einfrierform auf Trockeneis gestellt und durchgefroren. Proben des *Breast Tissue Arrays* wurden direkt fixiert.

Für die Lokalisation von Rezeptoren mittels Immunfloreszenz wurde das gefrorene Gewebe oder die gefrorenen Inseln in einem Kryostat auf -30 °C temperiert, in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance, USA) eingebettet, geschnitten (Dicke: 12-18 µm) und auf Objektträger (Superfrost) übertragen. Nach der Trocknung (1-3 h, RT) wurden die Gewebeschnitte bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Am Tag der Färbung wurden die Sschnitte mit Methanol/Aceton (1:1) für 2 min fixiert und anschließend luftgetrocknet. Nach der Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift (Dako, Glostrup, DK) wurden die Objektträger zweimal mit PBS für 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Zellmembranen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS (10 min) permeabilisiert und freie Proteinbindestellen mit 2 % Magermilchpulver (*blotting grade*, Bio-Rad) in PBS für 30 min blockiert. Nach zwei weiteren Waschschriften mit PBS erfolgte die Primärantikörper-Inkubation (verdünnt in 1 % BSA in PBS) über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4 °C. Nach vier Waschschriften (je 5 min in PBS) folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (verdünnt in 1 % BSA in PBS) in einer feuchten Kammer im Dunkeln (1 h, RT). Zwei Waschschriften mit TBS, sowie eine Kernfärbung mit SytoxOrange (1 µM in TBS, Life Technologies) für 2 min schlossen sich an. Nach zwei weiteren Waschschriften (je 5 min in TBS) wurden die Kryoschnitte mit 96 % Ethanol final fixiert (2 min), bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet und mit Immu-Mount (Thermo Scientific) eingedeckelt. Mikroskopiert wurden die Objektträger-Präparate mit einem konfokalen Lasermikroskop (LSM510, Zeiss).

## 4.6. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

### 4.6.1. HERSTELLUNG VON PROTEINLYSATEN AUS ZELLEN

Die Lyse von Zellen erfolgte auf Eis. Hierfür wurden 80-90 % konfluente Zellen zunächst kurz mit kaltem PBS gewaschen, mit Lysis-Puffer lysiert (1-2 min) und mit einem Zell-Schaber (BD Falcon) von der Zellkulturschale gelöst. Das Lysat wurde zur Homogenisierung in eine QIAshredder-Säule überführt und für 1 min bei 25.000 x g zentrifugiert. Das Proteinlysate wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch einen BCA-Assay (Kapitel 4.6.2).

### 4.6.2. QUANTIFIZIERUNG VON PROTEINEN

Die Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde mittels Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA), von isolierten Membranproteinen mittels Bradford-Reagenz (Bio-RAD Proteinassay) nach Angaben der Hersteller bestimmt. Die Messung erfolgte im Spectra max Plus 384 bei 562 nm (BCA-Assay) bzw. 595 nm (Bradford-Assay). Die Konzentration wurde anhand der Standardkurve durch die SoftMax Pro 5.3 Software berechnet.

### 4.6.3. SDS-PAGE

Die Proteine wurden in SDS-Polyacrylamidgelen (Tab. 21) mit dem Tris-Tricine-Puffersystem im Mini-PROTEAN-System (Bio-Rad) elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Proben wurden in SDS-PAGE Probenpuffer verdünnt und 6-10 µg Protein pro Spur aufgetragen. Als Proteingrößenmarker dienten der Kaleidoscope Prestained Standard (Bio-Rad) beziehungsweise der Kaleidoscope Precision Plus Protein (Bio-Rad). Die Elektrophorese erfolgte für 10 min bei 80 V und anschließend für ca. 1 h bei 120 V.

Tab. 21: Bestandteile des Sammel- und Trenngels für die SDS-PAGE.

	Endkonzentration
<b>Sammelgel:</b>	
Polyacrylamid (Acrylamide/Bisacrylamide 29:1)	4 % (v/v)
SDS	0,1% (w/v)
Tris-HCl pH 8,45	0,72 M
APS	0,1 %
TEMED	0,089 %
Wasser (bidest)	-
<b>Trenngel:</b>	
Polyacrylamid (Acrylamide/Bisacrylamide 29:1)	10 % (v/v)
SDS	0,1% (w/v)
Tris-HCl pH 8,45	1 M
APS	0,1 %
TEMED	0,089 %
Wasser (bidest)	-

#### 4.6.4. COOMASSIE-FÄRBUNG

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine, wurden die Gele nach der SDS-PAGE (Kapitel 4.6.3) kurz in Wasser gelegt, anschließend für 3 min in Coomassie-Fixierlösung sowie für 30 min in Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Nach einer erneuten dreiminütigen Inkubation in Coomassie-Fixierlösung wurden die Gele zur Visualisierung der Proteinbanden über Nacht in Wasser von überschüssigem Farbstoff befreit.

#### 4.6.5. WESTERN BLOTTING

Die Detektion von Proteinen erfolgte mittels Western-Blot im *Semi-dry*-Verfahren auf Nitrozellulosemembranen. Hierfür wurde das Gel aus Kapitel 4.6.3 zunächst in K-Puffer und die Membranen sowie Filter in die unten aufgeführten Puffer gelegt. Der Blot wurde in folgenden Schichten angeordnet (von unten [= Anode] nach oben [= Kathode]) und direkt in die Apparatur (TRANS-BLOT SD; Bio-Rad) gelegt: zwei Filter in AI-Puffer, ein Filter in AII-Puffer, Nitrozellulosemembran (Whatmann 0,45 µm Protan BA 85, GE Healthcare, Waukesha, USA) in AII-Puffer, Gel in K-Puffer und zwei Membranen in K-Puffer. Ein konstantes elektrisches Feld mit 3 mA/cm<sup>2</sup> wurde für 1 h angelegt und die Membran nach dem Transfer in 5 % in PBS-T (PBST-M; 1 h, RT) geblockt. Die Primärantikörper wurden in PBST-M verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend

wurde die Membran dreimal intensiv (mindestens 5 min) mit PBS-T gewaschen und mit dem Peroxidase-markiertem Sekundäantikörper (verdünnt in PBST-M) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschrte mit PBS-T. Für die Detektion wurde das ECL West Dura-Kit (Pierce, Rockford, USA) verwendet, wobei die Messung der Chemolumineszenz mit dem VersaDoc *Imaging* System (BIO-RAD) und die Auswertung densitometrisch erfolgte. Für die Detektion eines zweiten Proteins auf dem gleichen Blot (z.B. GAPDH als *Housekeeping*), wurden die zuvor gebundenen Antikörper der ersten Analyse durch die Inkubation mit *Stripping*-Puffer (30 min) von ihren Bindestellen entfernt. Nach zwei intensiven Waschschrten mit PBS-T erfolgte die Blockierung mit PBST-M (1 h, RT). Die folgenden Schritte sind identisch zur ersten Protein-Detektion.

#### 4.6.6. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY - ELISA

Zum Nachweis von Insulin, Glucagon oder Chemerin in Zellkulturüberständen (Kapitel 4.2.3 bzw. 4.2.4) wurden speziesspezifische ELISA-Kits der Firma DRG Instruments (Marburg, DE) verwendet (3.2.3).

Der ELISA erfolgte nach Herstellerprotokoll mit den mitgelieferten Standards. Verwendet wurden für den Chemerin bzw. Glucagon ELISA MaxiSorp 96-*well* Platten (Nunc, Thermo Fisher Scientific) und die im Kit beiliegende 96-*well* Platten für den Insulin ELISA. Die Messung erfolgte im Spectra max Plus 384 bei 650 nm (vor Zugabe der Stopplösung) oder 450 nm (nach Zugabe der Stopplösung). Die Konzentrationsbestimmung wurde anhand der Standardkurve mittels SoftMax Pro 5.3 durchgeführt.

### 4.7. TIEREXPERIMENTELLES ARBEITEN

#### 4.7.1. INOKULATION VON TUMOREN

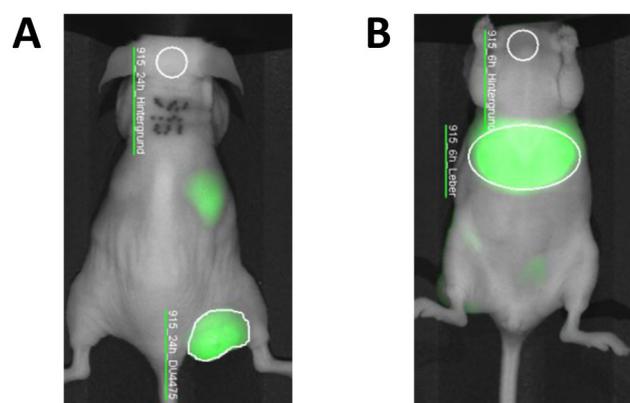
Zur Inokulation der Tumore wurden den Mäusen Zellsuspensionen aus Tumorzelllinien subkutan in die rechte und/oder linke Flanke injiziert. Hierfür wurden die Zellen zunächst trypsiniert, auf eine Zellzahl von 5 Mio Zellen/50  $\mu$ L (DU4475) bzw. 10 Mio Zellen/50  $\mu$ L (SW13) in 0,9 % isotoni-scher NaCl-Lösung verdünnt. Bis zur Inokulation standen die Zellen auf Eis. Kurz vor der Injektion wurde die Zellsuspension 1:1 (v/v) mit Matrigel (Basement Membrane Matrix High Concentration, Corning) versetzt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension subkutan in die Flanke einer athy-mischen RjOrl:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup> Nacktmaus (Charles River) injiziert. Den Mäusen wurden, soweit möglich, zwei Tumore mit jeweils einer Rezeptor-exprimierenden DU4475 und einer ne-

gativen Tumorzelllinie (SW13), bei welcher der Rezeptor nicht nachgewiesen wurde, in die Flanken gesetzt. Das Anwachsen dauert erfahrungsgemäß mehrere Wochen. Die Kontrolle der Mäuse erfolgt alle zwei bis drei Tage.

#### 4.7.2. KLEINTIERBILDGEBUNG – NAH-INFRAROTFLUORESZENZ (NIRF) BILDGEBUNG

In der Kleintierbildgebung wurden verschiedene Chemerin-Peptid-Derivate mit unterschiedlichen Spacern an ein Farbstoffmolekül (ITCC) als Kontrastmittel (Kapitel 3.2.4) gekoppelt und dieses Konjugat *in vivo* an tumortragenden NMRI-Nacktmäusen (nu/nu) getestet.

Die Applikation erfolgte intravenös über die Schwanzvene (1 nmol in 100 µL 0,9 % NaCl pro Maus). Die Maus wurde während der Bildgebung durch Isofluran (inhalativ mittels *Gas Anesthesia System*, Xenogen Bioscience, USA) narkotisiert und während der Messung in der Messapparatur bei 38 °C gewärmt. Die NIRF-Bildgebung wurde durch das *Imaging*-System der Firma Licor (Pearl Imager) realisiert. Zur Visualisierung von Verteilung und Anreicherung der Konjugate in den Organen sowie im Tumor wurde das Fluoreszenzsignal jeder Maus sowohl dorsal als auch ventral nach verschiedenen Zeitpunkten (vor der Injektion; 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h und 48 h post-Injektion) gemessen (Extinktion: 785 nm; Emission: 820 nm). Die quantitative Auswertung der detektierten Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem Programm Pearl Cam Software 2.9 (Abb. 12). Bei der Auswertung wurde anschließend ein Quotient (*Ratio*) aus dem Fluoreszenzsignal von Tumor und Hintergrundsignal (Nackenregion des Tieres) errechnet. Die Software ermittelt stets die absolute Intensität des Fluoreszenzsignals in einem vorher definierten Bereich. Zur visuellen Abschätzung der Signale konnte die Sensitivität (*gain*) variiert werden. Dies dient nur zur optischen Beurteilung und hat auf die quantitative Auswertung keinen Einfluss.



**Abb. 12: Auswertung der Fluoreszenzsignale.** Die zu analysierenden Bereiche wurden mittels Auswahlwerkzeug markiert und die resultierten Fluoreszenzsignale automatisch über die Software ermittelt. Hierfür wurde ein Bereich in der Nackenregion des Tieres als Hintergrund definiert, dessen Fluoreszenzsignal von dem Tumor- bzw. Lebersignal abgezogen wird. **A:** Dorsale Ansicht, Markierung des Tumors. **B:** Ventrale Ansicht, Markierung der Leber.

Nach Möglichkeit erfolgte als Negativkontrolle ein zweites *Imaging* am selben Tier mit dem zugehörigen *scrambled*-Peptid-Konjugat (Aminosäurereihenfolge des spezifischen Peptides war randomisiert, der jeweilige Linker war identisch), um eine unspezifische Aufnahme des Liganden in den Tumor visualisieren zu können. Die zeitliche Reihenfolge der Applikation der positiven bzw. negativen Konjugate erfolgte zufällig.

#### 4.8. KURVENFITTING FÜR DIE BERECHNUNG VON IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>-WERTEN

Für die Berechnung von IC<sub>50</sub> (Kapitel 4.3.3) oder EC<sub>50</sub> Werten (Kapitel 4.2.1 und 4.2.2) wurde eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt. Der Kurvenfit wurde in GraphPad Prism 5 mit einem Vier-Parameter-Fit erzeugt:

$$Y = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + 10^{LogEC_{50} - x}} * HillSlope$$

**Formel 3:** Gleichung für das Kurvenfitting (4-Parameter).

#### 4.9. STATISTIK

Alle Daten sind, wenn nicht anders beschrieben, als Mittelwerte ± Standardabweichung ( $\mu \pm SD$ ) beziehungsweise als Mittelwerte ± Standardfehler ( $\mu \pm SEM$ ) angegeben. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde, wenn nicht anders angegeben, ein ANOVA-Test mit einem Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  (95 % Konfidenzintervall) durchgeführt. Bei der Untersuchung des Einflusses einer unabhängigen Variable wurde hier die einfaktorielle ANOVA (1-way ANOVA) beziehungsweise für die Untersuchung von Effekten zweier unabhängiger Größen auf eine abhängige Variable wurde die zweifaktorielle ANOVA (2-way ANOVA) angewendet. Als Post-hoc-Test wurde Bonferroni benutzt.

Als statistisch signifikant wurden Werte mit  $p < 0,05$  akzeptiert, wobei die Signifikanzwerte (Irrtumswahrscheinlichkeiten) wie folgt gekennzeichnet wurden:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$ ,  $p < 0,0001 = ****$ . Die Auswertung und Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism 5.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. DAS CHEMERIN-CHEMERINREZEPTORSYSTEM IN DER TUMORDIAGNOSTIK

Früherkennung und die vollständige Entfernung des Tumorgewebes ist entscheidend für eine gute Überlebensrate der Patienten. In unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass CMKLR1 in ösophagealen Plattenepithelkarzinomen und im pankreatischen Adenokarzinom im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert wird [120]. Darauf aufbauend soll nachfolgend untersucht werden, ob die Chemerinrezeptoren, insbesondere CMKLR1, bei weiteren Tumorentitäten verstärkt exprimiert werden und sich als *Targets* für die Tumordiagnostik eignen.

#### 5.1.1. EXPRESSION DES CHEMERIN-CHEMERINREZEPTORSYSTEMS IN HUMANEN ZELLINIEN

Für spätere Experimente an Xenograft-Mausmodellen mit nu/nu-Nacktmäusen war zunächst die Etablierung einer endogen CMKLR1-exprimierenden Zelllinie entscheidend. Da in der *in vivo*-NIRF-Bildgebung stabilisierte Chemerin-9-Analoga getestet werden sollten, und Chemerin neben CMKLR1 außerdem eine hohe Affinität zu CCRL2 und GPR1 aufweist, wurden diese Rezeptoren ebenfalls untersucht.

Zur Abschätzung der Expression der Chemerin-Rezeptoren CMKLR1, CCRL2 und GPR1 sowie deren Ligand (Chemerin, Genbezeichnung RARRES2) wurde als initiales Experiment eine quantitative Real-Time PCR (qPCR) an einem umfassenden Set humaner Tumorzelllinien durchgeführt (Abb. 13). Die höchste CMKLR1-Expression zeigte die Mammakarzinomzelllinie DU4475. Ihr mRNA-Gehalt lag ca. zwei Zyklen über dem der stabil CMKLR1-exprimierenden HEK 293A Kontrollzelllinie (Abb. 13A). In den Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, MDA MB 468 und MCF7 wurde ebenfalls CMKLR1-mRNA detektiert. Auch in den Zelllinien aus dem Gehirn wurde CMKLR1-mRNA nachgewiesen.

GPR1-mRNA wurde in den Zelllinien N31, AGS, Capan1, MiaPaCa-2, QGP, LCC-18, U2OS und SK-HEP-1 nachgewiesen (Abb. 13B). In der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurde neben GPR1-mRNA auch CCRL2-mRNA amplifiziert (Abb. 13A, B). Damit enthielt diese Zelllinie mRNA jeder der drei bekannten Chemerin-Rezeptoren. CCRL2-mRNA konnte weiterhin in den Tumorzelllinien U87-MG, Kato III, AsPC1 sowie MiaPaCa-2 detektiert werden (Abb. 13C). Die höchsten Chemerin-mRNA-Level wurde in den Zelllinien N31, N39, AsPC1, Capan1, Capan2, LCC-18 und SW620 gemessen (Abb. 13D).

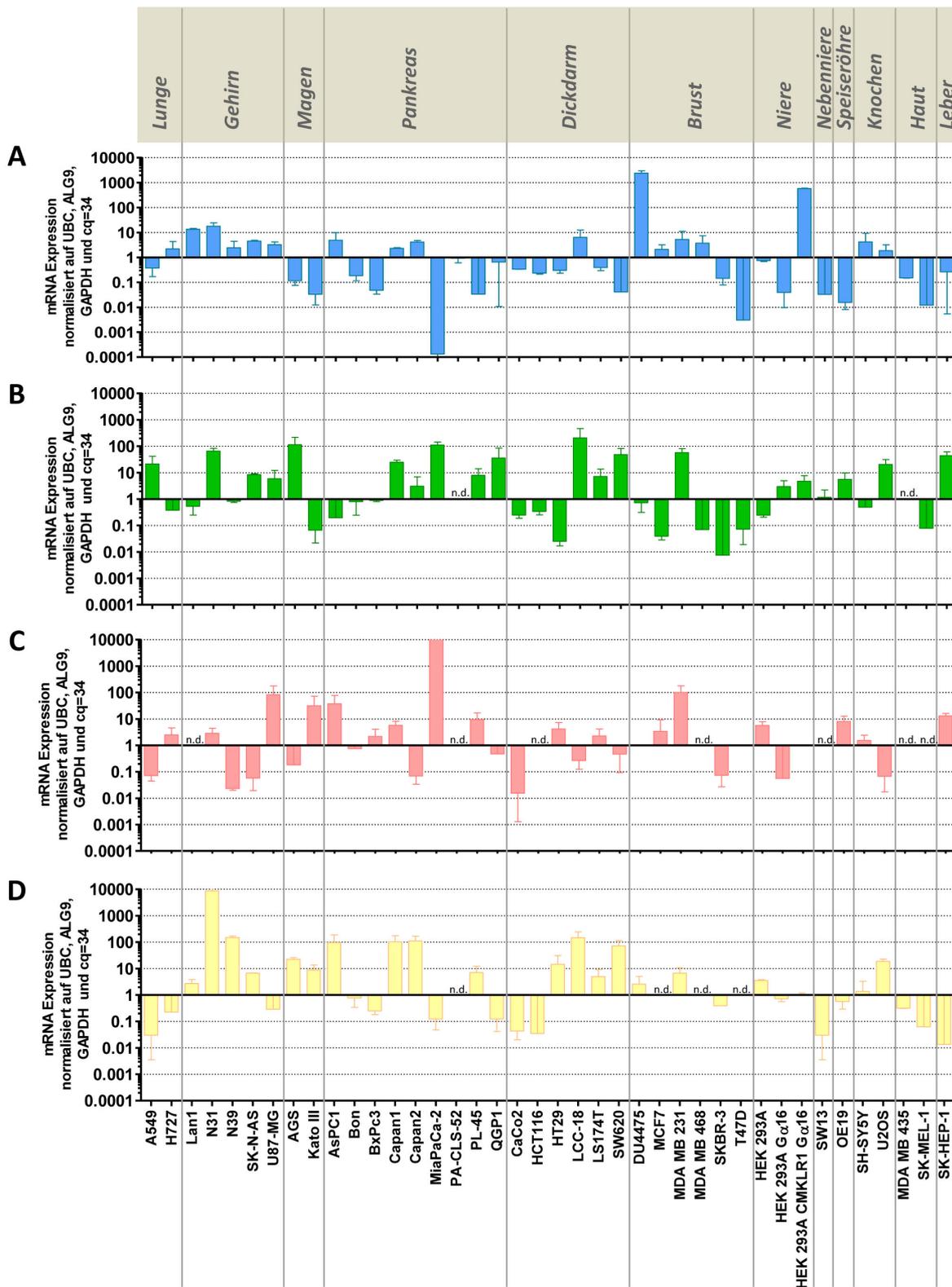
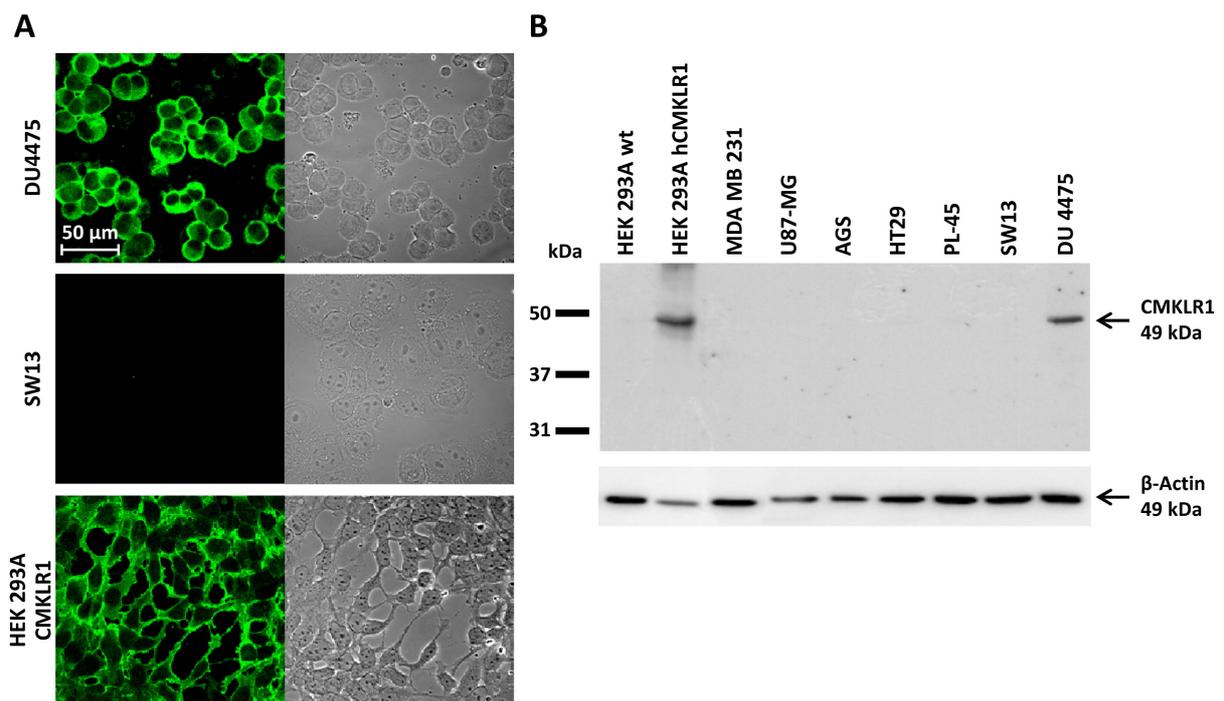


Abb. 13: Expressionsanalyse von humanen Zelllinien auf vier verschiedene Gene mittels quantitativer Real-Time PCR. Normalisiert wurden die cq-Werte auf die Referenzgene UBC, ALG9 und GAPDH und den cq-Wert = 34 (entspricht dem Wert 1). n = 2-5; jeweils in Duplikaten;  $\mu \pm$  SD. **A:** CMKLR1. **B:** GPR1. **C:** CCRL2. **D:** RARRES2 (Gen für Chemerin). n.d.: nicht detektiert.

Da das Vorhandensein von mRNA nicht automatisch auf das Vorhandensein von Protein schließen lässt, wurden diese Zelllinien mittels Immunfluoreszenz auf die Rezeptoren CMKLR1, CCRL2 sowie GPR1 untersucht. Als Positivkontrollen dienten stabil transfizierte CMKLR1, CCRL2 und GPR1 HEK 293A Zellen.

Die Ergebnisse hierzu können dem Anhang entnommen werden (Abb. 53). Weder GPR1 noch CCRL2 konnte in den getesteten Zelllinien endogen nachgewiesen werden. CMKLR1 war ausschließlich in der Mammakarzinomzelllinie DU4475 vorhanden, wobei außerdem die Membranständigkeit des Rezeptors verifiziert werden konnte (Abb. 14A; Abb. 53 im Anhang). Western Blot-Analysen bestätigen die Expression von CMKLR1 in DU4475-Zellen (Abb. 14B). CMKLR1 scheint somit für die Diagnostik von Mammakarzinomen ein potentiell *Target* zu sein, weshalb sich die weiteren Untersuchungen auf diese Entität beschränken. Die DU4475-Zelllinie sollte als Modellzelllinie für Xenograftexperimente genutzt werden. Die Nebennierenzelllinie SW13 wurde als Negativkontrolle für *in vivo*-Experimente ausgewählt, da sie keine/wenig mRNA der drei Chemerin-Rezeptoren exprimiert, was wiederum mit dem Proteinnachweis korrelierte (Abb. 13; Abb. 14; Abb. 53).



**Abb. 14: Expression von CMKLR1 in humanen Tumorzelllinien.** **A:** Immunfluoreszenz an DU4475, SW13 sowie HEK 293A CMKLR1 (Positivkontrolle). Exemplarisches Beispiel. n=3. Folgender primärer Antikörper wurde verwendet: anti-CMKLR1 (1:100; Cayman; aus Kaninchen). Als Sekundärantikörper diente *goat* anti-Kaninchen-Cy2 (1:1000). **B:** Zelllysate von humanen Zelllinien wurden auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Als Primärantikörper wurde anti-CMKLR1 (1:10.000; Cayman) sowie anti- $\beta$ -Actin (1:50.000; Sigma) und als Sekundärantikörper *goat* anti-Kaninchen-POD (1:10.000) verwendet. Die erwartete Proteingröße entspricht 49 kDa. Exemplarisches Beispiel. n=3.

Für spätere bildgebende Experimente an DU4475-Xenografts mit spezifischen Liganden war neben dem Vorhandensein von CMKLR1 auch die Ligandenbindung entscheidend. Zum Nachweis der spezifischen Bindung wurden radioaktive kompetitive Bindungsexperimente an DU4475 und SW13 mit Chemerin-9 (Chem-9) durchgeführt (Abb. 15).

Die Abnahme des detektierbaren  $I^{125}$  bei steigender Konzentration des unmarkierten („kalten“) Chem-9 von 153 cpm auf 57 cpm bei DU4475-Zelllinien ergab eine 2,7-fache Verdrängung des radioaktiv markierten Chem-9. Damit kann von einer spezifischen Bindung von Chem-9 an die CMKLR1-positiven DU4475-Zellen ausgegangen werden. Die *Target*-negativen SW13-Zellen zeigten keine Verdrängung und somit keine Bindung von Chem-9.

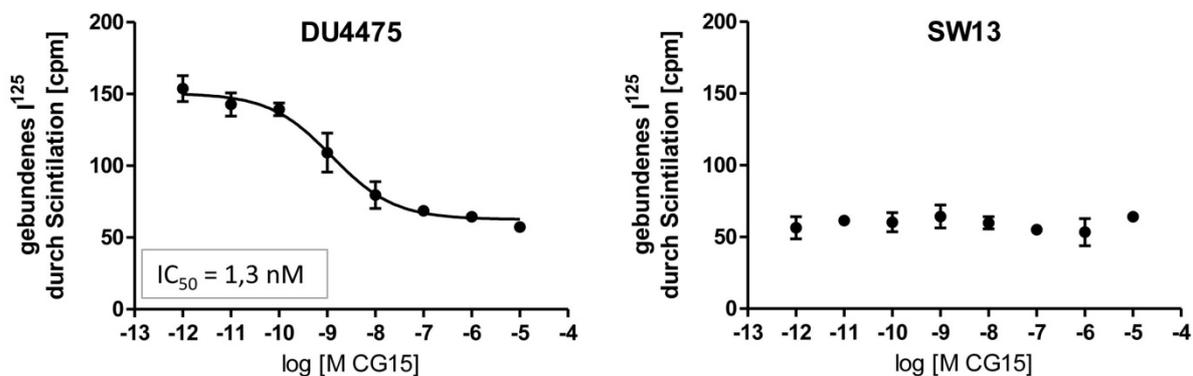
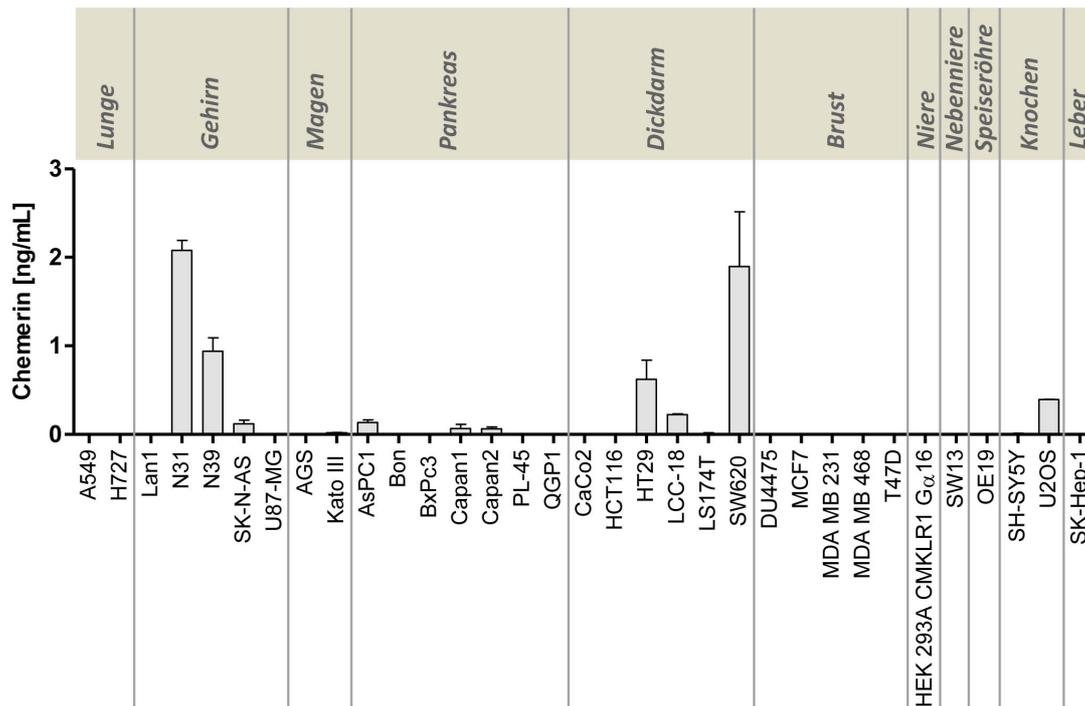


Abb. 15: Kompetitive Bindungsstudie von  $I^{125}$ -Chemerin-9 mit steigenden Konzentrationen von Chem-9 an DU4475- und SW13-Zellmembranen. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikatmessungen aus drei unabhängigen Experimenten.  $\mu \pm \text{SEM}$ .

In den *in vivo*-Xenograftmodellen erfolgt die Visualisierung des CMKLR1-exprimierenden Tumors über stabile Chemerin-Sonden. Eine endogene Expression und Sekretion von Chemerin war möglichst auszuschließen, damit dieses nicht mit den Sonden um die CMKLR1-Bindungsstellen konkuriert.

Da in den DU4475-Zellen mRNA von RARRES2 nachgewiesen wurde, wäre eine Proteinexpression und damit verbundene autokrine Effekte denkbar (Abb. 13D). Die Proteinexpression von Chemerin wurde mittels Chemerin-ELISA an Zellkulturüberständen untersucht. In keiner der Mammakarzinomzelllinien konnte Chemerin detektiert werden (Abb. 16). Von den getesteten Zelllinien wiesen N31, N39, HT29, SW620 sowie U2OS höchste Chemerin-Sekretion auf, was mit den Ergebnissen der mRNA-Analyse korrelierte (Abb. 13D).



**Abb. 16: Analyse der Chemerinkonzentration in Zellkulturüberständen.** Kultiviert wurden die Zelllinien für 24 h in dem zelllinienspezifischen Kulturmedium bei einer Konfluenz von 60-80 %. Dargestellt ist  $\mu \pm SD$ ; n=2-4. Die Analyse erfolgte mittels Chemerin-ELISA.

### 5.1.2. EXPRESSION VON CMKLR1 IM HUMANEN MAMMAKARZINOM

Um die Ergebnisse aus den Zellkulturen zu verifizieren, wurden Gewebeproben von Mammakarzinomen auf eine CMKLR1-Expression untersucht. Ziel war die Überprüfung der klinischen Relevanz von CMKLR1 als potentielles *Target* für Brustkrebs.

Hierfür wurde ein *Kryo-Tissue Array* mit Proben von 37 verschiedenen Brustkrebspatientinnen sowie von drei gesunden Brustnormalgeweben als Kontrolle auf die Expression von CMKLR1 mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Übersichtsfärbung des gesamten *Tissue Arrays* in 5-facher Vergrößerung kann dem Anhang (Abb. 54 und Abb. 55) entnommen werden. Anhand der Intensität der Färbung wurden die Gewebe in CMKLR1-positiv und CMKLR1-negativ eingestuft (Tab. 22). Um falsch-positive Effekte zu vermeiden, wurden schwache oder nicht eindeutig lokalisierte Fluoreszenzsignale als negativ bewertet. Keines der drei Normalgewebe zeigte eine Expression von CMKLR1. Insgesamt konnte in 37,8 % der Mammakarzinomgeweben eine membranständige CMKLR1-Expression detektiert werden (Tab. 22).

Exemplarisch sind in Abb. 17 zwei CMKLR1-positive, ein CMKLR1-negatives Mammakarzinomgewebe sowie zwei nicht-neoplastische Normalgewebe dargestellt.

Tab. 22: Beurteilung der CMKLR1-Expression in Mammakarzinom- und Kontrollgeweben eines *Breast Tumor Frozen Tissue Arrays*. Färbung von 37 Tumor- und 3 Normalgeweben.

Einteilung	gesundes Brustnormalgewebe	Mammakarzinomgewebe
CMKLR1-positiv	0/3 (0 %)	14/37 (37,8 %)
CMKLR1-negativ	3/3 (100 %)	23/37 (62,2 %)

CMKLR1 konnte in den hier aufgezeigten CMKLR1-positiven Brustkrebsgeweben membranständig detektiert und somit als potentielles *Target* im duktalem Karzinom identifiziert werden.

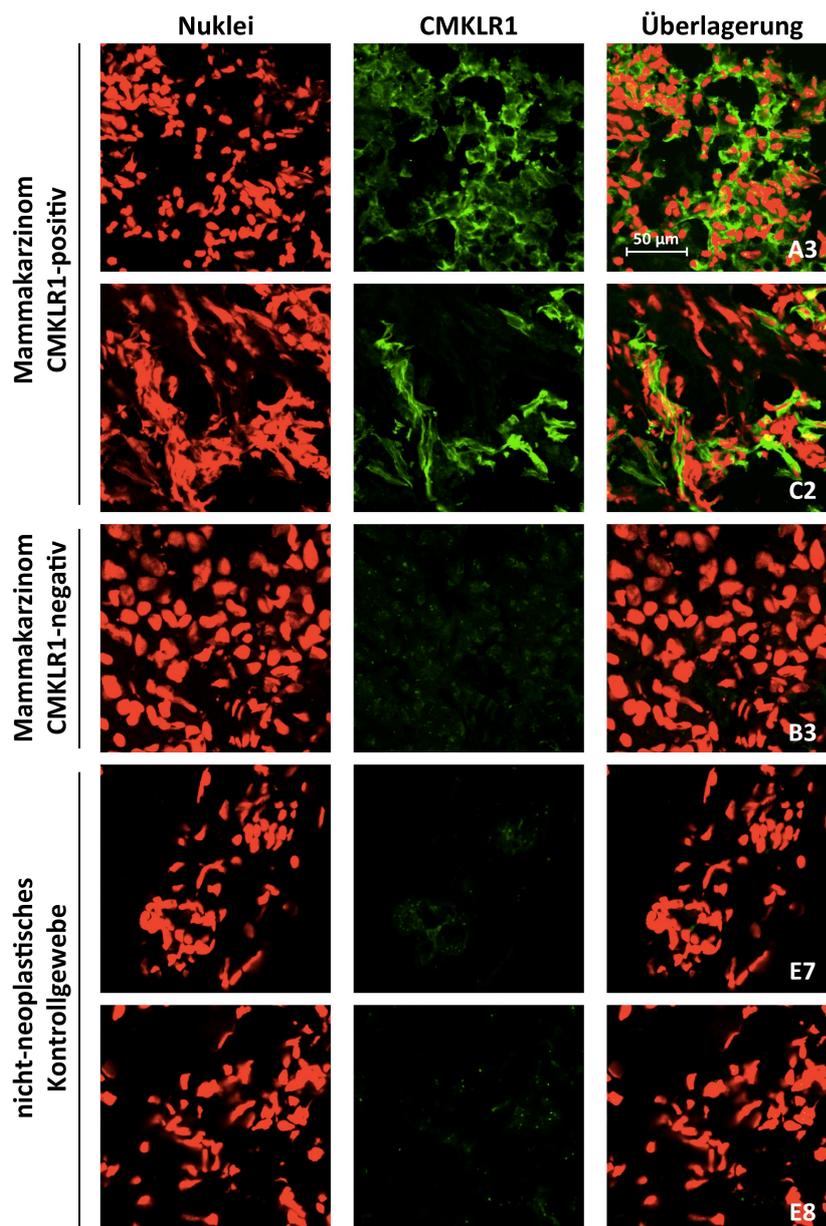


Abb. 17: Expression von CMKLR1 in humanen Mammakarzinomgeweben und gesunden Brustkontrollgeweben. Exemplarisches Beispiel aus dem *Tissue Array* (Gefriergewebe) der Firma BioChain. Dargestellt sind zwei CMKLR1-positives, ein CMKLR1-negatives sowie zwei gesunde nicht-neoplastische Brustkontrollgewebe in 63-facher Vergrößerung. Primärer Antikörper: anti-CMKLR1 (1:65; #21-86; aus Kaninchen). Sekundärantikörper: *goat* anti-Kaninchen-Cy2 (1:100; grün). Die Zellkerne wurden mittels SytoxOrange (1 µM) angefärbt (rot).

### 5.1.3. EXPRESSIONSANALYSE AN DU4475/SW13-XENOGRAFTS

Zur Überprüfung, ob die Expression der Chemerin-Rezeptoren, insbesondere die von CMKLR1, *in vivo* erhalten bleibt, wurden die Xenografts aus DU4475- und SW13-Zellen auf die mRNA-Expression der drei Chemerin-Rezeptoren und dessen Ligand hin untersucht. Abb. 18 zeigt qPCR-Ergebnisse dieser *ex vivo*-Analyse im Vergleich zur jeweils komplementären Zelllinie. Die hohe mRNA-Expression von CMKLR1 blieb in den DU4475-Tumoren erhalten, wobei dessen mRNA-Menge in den SW13-Tumoren im Bezug auf die Zelllinie geringfügig anstieg. Der mRNA-Gehalt von GPR1 sowie CCRL2 war in den Tumoren im Vergleich zu den Zelllinien vergleichbar niedrig. Sowohl bei den DU4475- als auch bei den SW13-Xenografts wurde eine Erhöhung der RARRES2-mRNA verzeichnet.

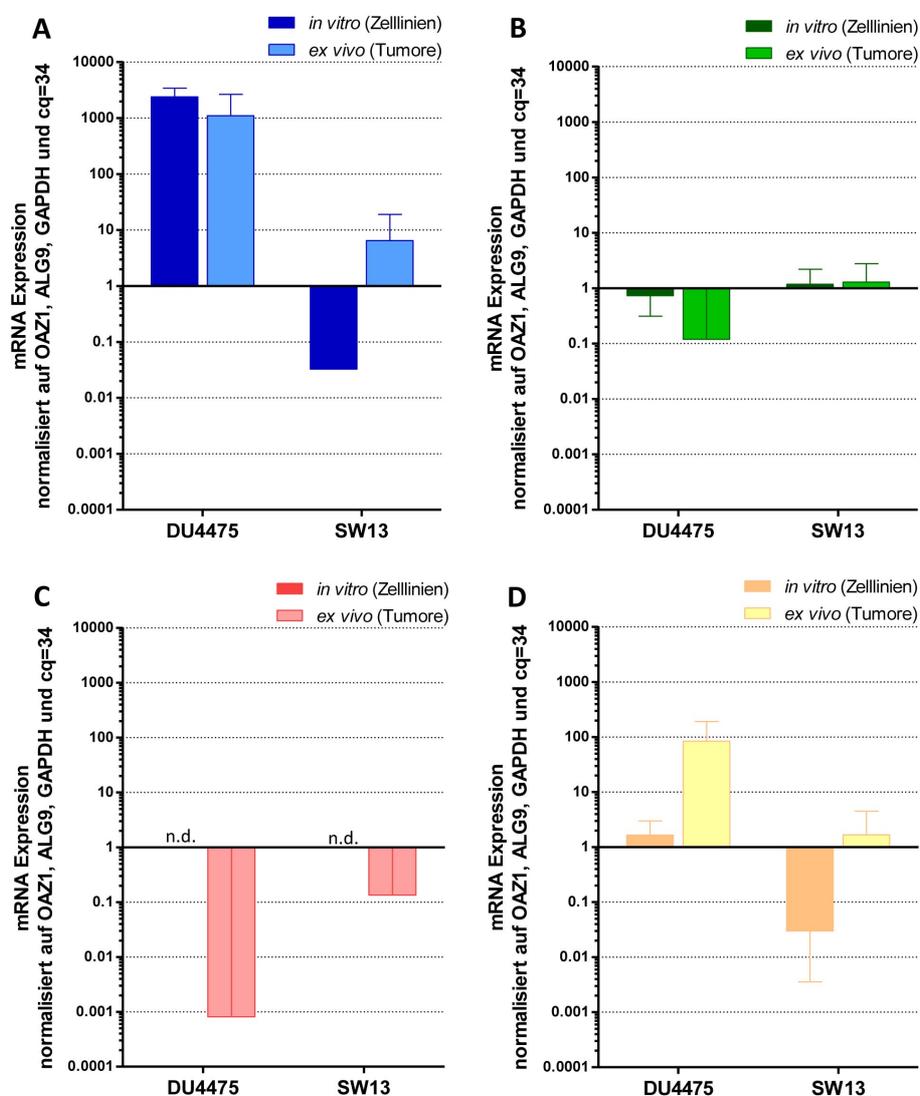
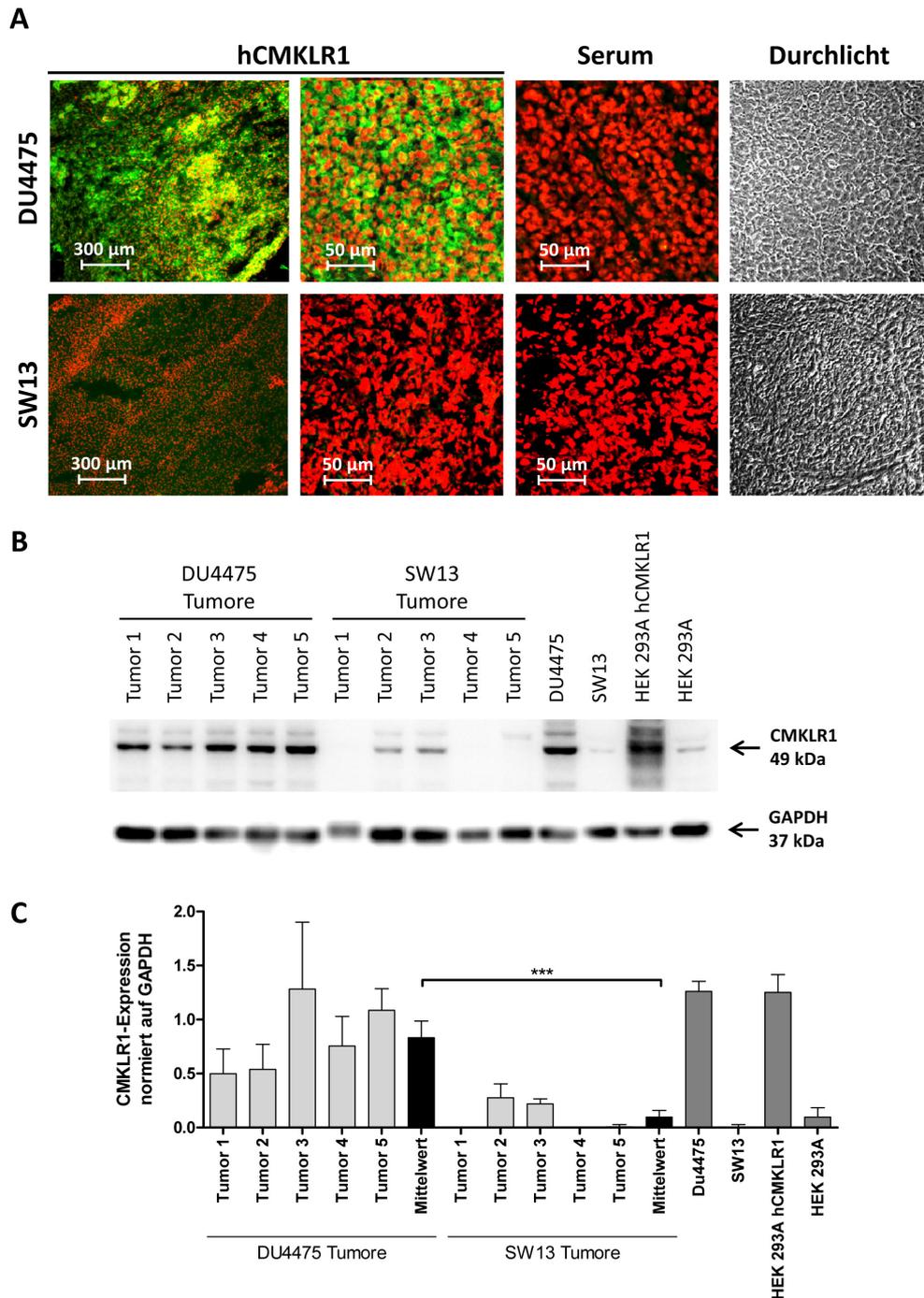


Abb. 18: Expressionsanalyse von Xenograft-Tumoren im Vergleich zu der entsprechenden Zelllinien auf vier verschiedene Gene mittels quantitativer Real-Time PCR. Normalisiert wurden die cq-Werte auf die Referenzgene UBC, ALG9 und GAPDH und den cq-Wert = 34 (entspricht dem Wert 1). n = 3-13; jeweils in Duplikaten;  $\mu \pm$  SD. **A:** CMKLR1. **B:** GPR1. **C:** CCRL2. **D:** RARRES2 (Gen für Chemerin). n.d.: nicht detektiert.

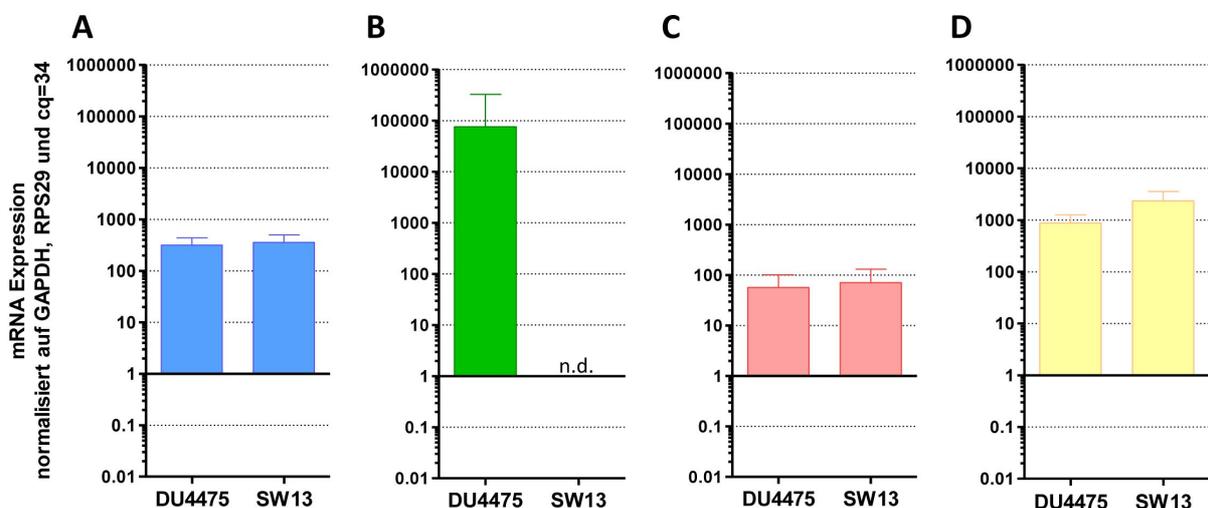
Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Kryo-Tumorschnitten bestätigten die Expression von CMKLR1 in DU4475-Xenografts (Abb. 19A).



**Abb. 19: Expression von CMKLR1 in Tumoren aus Xenografts.** **A:** Immunfluoreszenz an Kryo-Gewebeschnitten von Xenografts. Folgender primäre Antikörper wurden verwendet: anti-CMKLR1 (1:100; Cayman; aus Kaninchen). Als Negativkontrolle diente 1 % BSA in PBS sowie Kaninchenserum in den äquivalenten Konzentrationen zum Primärantikörper (Kaninchenserum: 1:1200). Als Sekundärantikörper diente *goat* anti-Kaninchen-Cy2 (1:100). Die Zellkerne wurden mittels SytoxOrange (1 µM) angefärbt. Mikroskopiert wurden die Gewebeschnitte mit 5- (CMKLR1) bzw. 40-facher Vergrößerung. Exemplarisches Beispiel. n=12. **B/C:** Zellysate von jeweils 5 Tumoren sowie den entsprechenden Kontrollzelllinien (DU4474, SW13, HEK 293A hCMKLR1, HEK 293A Wildtyp) wurden auf Polyacrylamid-Gele aufgetragen, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Als Primärantikörper wurde anti-CMKLR1 (1:10.000; Cayman) sowie GAPDH (1:1.000) und als Sekundärantikörper *goat* anti-Kaninchen-POD (1:10.000) verwendet. Die erwartete Proteingröße entspricht 49 kDa (CMKLR1) bzw. 37 kDa (GAPDH). n=3. **B:** Ein exemplarisches Beispiel von drei unabhängigen Western Blot-Experimenten. **C:** Quantifizierung (densitometrisch) der CMKLR1-Expression auf GAPDH. Mittelwert: Mittelung der 5 entsprechenden Tumore. 1-way-ANOVA (Bonferroni post-hoc Test).  $\mu \pm$  SEM.

SW13-Kryoschnitte zeigten auch hier kein CMKLR1. In Western-Blot-Analysen an jeweils fünf verschiedenen SW13- und DU4475-Tumoren wurde eine signifikant erhöhte Expression von CMKLR1 in DU4475-Tumoren detektiert (Abb. 19B/C). Als Positivkontrollen dienten stabil transfierte HEK 293A Zellen sowie DU4475-Zellen. Eine geringe Expression an CMKLR1 wurde ebenso in SW13-Tumoren nachgewiesen, wobei dieses Resultat mit den qPCR-Analysen der Xenografts (Abb. 18A) übereinstimmt. Die erhöhte Expression von CMKLR1 in DU4475-Tumoren im Vergleich zu SW13-Tumoren war hoch signifikant. Somit wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die Überexpression von CMKLR1 in DU4475-Tumoren bestätigt.

Die Xenografts wurden darüber hinaus auf die Expression von mRNA murinen Ursprungs untersucht (Abb. 20). Murine Zellen könnten zum Beispiel durch die Einwanderung von Makrophagen in das Tumorgewebe in humanen Xenografts vorhanden sein. Hier ergaben sich bei SW13- und DU4475-Tumoren für murines CMKLR1, CCRL2 und RARRES2 nahezu identische mRNA-Gehalte. Mit Ausnahme der GPR1-mRNA Expression bei SW13-Xenografts konnten in allen Proben sowohl mRNA der drei Chemerin-Rezeptoren als auch des natürlichen Liganden nachgewiesen werden. In den entsprechenden Zelllinien konnte mit den hier verwendeten Primern erwartungsgemäß keine murine mRNA amplifiziert werden.



**Abb. 20: Expressionsanalyse von Xenograft-Tumoren auf vier verschiedene murine Gene mittels quantitativer Real-Time PCR.** Normalisiert wurden die cq-Werte auf die Referenzgene GAPDH, RPS29 und den cq-Wert = 34 (entspricht dem Wert 1). n = 3-13; jeweils in Duplikaten;  $\mu \pm$  SD. **A:** CMKLR1. **B:** GPR1. **C:** CCRL2. **D:** RARRES2 (Gen für Chemerin). n.d.: nicht detektiert.

Für die bildgebende Diagnostik an Maus-DU4475-Xenografts war neben der CMKLR1-Expression auch die Bindung des Liganden an den Rezeptor entscheidend. Um dies nachzuweisen, wurden radioaktive kompetitive Bindungsexperimente an DU4475-Xenografts durchgeführt (Abb. 21). Um eine Bindung an SW13-Tumoren auszuschließen, wurden diese als Negativkontrolle mitgeführt.

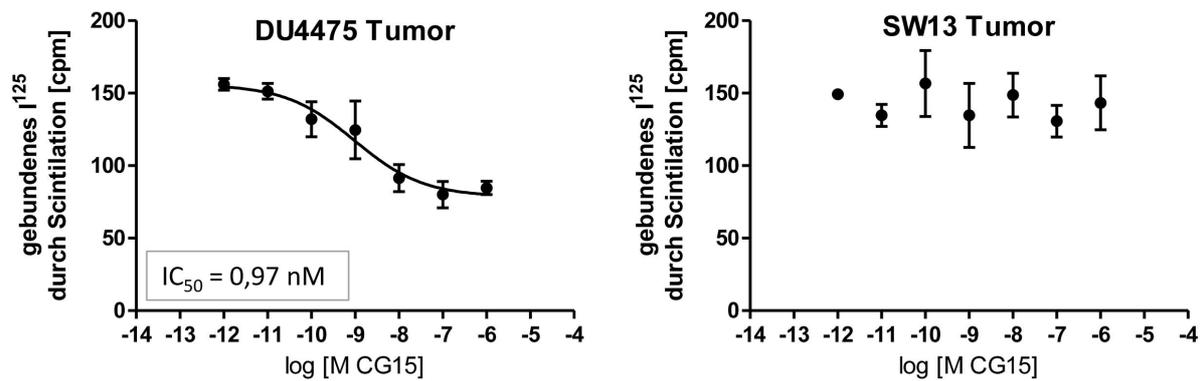


Abb. 21: Kompetitive Bindungsstudie von  $^{125}\text{I}$ -Chem-9 mit steigenden Konzentrationen von Chem-9 an Membranen von DU4475- und SW13-Xenografts. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikatmessungen aus drei unabhängigen Experimenten.  $\mu \pm \text{SEM}$ .

Die Abnahme der gebundenen Aktivität bei erhöhter Konzentration des unmarkierten („kalten“) Chem-9 von 156 cpm auf 84 cpm bei den DU4475-Tumoren lässt auf eine Verdrängung des radioaktiv markierten Chem-9 durch das unmarkierte Peptid schließen. Dies beweist eine spezifische Bindung von Chem-9 an die CMKLR1-positiven DU4475-Tumoren. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte lagen im nanomolarem Bereich (0,97 nM) und waren damit vergleichbar mit den  $\text{IC}_{50}$ -Werten aus den kompetitiven Bindungsexperimenten mit der DU4475-Zelllinie (1,3 nM; Abb. 15). Die CMKLR1-negativen SW13-Xenografts zeigten zwar relativ hohe cpm-Werte, aber keine Verdrängung und vermitteln somit keine spezifische Bindung von Chem-9.

#### 5.1.4. CHARAKTERISIERUNG STABILER CHEMERIN-VARIANTEN IN VITRO

Zwei hoch spezifische Liganden für CMKLR1 wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe durch Substitutionsanalysen an Chem-9 entwickelt. Die Testung erfolgte dabei an stabil transfizierten HEK 293A CMKLR1-Zellen mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung beziehungsweise radioaktive Bindungsassays [121]. Die so etablierten serumstabilen Chem-9-Analoga wurden als CG34 beziehungsweise CG36 bezeichnet (siehe Kapitel 1.3.4.) und sollten im Zuge dieser Arbeit für die bildgebende Diagnostik eingesetzt werden. Aus diesem Grund war zunächst der Nachweis der Bindung dieser Liganden an CMKLR1-exprimierenden Modellzelllinie DU4475-Zellen entscheidend.

Abb. 22 zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von CG34 sowie CG36 in einer kompetitiven Bindungsstudie mit steigenden  $^{125}\text{I}$ -Chem-9-Konzentrationen an DU4475-Zellmembranen. Hier konnte eine Verdrängung des radioaktiven Chem-9-Peptides sowohl mit CG34 als auch mit CG36 von ca. 150 cpm auf ca. 50 cpm erreicht werden. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte lagen mit 2,3 nM (CG34)

und 1,4 nM (CG36) im nanomolaren Bereich und sind dabei mit dem IC<sub>50</sub>-Wert von 1,3 nM durch Chem-9 an DU4475-Zellmembranen vergleichbar (Abb. 15).

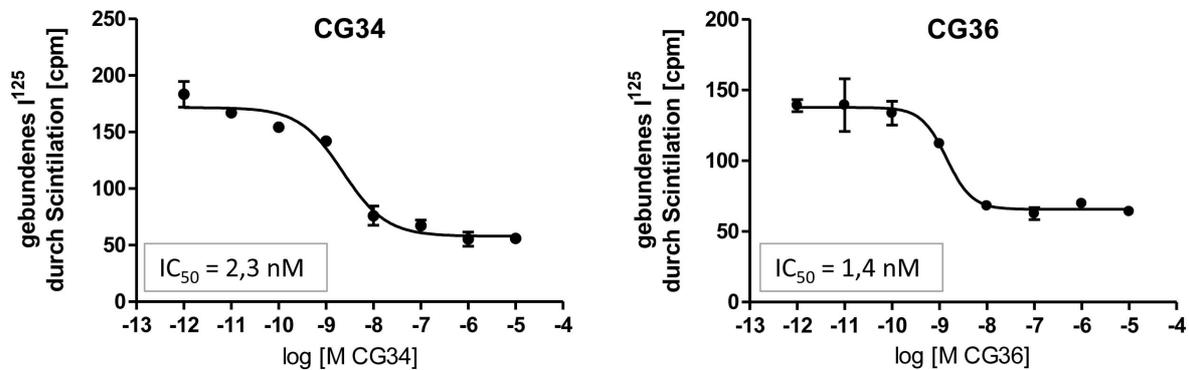
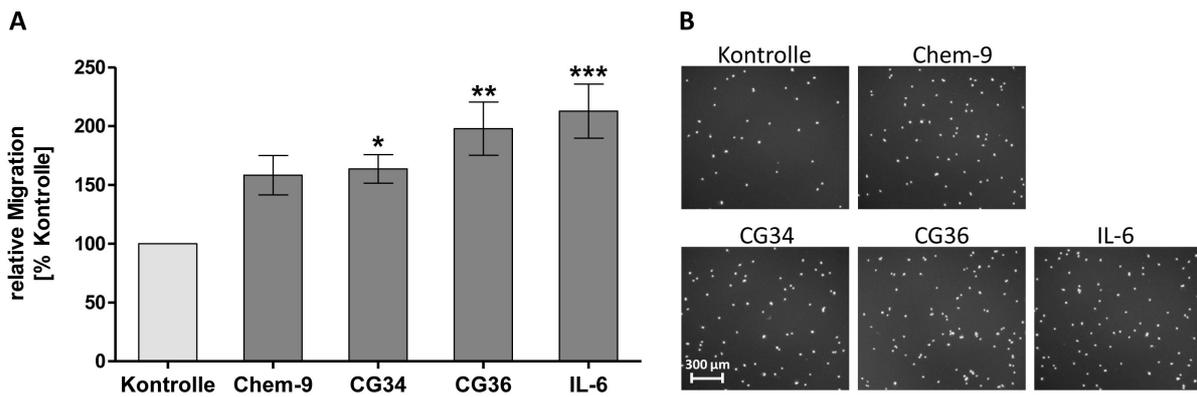


Abb. 22: Kompetitive Bindungsstudie von I<sup>125</sup>-Chem-9 mit steigenden Konzentrationen von CG34 und CG36 an DU4475-Zellmembranen. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikatmessungen aus drei unabhängigen Experimenten.  $\mu \pm$  SEM.

Da die Aktivierung von CMKLR1 mittels Chemerin bekannterweise die Zellmigration von Makrophagen und dendritischen Zellen stimuliert, wurde ein Migrationsassay verwendet, um die Funktionalität von CG34 und CG36 an Chemerin-Rezeptoren zu zeigen [164]. Da DU4475-Zellen ausschließlich in Suspension kultiviert werden, kommen diese für einen Chemotaxisexperiment nicht in Frage. Durch qPCR-Experimente konnte neben DU4475 als weitere CMKLR1-exprimierende Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 identifiziert werden. Diese zeigte zusätzlich eine erhöhte mRNA-Expression von CCRL2 und GPR1.

Mit der Zelllinie MDA-MB-231 wurde ein Migrationsassay mit Chem-9 und den stabilisierten Chem9-Analoga CG34 sowie CG36 durchgeführt. Als Positivkontrolle diente Interleukin-6 (IL-6), welches bereits als ein Stimulationsfaktor zur Steigerung von Invasion und Migration, unter anderem bei Brustkrebszelllinien, charakterisiert ist [173]–[175]. Abb. 23 zeigt das Resultat dieses Migrationsassays an MDA-MB-231. Die Chemerin-Analoga CG34, CG36 (164 % und 198 %), sowie IL-6 (212 %) führten zu einer signifikanten Steigerung der Migration von MDA-MB-231. Die Zugabe von Chem-9 resultierte ebenfalls in einer erhöhten Migration (158 %). Somit wäre die Funktionalität der Chemerin-Analoga CG34 und CG36 an einer weiteren Mammakarzinomzelllinie bestätigt.



**Abb. 23: Migrationsanalyse nach Stimulation der Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 mit Chem-9 und dessen Analoga CG34 and CG36.** Die Stimulation erfolgte für 6 h mit Chem-9, CG34, CG36 und IL-6 als Positivkontrolle. Verwendet wurden Polycarbonatmembranen mit einer Porengröße von 8 µm. **A:** Quantitative und statistische Analyse des Migrations-Assay mit MDA-MB-231. Die Anzahl der migrierten Zellen sind dargestellt als  $\mu \pm$  SEM; n=6 in Duplikaten. 1-way-ANOVA (Bonferroni post-hoc Test). Die Normalisierung erfolgte auf die Mediumkontrolle (100 %). **B:** Repräsentative mikroskopische Aufnahme der DAPI-Zellkernfärbung.

### 5.1.5. CHARAKTERISIERUNG DER NIRF-SONDEN IN VITRO

Mit der NIRF-Bildgebung wurden zwei Ziele verfolgt. Erstens sollte CMKLR1 als Zielstruktur für die Tumorbildgebung validiert und zweitens verschiedene Sonden basierend auf den Liganden CG34 und CG36 charakterisiert werden.

Hierfür wurden an die zwei stabilisierten Chem-9-Varianten CG34 und CG36 vier verschiedene Linker (PEG11, AHX, TTDS, LysCap) und der Nahinfrarotfarbstoff ITCC gekoppelt. Zusätzlich wurde CG34 sowie CG36 ohne Linker direkt an ITCC gekoppelt. Die Auswahl der Linker erfolgte aufgrund ihrer unterschiedlichen physischen und chemischen Charakteristiken (zum Beispiel Hydrophobizität, Molekulargewicht). So war CG36 aufgrund des höheren Anteils hydrophober Aminosäuren (zum Beispiel Phenylalanin, Prolin, Glycin, Methionin, Alanin) deutlich hydrophober als CG34. In Verbindung mit den vergleichsweise hydrophilen (TTDS oder PEG11) beziehungsweise hydrophoben (AHX oder LysCap) Spacern wurde somit ein breites Spektrum an physikochemisch-verschiedenen Chemerin-Sonden generiert. Die Bezeichnungen sowie die detaillierten Strukturen der Chemerin-Sonden können dem Methodenteil (Tab. 6; Kapitel 3.2.4) und dem Anhang (Abb. 52) entnommen werden. Um sicherzustellen, dass die Linker und der Farbstoff keinen Einfluss auf die Aktivität der Liganden ausüben, wurden diese mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierungsassay an stabil transfizierte HEK 293A CMKLR1-Zellen funktionell untersucht. In Tab. 23 sind die ermittelten  $\text{EC}_{50}$ -Werte aufgelistet. Die dazugehörigen Konzentrations-Wirkungskurven zur Ermittlung der  $\text{EC}_{50}$ -Werte können dem Anhang (Abb. 56) entnommen werden.

**Tab. 23: Funktionelle Analyse der Peptide mittels Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung in HEK 293A CMKLR1 Gα16-Zellen.** grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikatmessungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Linker	CG34		CG36	
	Konjugat	EC <sub>50</sub> [nM]	Konjugat	EC <sub>50</sub> [nM]
-	CG46	1,2	CG48	3,8
TTDS	CG47	3,0	CG49	1,5
AHX	CG35	2,0	CG37	1,3
PEG11	CG75	7,1	CG76	0,9
LysCap	CG77	5,2	CG78	11,2

Die EC<sub>50</sub>-Werte von CG34 und CG36 wurden bei ca. 0,3 nM beziehungsweise die des Wildtypigen Chem-9 bei 1,2 nM (Tab. 1, Kapitel 1.3.4) bestimmt und sind somit vergleichbar zu den Werten in Tab. 23. Die Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierungsexperimente an den veränderten Peptiden konnten zeigen, dass weder die Linker noch der Farbstoff einen Einfluss auf die Affinität der Peptide zu CMKLR1 ausüben.

Dass Chem-9 und die stabilisierten Chemerin-Varianten mit CMKLR1 internalisieren, wurde bereits gezeigt [121]. Effekte der stabilisierten Sonden an GPR1, einem weiteren Chemerin-Rezeptor, wurden bisher nicht nachgewiesen.

Zur Überprüfung der Translokation mit GPR1, wurden HEK 293A-Zellen stabil mit einem GPR1-EGFP-Konstrukt transfiziert. Das EGFP-Fusionsprotein ermöglicht hierbei die Visualisierung der intrazellulären internalisierten Vesikel nach Ligandenzugabe. Abb. 24 zeigt initiale Internalisierungsexperimente mit IDCC-markierten Peptidvarianten von Chem-9 und CG34. Nach 30 min Inkubation konnte eine GPR1-vermittelte Internalisierung der spezifischen Peptide verzeichnet werden. Die Überlagerung beider Signale zeigte eine deutliche Ko-Lokalisation von Rezeptor und Ligand. Im Vergleich zu den Kontrollen (*scrambled*-Chem-9 und Mediumkontrolle) nahm die Membranlokalisierung des Rezeptors nach Ligandenzugabe deutlich ab. Weiterhin konnte in den Negativkontrollen eine starke basale Vesikelbildung in den Zellen beobachtet werden.

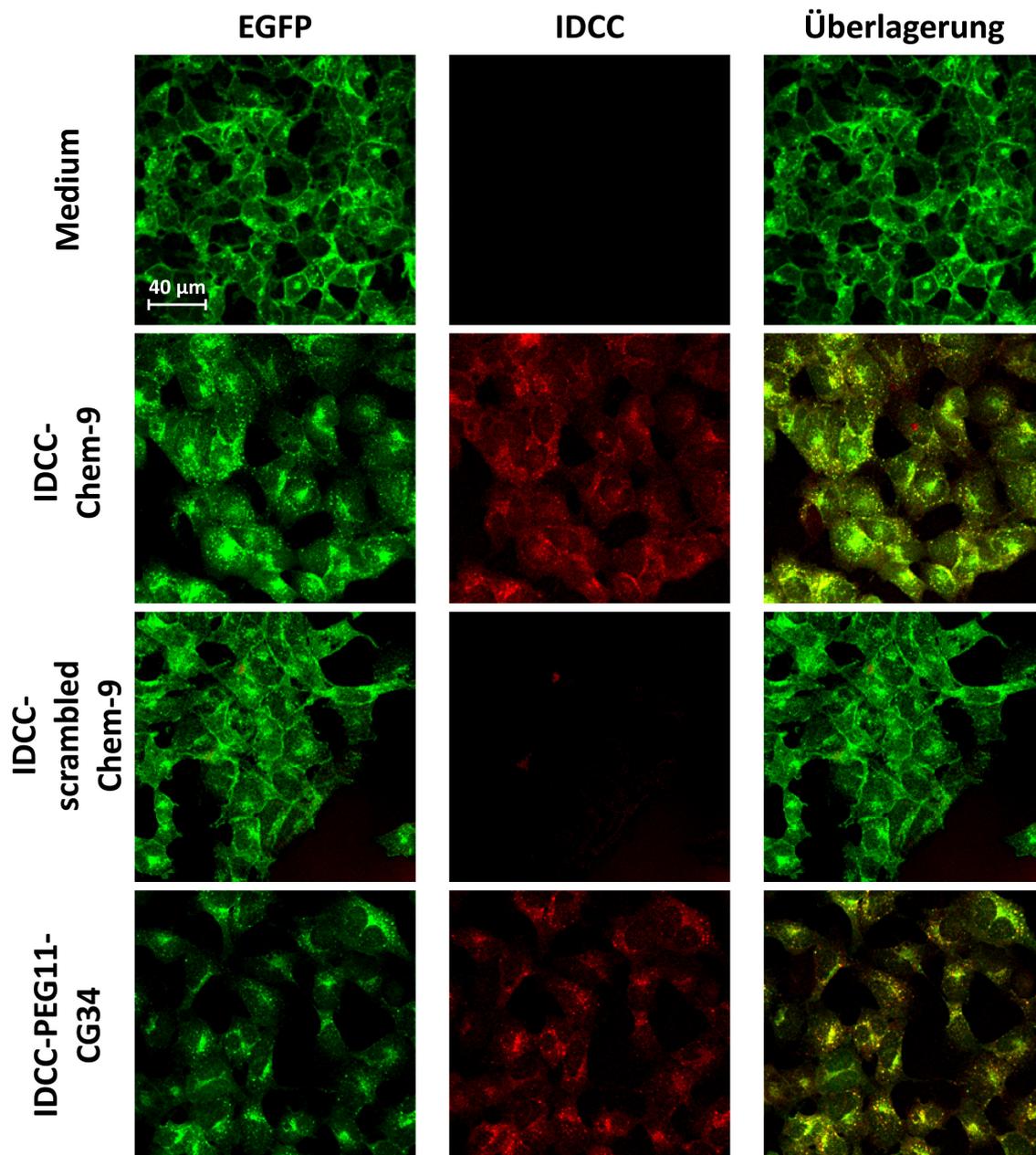


Abb. 24: Internalisierung von HEK 293A GPR1-EGFP mit IDCC-markierten Chemerin-Varianten. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4 % gepuffertem Formalin nach 30 min Inkubationszeit. 200 nM Ligand. Als Negativkontrolle diente RPMI-Medium und ein *scrambled*-Chem9-Peptid. rot: IDCC; grün: EGFP. Aufgenommen mit einem konfokalem Zeiss-Mikroskop.

Da eine Internalisierung von GPR1 nachgewiesen war, erfolgte die Charakterisierung der NIRF-Sonden an HEK 292A GPR1-EGFP Zellen durch die EGFP-Vesikel-Visualisierung mit dem IN Cell Analyzer (Abb. 25).

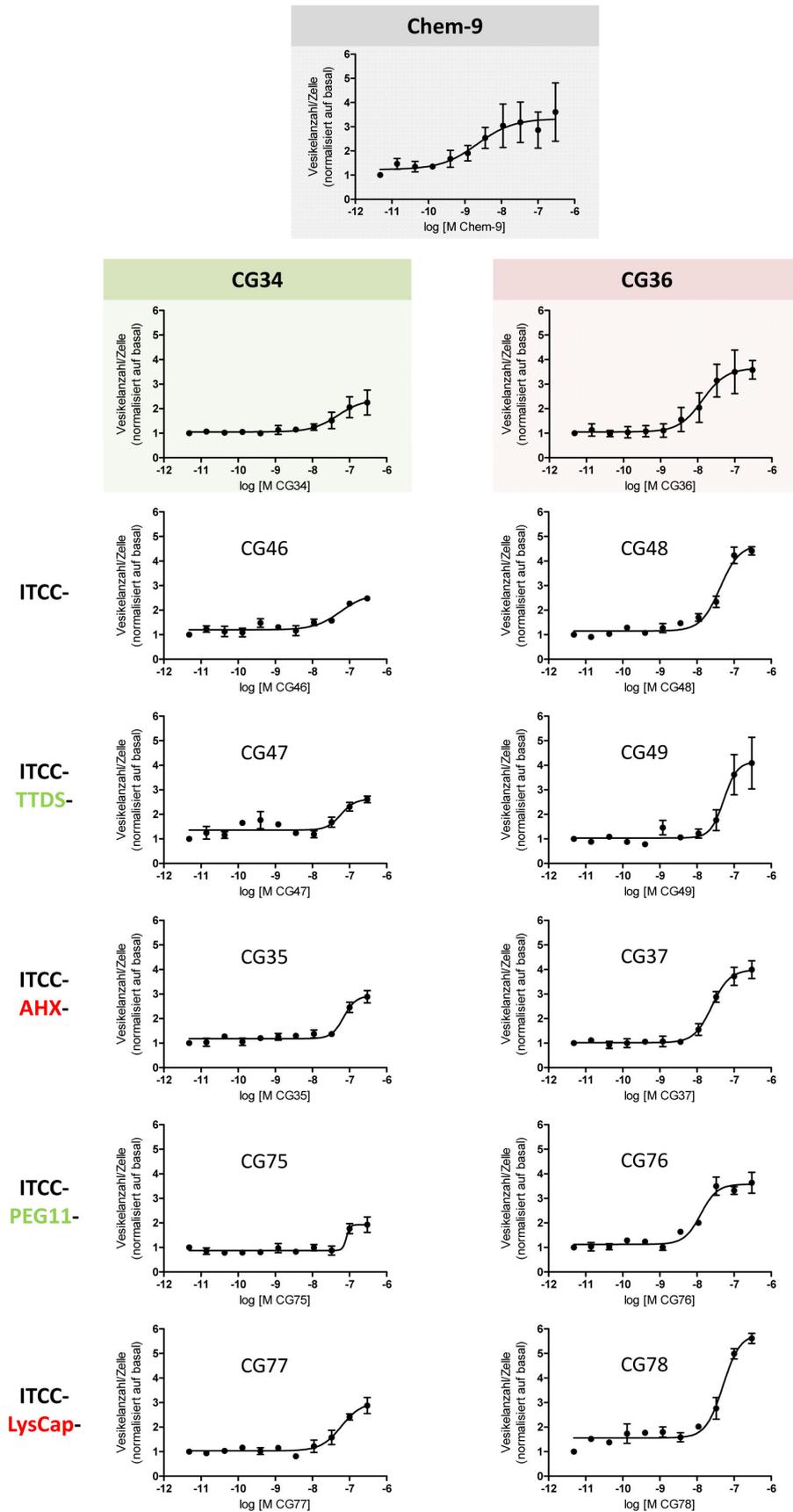
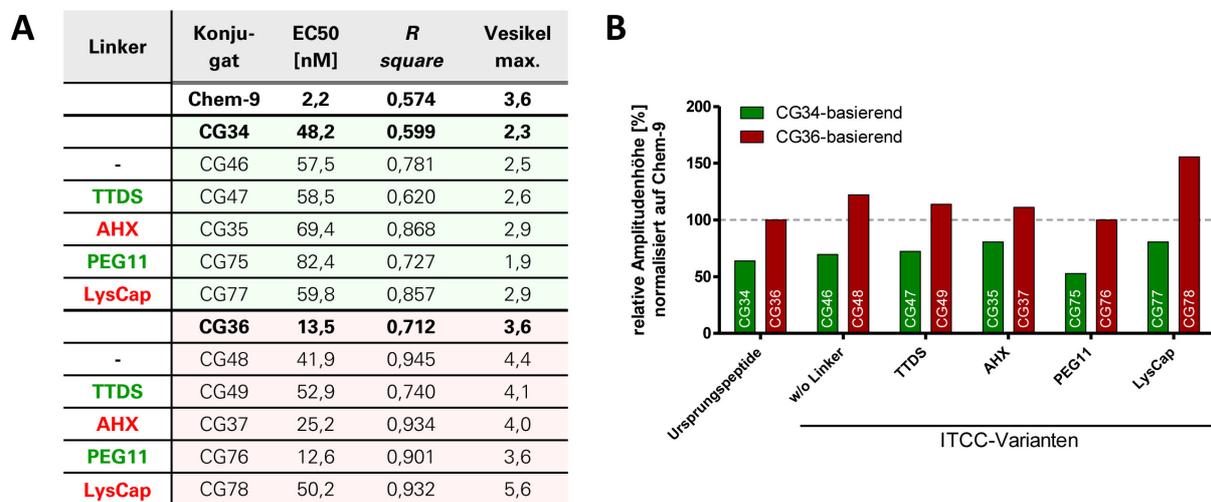


Abb. 25: Internalisierungsexperimente mit den NIRF-Sonden in HEK 293A GPR1-EGFP Zellen. Die Messung erfolgte am IN Cell Analyzer. grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikatmessungen aus drei unabhängigen Experimenten.  $\mu \pm$  SEM. Aufgrund der tagesbedingten Unterschiede in der Vesikelanzahl wurden die Messergebnisse auf den Wert der basalen Vesikelanzahl (=1) normalisiert.

Der Vergleich zwischen den CG34- und den CG36-Peptidvarianten zeigte deutliche Unterschiede in der maximalen Amplitudenhöhe (maximale Anzahl der gezählten Vesikel; „Vesikel max.“) (Abb. 26A). Die Anzahl der gezählten Vesikel der CG34-Sonden lag zwischen dem Zwei- und Dreifachen der basalen Vesikelanzahl. Bei den CG36-basierenden Sonden wurde das 3,6 bis 5,6-fache gemessen. Die EC<sub>50</sub>-Werte lagen bei allen getesteten Sonden im zweistelligen nanomolarem Bereich, wobei die EC<sub>50</sub>-Werte der CG36-Peptide etwas niedriger lagen. Diese Schwankungen in den IC<sub>50</sub>-Werten 12,6 nM bis 82,4 nM zwischen den Konjugaten sind vergleichbar mit den Abweichungen in der Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung (zwischen 0,9 nM und 11,2 nM; Tab. 23). Der EC<sub>50</sub>-Wert von Chem-9 lag in der GPR1-Internalisierung bei 2,2 nM und war damit der niedrigste aller getesteten Peptide.



**Abb. 26: Internalisierungsexperimente in HEK 293A GPR1-EGFP Zellen.** grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. **A:** Vesikel max.: maximale Anzahl der gezählten Vesikel. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikatmessungen aus drei unabhängigen Experimenten. **B:** Grafische Darstellung der Amplitudenhöhe (Vesikel max.) aus (A). Alle Werte wurden hier auf den Wert „Vesikel max.“ von Chem-9 normalisiert (= 100 %).

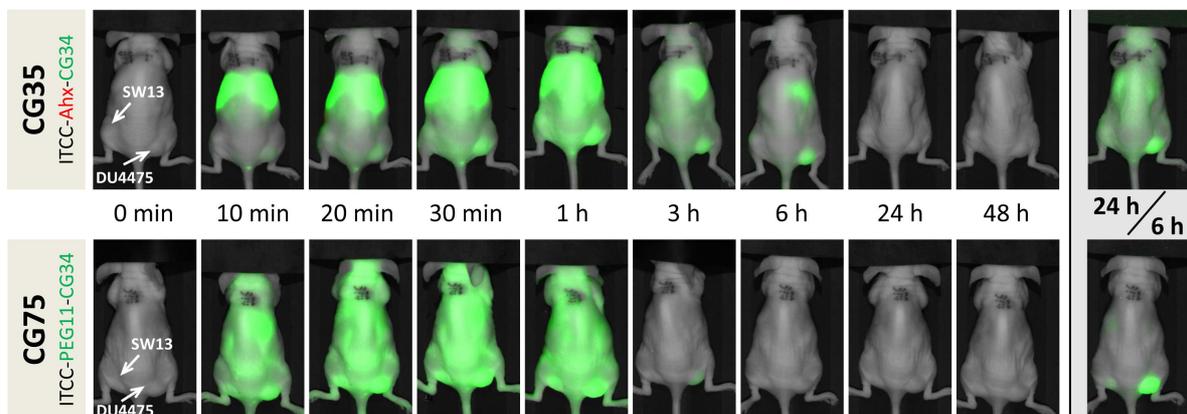
Der Vergleich der relativen Amplitudenhöhe (Abb. 26B) bezogen auf Chem-9 (100 %) verdeutlicht die Tendenz der schwächeren Internalisierung durch die CG34-basierenden Sonden. Die PEG11-Linker-Konjugate zeigten die geringsten Amplitudenhöhen in den jeweiligen Peptidfamilien (CG34 und CG36). CG78 vermittelt die stärkste Internalisierung von GPR1-EGFP (155 % zu Chem-9).

### 5.1.6. TESTUNG STABILER CHEMERIN-SONDEN MITTELS NIRF-BILDGEBUNG AN DU4475/SW13-XENOGRAFTMODELLEN IN VIVO

Nach der Charakterisierung der zehn ITCC-gekoppelten Chemerin-Sonden wurden diese Konjugate mittels Nahinfrarotfluoreszenz (NIRF)-Bildgebung an einem DU4475-Xenograftmodell mit jeweils vier Mäusen getestet. Zusätzlich zu DU4475 als CMKLR1-positive Zelllinie wurden SW13-Zellen als Negativkontrolle in nu/nu Nacktmäusen subkutan auf die Flanken injiziert.

Insgesamt zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Leberanreicherung der Konjugate von der Hydrophobizität des jeweiligen Peptids. Abb. 27 zeigt die Anreicherung der ITCC-gekoppelten Konjugate im Zeitverlauf exemplarisch für das sehr hydrophile Konjugat CG75 und dem vergleichsweise hydrophoben Konjugat CG35. Hierbei wurde je Maus der visuelle Verstärkungsgrad (*gain*) konstant gehalten um die zeitliche Verteilung im Tier, insbesondere in den Tumoren, zu visualisieren.

Sowohl die CG35- als auch die CG75-Fluoreszenzkonjugate reichern sich über die Zeit im CMKLR1-positiven DU4475-Tumor an. Das hydrophile CG75-Konjugat war nach 24 h optisch nicht mehr im Tumor nachweisbar. Bei 24 h (CG35) beziehungsweise 6 h (CG75) wurde das *gain* hochgestellt, um Rückschlüsse auf den Verbleib der Konjugate im Tier zu ziehen. Im CMKLR1-negativen SW13-Tumor konnte bei keinem der Sonden ein Signal verzeichnet werden.



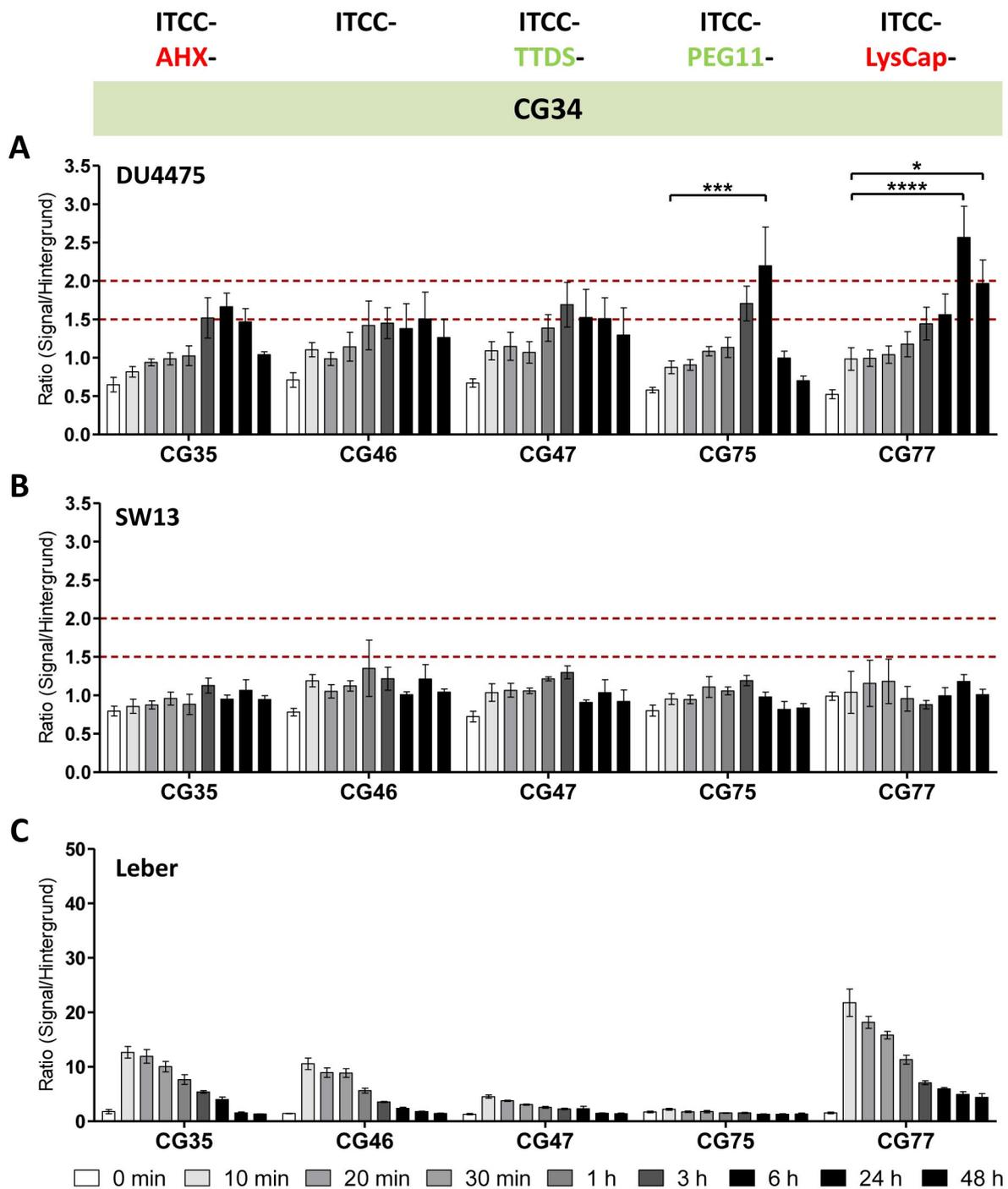
**Abb. 27: Exemplarisches Beispiel der zeitlich-abhängigen Anreicherung der Chemerin-Sonden CG35 und CG75 in tumortragenden NMRI nu/nu Mäusen im NIRF-Imaging.** grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Vor der Injektion erfolgte die initiale Messung (0 min). Nach der Injektion von 1 nmol Konjugat (i.v.) wurden nach folgenden Zeitpunkten die Akkumulation der Sonden (dargestellt in grün) detektiert: 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h sowie 48 h. Nach der Messung kann mittels Pearl Software die Anreicherung der Sonden im Tier visualisiert werden. Um den zeitlichen Verlauf der Biodistribution zu verdeutlichen, wurden die Bilder je Maus mit konstanter Intensität (gleicher Verstärkungsgrad; *Gain*) dargestellt. Nach 24 h (CG35) bzw. 6 h (CG75) wurde das *Gain* maximiert, um den Verbleib der Konjugate zu visualisieren. Auf die quantitative Auswertung hat die Verstellung des *Gains* keinen Einfluss. Die NMRI nu/nu Mäuse tragen hier auf der linken Flanke einen SW13- (CMKLR1-negativer Tumor) und auf der rechten Seite einen DU4475-Tumor (CMKLR1-positiv).

Abb. 28 und Abb. 29 zeigen die quantitative Auswertung der zehn verschiedenen Konjugate. Bestimmt wurde das Verhältnis des entsprechenden Signals in den Tumoren und der Leber zum Hintergrund (Nackenregion). Ein *Ratio* von 1 bedeutet keine und ein *Ratio* über 1 eine erhöhte Anreicherung im Bezug zur Hintergrundfluoreszenz.

*Target*-spezifische Sonden sollten eine signifikante Anreicherung über die Zeit im CMKLR1-positiven DU7745-Tumor und vorzugsweise kein Signal im CMKLR1-negativen SW13-Tumor erzielen.

Die CG34-basierenden Konjugate CG75 und CG77 zeigten eine hoch signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals über die Zeit im DU4475-Tumor (Abb. 28A). Dabei wurden 6 h (CG75) beziehungsweise 24 h (CG77) nach Applikation die höchsten *Ratios* (CG75: 2,198; CG77: 2,566) verzeichnet. Die CG34-basierenden Sonden CG35 und CG47 zeigten eine schwache Tendenz zur Anreicherung im *Target*-positiven Tumor nach 6 h (CG35; *Ratio*: 1,665) beziehungsweise 3 h (CG47; *Ratio*: 1,69). Die Anreicherung der CG36-basierenden Varianten zeigte keine statistische Signifikanz. CG49 wies mit einem *Ratio* von 1,71 nach 6 h die stärkste Signalthöhe der CG36-basierenden Peptide auf (Abb. 29A). In *Target*-negativen SW13-Tumoren wurde bei keinem der Konjugate eine signifikante Zunahme des Fluoreszenzsignals über die Zeit detektiert (Abb. 28B; Abb. 29B).

Insgesamt korrelierte die Intensität des Lebersignals deutlich mit der Hydrophobizität der Sonden. So weist das hydrophilste Konjugat CG75 (ITCC-PEG11-CG34) das geringste Lebersignal (höchstes *Ratio*: 2,21; 10 min) auf und wird bereits nach 10 min über die Blase ausgeschieden (Abb. 28C). Das hydrophobste Konjugat CG78 (ITCC-LysCap-CG36) zeigte mit einem *Ratio* von 27,81 noch nach 48 h sehr hohe Lebersignale (Abb. 29C).



**Abb. 28: Quantitative Analyse der Anreicherung von Fluorophor-markierten CG34-Chemerin-Sonden in Tumoren und der Leber über die Zeit.** Dargestellt sind die Signal-zu-Hintergrund-Ratios. **grün:** hydrophile Peptide/Linker; **rot:** hydrophobe Peptide/Linker. Als Fluoreszenzfarbstoff diente ITCC (Indotricarbocyanin). Zur Kopplung von ITCC an CG34 wurden verschiedene Linker (AHX, TTDS, PEG11, LysCap) verwendet. Vor der Injektion erfolgte die initiale Messung (0 min). Nach der Injektion von 1 nmol Konjugat (i.v.) wurden nach folgenden Zeitpunkten die Akkumulation der Sonden detektiert: 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h sowie 48 h. Nach der Messung kann mittels Pearl Software die Anreicherung (Fluoreszenz) der Sonden im Tier berechnet werden. DU4475: CMKLR1-positiver Tumor. SW13: CMKLR1-negativer Tumor. 2-way-ANOVA (repeated-measures; Bonferroni post-hoc Test). n=4;  $\mu \pm$  SEM.

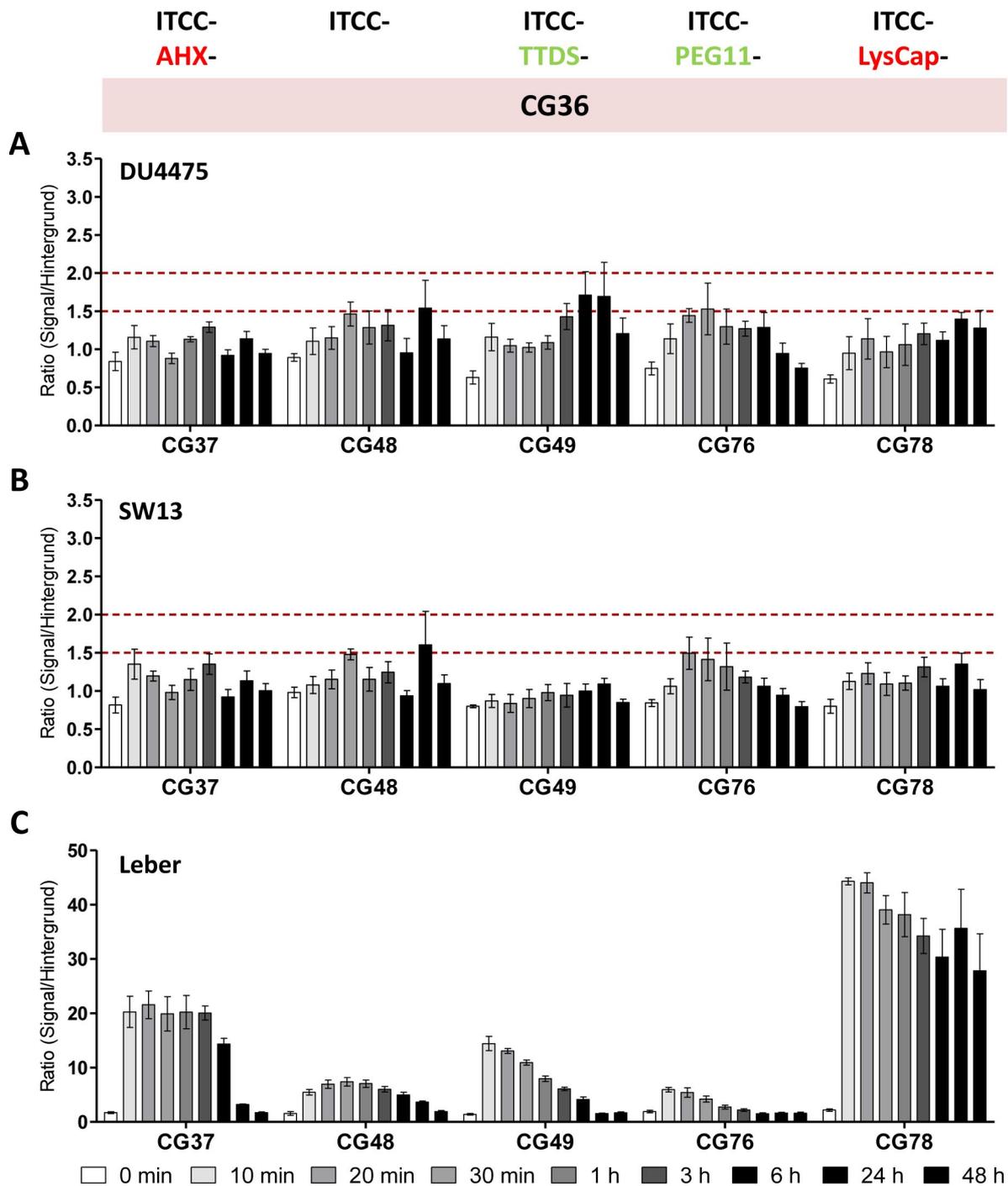


Abb. 29: Quantitative Analyse der Anreicherung von Fluorophor-markierten CG36-Chemerin-Sonden in Tumoren und der Leber über die Zeit. Dargestellt sind die Signal-zu-Hintergrund-Ratios. grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Als Fluoreszenzfarbstoff diente ITCC (Indotricarbocyanin). Zur Kopplung von ITCC an CG36 wurden verschiedene Linker (AHX, TTDS, PEG11, LysCap) verwendet. Vor der Injektion erfolgte die initiale Messung (0 min). Nach der Injektion von 1 nmol Konjugat (i.v.) wurden nach folgenden Zeitpunkten die Akkumulation der Sonden detektiert: 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h sowie 48 h. Nach der Messung kann mittels Pearl Software die Anreicherung (Fluoreszenz) der Sonden im Tier berechnet werden. DU4475: CMKLR1-positiver Tumor. SW13: CMKLR1-negativer Tumor. 2-way-ANOVA (repeated-measures; Bonferroni post-hoc Test). n=4;  $\mu \pm$  SEM.

Um zu entscheiden, mit welchen der zehn Konjugate weitergearbeitet werden sollte, wurden die ermittelten Ratios der DU4475- und SW13-Tumore miteinander verglichen. Die grafische Darstel-

lung zur direkten Gegenüberstellung ist der Abb. 57 im Anhang zu entnehmen. CG75 und CG49 zeigte hier nach 6 h ein signifikant höheres Signal im DU4475-Tumor im Vergleich zum SW13-Tumor (Abb. 57D, G). CG77 reicherte sich signifikant nach 24 h und 48 h im DU4475-Tumor an (Abb. 57I). Anhand dieser Grafik können somit der Zeitpunkt der maximalen Anreicherung für alle Konjugate bestimmt und die *Ratios* der DU4475- und SW13-Tumore bestimmt werden (Tab. 24). Bei einem Wert über 1,5 wurde der *cut-off* gesetzt, d.h. alle Konjugate mit einem DU4475:SW13-Verhältnis von 1,5 oder höher galten als vielversprechende Kandidaten und sollten für weitere Versuche mit zusätzlichen Kontrollen und einer größeren Anzahl an Mäusen getestet werden. Das höchste DU4475:SW13-*Ratio* wies das Konjugat CG77 mit einem Wert von 2,174 auf, gefolgt von CG75 (*Ratio*: 2,247), CG35 (*Ratio*: 1,753) und CG49 (*Ratio*: 1,713). Hiervon war CG49 das einzige CG36-basierende Konjugat.

**Tab. 24: Ermittlung des Verhältnisses (*Ratio*) der Anreicherung der Fluorophor-markierten Chemerin-Sonden im DU4475-Tumor zum SW13-Tumor (DU4475:SW13).** Verwendet wurden die Signal-zu-Hintergrund-*Ratios* aus Abb. 28, Abb. 29 bzw. Abb. 57. „*Ratio*“ bedeutet hier der Quotient aus DU4475- und SW13-Tumor. **grün**: hydrophile Peptide/Linker; **rot**: hydrophobe Peptide/Linker. Das *Ratio* wurde jeweils für den Zeitpunkt des höchsten Signals im CMKLR1-positiven DU4475-Tumor berechnet. Als *cut-off* wurde das *Ratio* 1,5 festgelegt. Konjugate, die mindestens diesen Wert erreichen, sind hervorgehoben (fett geschrieben).

Linker	CG34					CG36				
	Konju-gat	DU 4475	SW 13	<i>Ratio</i>	Zeit-punkt	Konju-gat	DU 4475	SW 13	<i>Ratio</i>	Zeit-punkt
-	CG46	1,504	1,211	1,242	24 h	CG48	1,541	1,603	0,961	24 h
<b>TTDS</b>	CG47	1,690	1,298	1,302	3 h	CG49	1,710	0,998	<b>1,713</b>	6 h
<b>AHX</b>	CG35	1,665	0,950	<b>1,753</b>	6 h	CG37	1,290	1,351	0,955	3 h
<b>PEG11</b>	CG75	2,198	0,978	<b>2,247</b>	6 h	CG76	1,529	1,413	1,083	30 min
<b>Lys Cap</b>	CG77	2,566	1,180	<b>2,174</b>	24 h	CG78	1,396	1,350	1,035	24 h

### 5.1.7. CHARAKTERISIERUNG DER SCRAMBLED NIRF-SONDEN IN VITRO

Wie in Tab. 24 dargestellt, waren bei vier der zehn Konjugate die Tumor-zu-Hintergrund-*Ratios* im DU4475-Tumor höher als im SW13-Tumor (CG77, CG75, CG35, CG49).

Als zweite Kontrolle zur Spezifität der Sonden wurden zusätzlich entsprechende *scrambled*-Varianten für die NIRF-Bildgebung verwendet. Die *scrambled*-Sonden sind jeweils in Linker und Farbstoff zu dem entsprechenden spezifischen Konjugat identisch. Die Aminosäuren der Peptide gleichen CG34 bzw. CG36, wurden jedoch in ihrer Reihenfolge randomisiert vertauscht, was in einer Konformationsänderung und einem Bindungsverlust zum Rezeptor resultiert. Sollte die Anreicherung eines spezifischen Konjugats im DU4475-Tumor sichtbar werden und die *scrambled* Sonde nicht binden, so kann von einer *Target*-selektiven Bindung an CMKLR1 ausgegangen wer-

den. Eine unspezifische Anreicherung der Sonden im Tumor könnte damit visualisiert und das Konjugat direkt ausgeschlossen werden.

Zunächst wurden die *scrambled*-Sonden *in vivo* mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung charakterisiert (Abb. 30). Nur bei CG81 zeigten die stabil transfizierten HEK393A CMKLR1-Zellen bei höherer Konzentration eine Rezeptor-vermittelte Reaktion, wobei in dem hier verwendeten Konzentrationsbereich kein  $\text{EC}_{50}$ -Wert ermittelt werden konnte. Bei CG63, CG79 sowie CG80 war keine Funtionalität nachweisbar. Damit waren diese als Negativkontrollen geeignet.

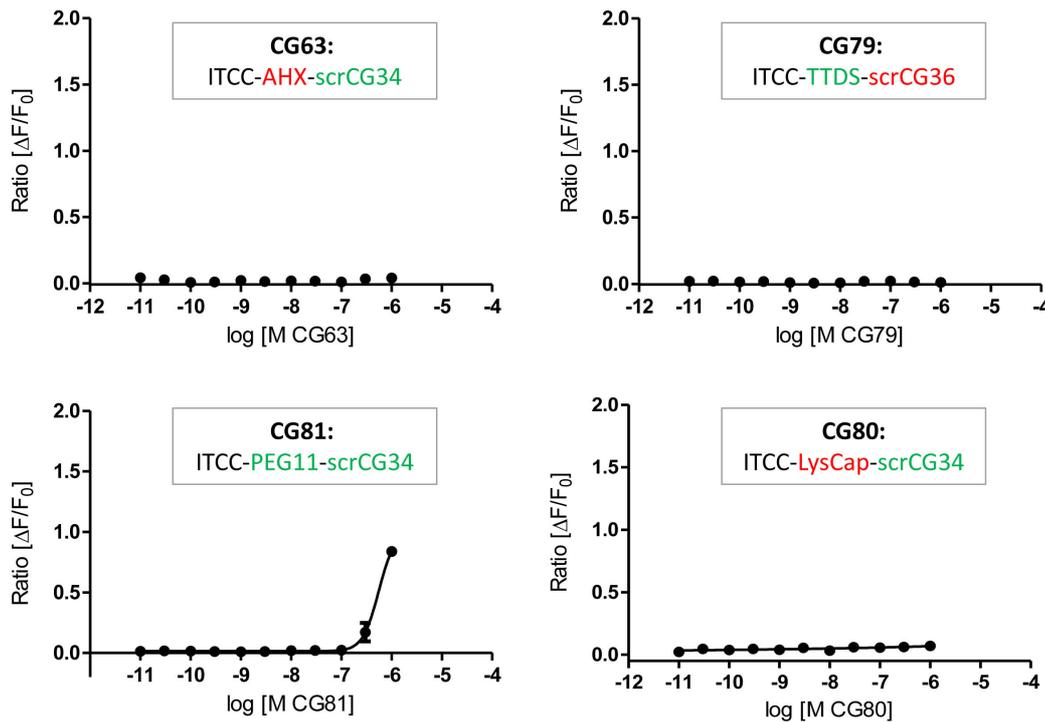
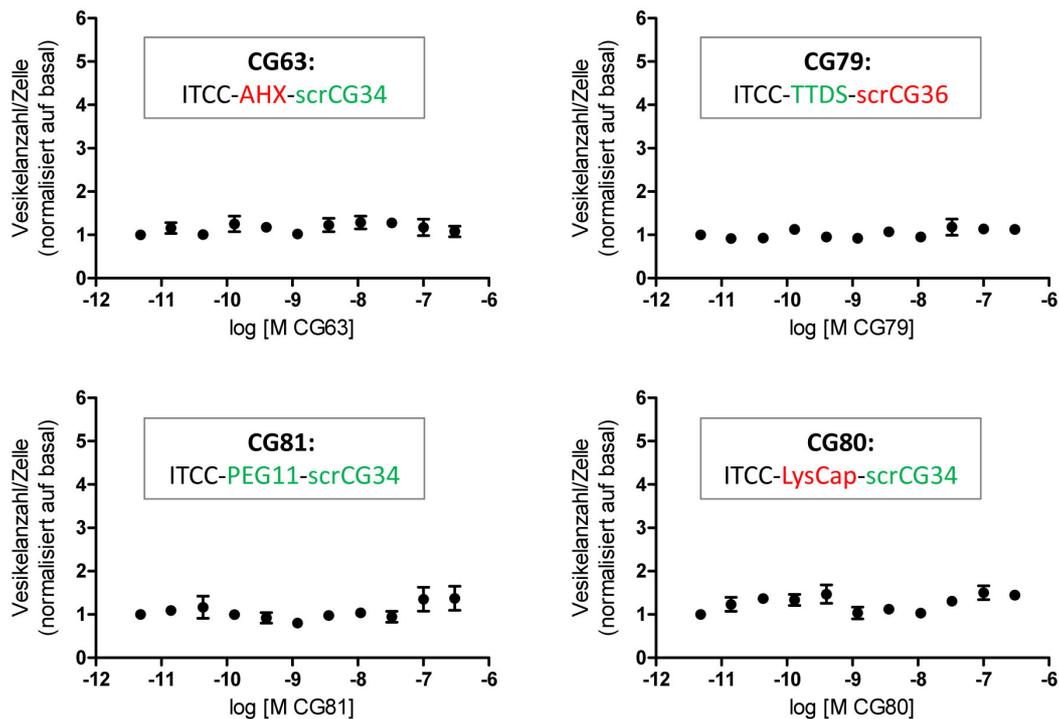


Abb. 30: Funktionelle Analyse der *scrambled* Peptide mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung in HEK 293A CMKLR1  $\text{G}\alpha_{16}$ -Zellen. grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikatmessungen aus drei unabhängigen Experimenten.  $\mu \pm \text{SEM}$ .

Des Weiteren wurden die *scrambled* Sonden in Internalisierungsexperimenten an HEK 293A GPR1-EGFP charakterisiert (Abb. 31). Auch hier konnte keine Rezeptoraktivierung gemessen werden.



**Abb. 31: Internalisierungsexperimente mit den *scrambled* NIRF-Sonden in HEK 293A GPR1-EGFP Zellen.** Die Messung erfolgte am IN Cell Analyzer. grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikatmessungen aus drei unabhängigen Experimenten.  $\mu \pm$  SEM. Aufgrund der tagesbedingten Unterschiede in der Vesikelanzahl wurden die Messergebnisse auf den Wert der basalen Vesikelanzahl (=1) normalisiert.

### 5.1.8. NIRF-BILDGEBUNG AN DU4475/SW13-XENOGRAFTMODELLEN MIT SPEZIFISCHEN CHEMERIN-SONDEN IM VERGLEICH ZU SCRAMBLED VARIANTEN

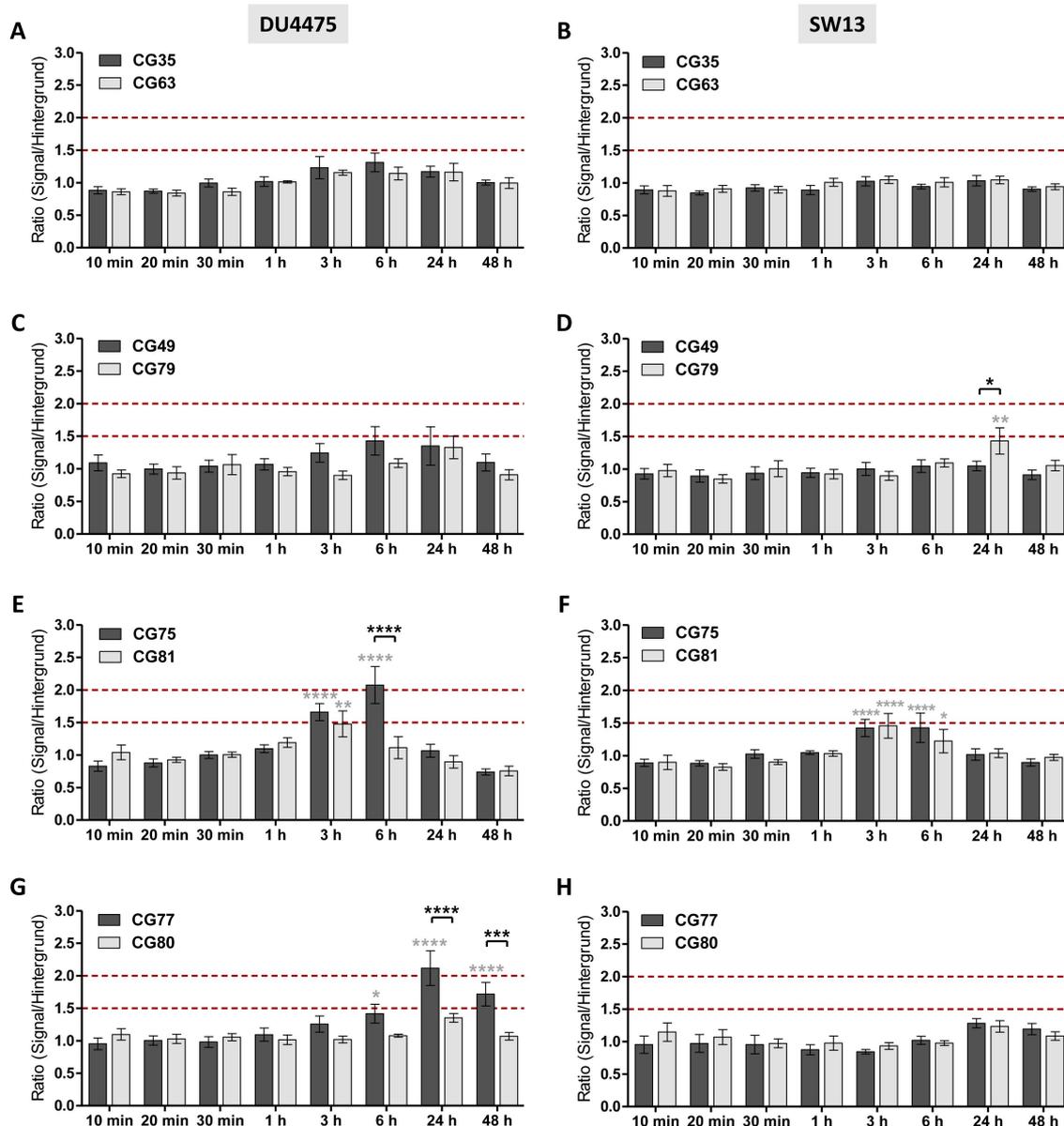
Da die *scrambled* Varianten keine (CG63, CG79, CG80) beziehungsweise eine deutlich geringere (CG81) Affinität zu CMKLR1 zeigten, wurden diese im NIRF-Bildgebung als Negativkontrollen verwendet. Wenn möglich, wurde eine Maus zunächst mit einem spezifischen und eine Woche später mit dem äquivalenten *scrambled*-Konjugat *geimaged*, oder umgekehrt.

Abb. 32 zeigt die quantitative Analyse des NIRF-Imagings der ITCC-gekoppelten-Chemerin-Sonden (CG77, CG75, CG35, CG49) sowie den entsprechenden *scrambled*-Sonden (CG80, CG81, CG63, CG79) an DU4475- und SW13-Tumoren mit einer erweiterten Tierzahl (n=6-9).

Die deutlichste Anreicherung erzielte CG77 gegenüber seiner *scrambled*-Variante CG80 mit einem Tumor-zu-Hintergrund-*Ratio* von 2,117 in CMKLR1-positiven DU4475-Tumoren nach 24 h (Abb. 32G, H). Die Differenz von spezifischer und *scrambled*-Sonde nach 24 h (0,765) und 48 h (0,65) war hoch signifikant. Somit bindet ausschließlich CG77, nicht aber dessen *scrambled*-Sonde CG80 spezifisch an CMKLR1-positive DU4475-Tumoren. In SW13-Tumoren konnte weder

mit CG77 noch mit CG80 eine Fluoreszenzsteigerung detektiert werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass CG77 eine Rezeptor-selektive Sonde für die NIRF-Bildgebung darstellt.

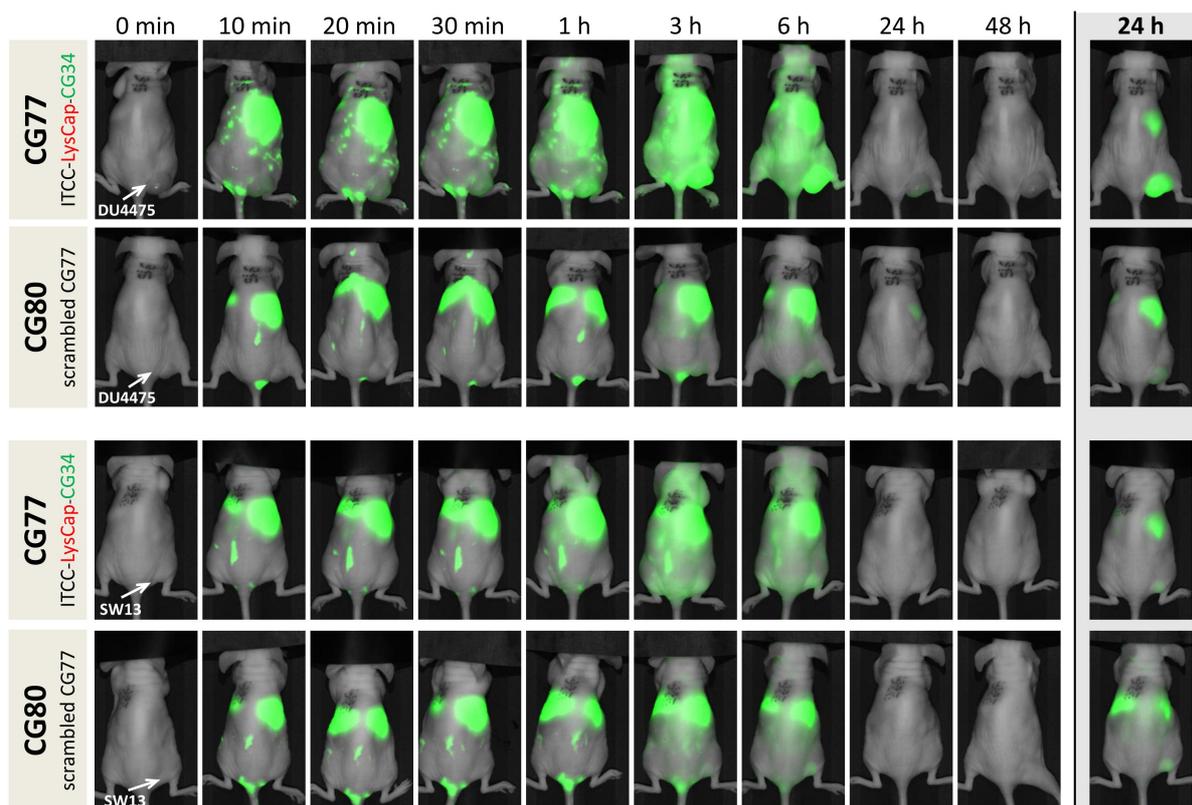
Das Konjugat CG35 zeigte mit einem *Ratio* von 1,31 ein minimales Signal in DU4475-Tumoren nach 6 h. Das CG35-äquivalente *scrambled*-Konjugat CG63 vermittelte insgesamt vergleichbare *Ratios* sowohl DU4475- als auch SW13-Tumoren. Damit war die Sonde CG35 nicht spezifisch (Abb. 32A, B).



**Abb. 32: Quantitative Analyse der Anreicherung der vier spezifischen Fluorophor-markierten Chemerin-Sonden und *scrambled* Sonden in DU4475- und SW13-Tumoren über die Zeit.** Als Fluoreszenzfarbstoff diente ITCC (Indotricarbocyanin). Zur Kopplung von ITCC an die Sonden wurden verschiedene Linker (AHX: CG35/CG63, TTDS: CG49/CG79, PEG11: CG75/CG81, Lys-Cap: CG77/CG80) verwendet. Als Negativkontrollen zu den spezifischen Chemerin-Sonden wurden *scrambled*-Sonden mit vertauschter Aminosäuresequenz eingesetzt. Vor der Injektion erfolgte die initiale Messung (0 min). Nach der Injektion von 1 nmol Konjugat (i.v.) wurde nach folgenden Zeitpunkten die Akkumulation der Sonden detektiert: 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h sowie 48 h. Nach der Messung kann mittels Pearl Software die Anreicherung (Fluoreszenz) der Sonden im Tier berechnet werden. DU4475: CMKLR1-positiver Tumor (A, C, E, G). SW13: CMKLR1-negativer Tumor (B, D, F, H). n=6-9 ;  $\mu \pm$  SEM. Schwarze Signifikanzsterne: statistischer Vergleich (2-way-ANOVA; *repeated-measures*; Bonferroni post-hoc Test) von *scrambled* zu spezifischer Sonde. Graue Signifikanzsterne: statistischer Vergleich (2-way-ANOVA; *repeated-measures*; Bonferroni post-hoc Test) des Fluoreszenzsignals zum jeweiligen Zeitpunkt zu dem Fluoreszenzsignal nach 10 min. **A/B:** ITCC-AHX-CG34. CG35: spezifische Sonde. CG 63: *scrambled* Sonde. **C/D:** ITCC-TTDS-CG36. CG49: spezifische Sonde. CG 79: *scrambled* Sonde. **E/F:** ITCC-PEG11-CG34. CG75: spezifische Sonde. CG 81: *scrambled* Sonde. **G/H:** ITCC-LysCap-CG34. CG77: spezifische Sonde. CG 80: *scrambled* Sonde.

CG49 erreichte nach 6 h ein *Ratio* von 1,43, wobei dessen *scrambled*-Variante CG79 nach 24 h ein Signal von 1,33 aufwies. Nach 24 h zeigte die *scrambled*-Sonde CG79 sogar in SW13-Tumoren eine signifikante Anreicherung über die Zeit und bindet somit unspezifisch (Abb. 32C, D). Die vergleichsweise hydrophilste Variante CG75 erreichte nach 6 h ein *Ratio* von 2,07 in den DU4475-Tumoren, wobei dessen *scrambled*-Peptid CG81 zu diesem Zeitpunkt mit einem *Ratio* von 1,11 keine Anreicherung bewirkt (Abb. 32E, F). Sowohl CG75 als auch CG81 reicherten sich nach 3 und 6 h im *Target*-negativen SW13-Tumor an, allerdings lagen deren *Ratios* mit ca. 1,4 deutlich unter dem CG75-Signal in DU4475-Tumoren. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass auch CG75 *Target*-selektiv bindet.

In Abb. 33 ist die zeitliche Anreicherung des *Target*-selektiven CG77 und dessen *scrambled*-Variante CG80 in der identischen Maus, jeweils in DU4475- und SW13-Tumoren, exemplarisch aufgezeigt.



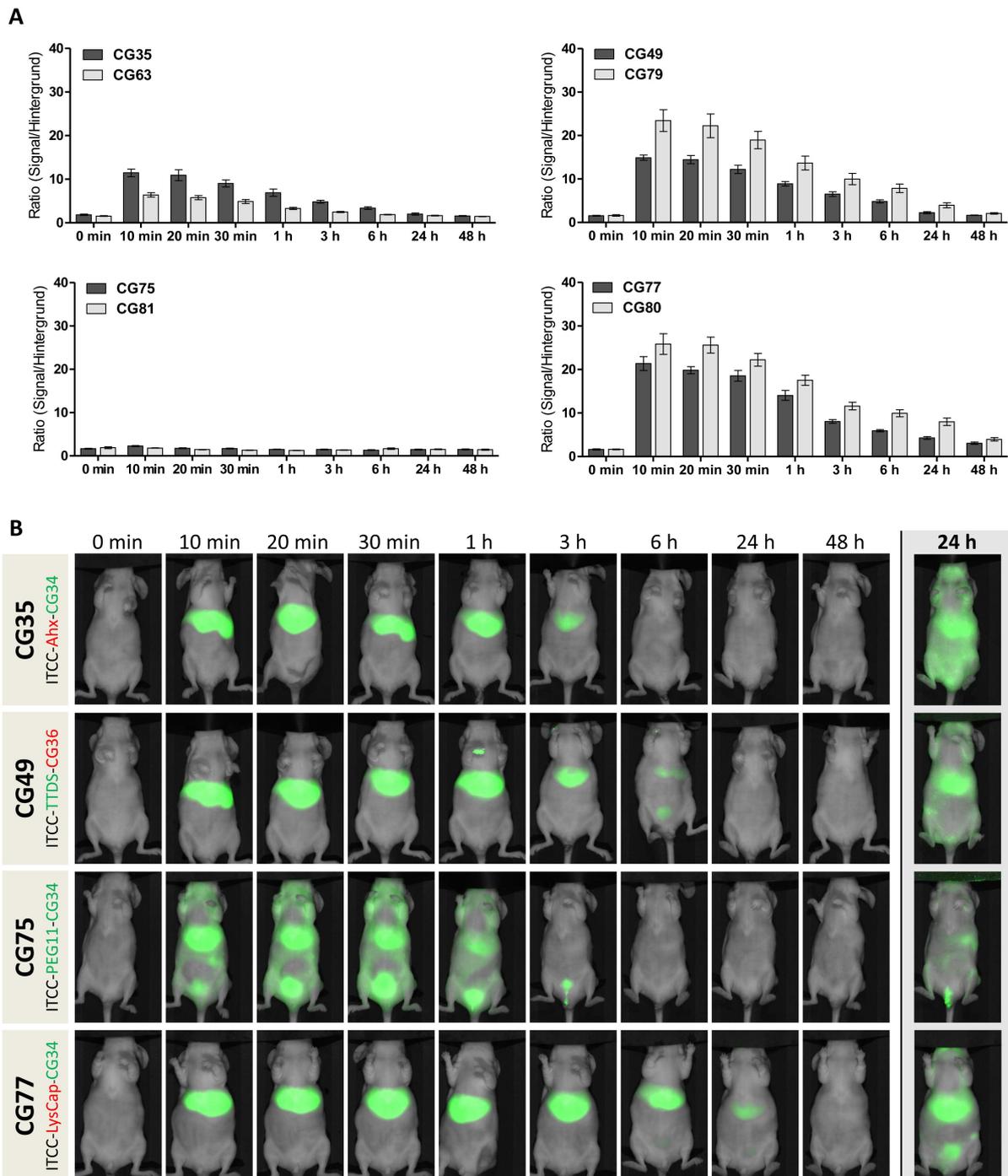
**Abb. 33:** Exemplarisches Beispiel der zeitlich-abhängigen Anreicherung der Chemerin-Sonden CG77 und CG80 in tumortragenden NMRI nu/nu im NIRF-Imaging. grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Vor der Injektion erfolgte die initiale Messung (0 min). Nach der Injektion von 1 nmol Konjugat (i.v.) wurden nach folgenden Zeitpunkten die Akkumulation der Sonden (dargestellt in grün) detektiert: 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h sowie 48 h. Nach der Messung kann mittels Pearl Software die Anreicherung der Sonden im Tier visualisiert werden. Um den zeitlichen Verlauf der Biodistribution zu verdeutlichen, wurden die Bilder je Maus mit konstanter Intensität (gleicher Verstärkungsgrad; *Gain*) dargestellt. Nach 24 h wurde das Signal maximiert, um den Verbleib der Konjugate zu bestimmen. Auf die quantitative Auswertung hat die Verstellung des *Gains* keinen Einfluss. Die NMRI nu/nu Mäuse tragen hier auf der rechten Flanke entweder einen SW13- (CMKLR1-negativer Tumor) oder einen DU4475-Tumor (CMKLR1-positiv). CG77: spezifische Sonde. CG 80: *scrambled* Sonde.

Die Zunahme des Signals von CG77 im DU4475-Tumor über die Zeit wird hier abgebildet. Weder mittels *scrambled*-Sonde im DU4475-Tumor noch mit CG77/CG80 im SW13-Tumor konnte ein Signal detektiert werden.

In Abb. 34 sind die quantifizierten Lebersignale aller Sonden (Abb. 34A), sowie vier exemplarische ventrale Abbildungen nach Applikation der spezifischen Konjugate (Abb. 34B) dargestellt. Die ventralen *Imagings* der *scrambled* Sonden können der Abb. 58 im Anhang entnommen werden. Das vergleichsweise hydrophilste Konjugatpaar CG75/CG81 zeigte die geringste Leberanreicherung (*Ratio* CG75: 2,28 bzw. *Ratio* CG81: 1,83). Außerdem waren dies die einzigen Sonden, bei denen 10 min nach Applikation neben dem Lebersignal ein Blasensignal visualisiert werden konnte (Abb. 34B). Dies spricht für eine vergleichsweise schnelle Ausscheidung von CG75/CG81 („*clearance*“).

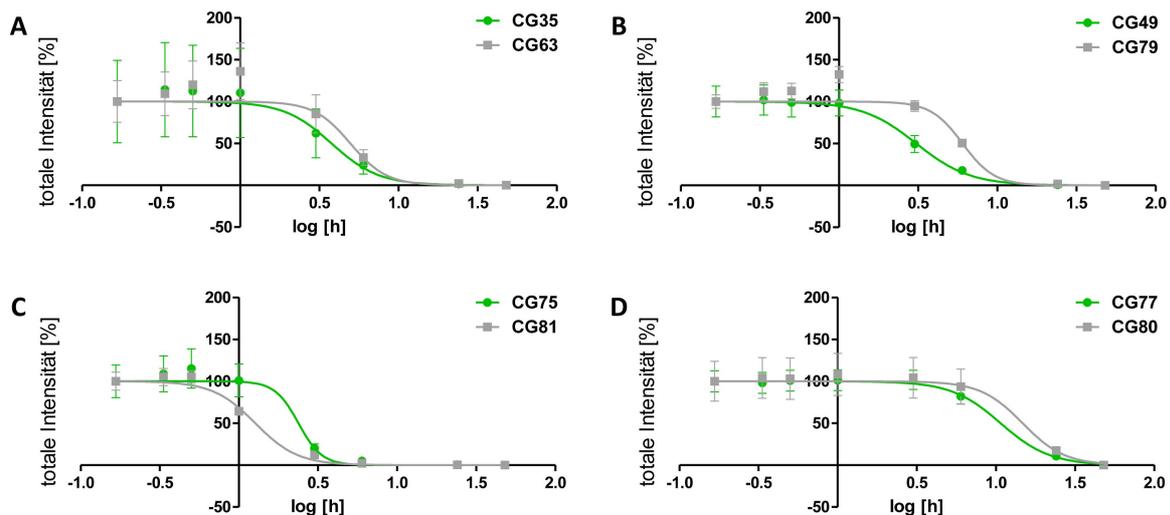
CG77/CG80 als hydrophobste der acht Konjugatpaare wies mit einem Leber-zu-Hintergrund-*Ratio* von 21,34 bzw. 25,82 nach 10 min ein deutliches Lebersignal auf, welches mit der Zeit eine geringe Abnahme zeigte. Beim Erhöhen des Verstärkungsgrades konnte dieses noch nach 24 h nachgewiesen werden. Die Quantifizierung verdeutlicht diesen Sachverhalt, hier lag das Verhältnis bei 4,27 bzw. 7,98 (Abb. 34A). Auch CG35/CG63 sowie CG49/CG79 zeigen ein robustes Lebersignal und konnten dort nach 24 h sichtbar gemacht werden (*Ratios*; CG35: 2,01; CG63: 1,66; CG49: 2,26; CG79: 3,94). CG49 sowie CG79 verblieben somit vergleichsweise länger in der Leber als CG35/CG63.

Die direkte Gegenüberstellung der Lebersignale der *scrambled* und spezifischen Konjugate zeigten nur geringe Unterschiede in den *Ratios*. Hier lagen die Signale von CG79 und CG80 höher als die der entsprechenden spezifischen Sonden und die Signale von CG63 niedriger.



**Abb. 34: Analyse der Anreicherung der vier spezifischen Fluorophor-markierten Chemerin-Sonden und *scrambled* Sonden in der Leber.** grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Als Fluoreszenzfarbstoff diente ITCC (Indotricarbocyanin). Zur Kopplung von ITCC an die Sonden wurden verschiedene Linker (AHX: CG35/CG63, TTDS: CG49/CG79, PEG11: CG75/CG81, LysCap: CG77/CG80) verwendet. Als Negativkontrolle zu den spezifischen Chemerin-Sonden wurden *scrambled*-Sonden mit vertauschter Aminosäuresequenz eingesetzt. Vor der Injektion erfolgte die initiale Messung (0 min). Nach der Injektion von 1 nmol Konjugat (i.v.) wurden nach folgenden Zeitpunkten die Akkumulation der Sonden detektiert: 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h sowie 48 h. CG35: spezifische Sonde. CG 63: *scrambled* Sonde zu CG35. CG49: spezifische Sonde. CG 79: *scrambled* Sonde zu CG49. CG75: spezifische Sonde. CG 81: *scrambled* Sonde zu CG75. CG77: spezifische Sonde. CG 80: *scrambled* Sonde zu CG77. **A:** Quantitative Analyse der Anreicherung der vier spezifischen Fluorophor-markierten Chemerin-Sonden und *scrambled* Sonden in der Leber. Nach der Messung kann mittels Pearl Software die Anreicherung der Sonden im Tier berechnet werden.  $n=6-9$ ;  $\mu \pm$  SEM. **B:** Exemplarisches Beispiel der zeitlich-abhängigen Anreicherung der spezifischen Chemerin-Sonden in der Leber. Um den zeitlichen Verlauf der Biodistribution zu verdeutlichen, wurden die Bilder je Maus mit konstanter Intensität (gleicher Verstärkungsgrad; *Gain*) dargestellt. Nach 24 h wurde das Signal maximiert, um den Verbleib der Konjugate zu visualisieren. Auf die quantitative Auswertung hat die Verstellung des *Gains* keinen Einfluss.

Weiterhin wurde die Fluoreszenzintensität der gesamten Maus (dorsal und ventral) zu jedem Zeitpunkt ermittelt und die systemischen Halbwertszeiten ( $T_{1/2}$ ) für jedes Konjugat bestimmt (Abb. 35; Tab. 25: „Total  $T_{1/2}$ “). Dieses Verfahren wurde ebenso mit den Lebersignalen (Abb. 34) durchgeführt und die  $T_{1/2}$ -Werte der Leber in Tab. 25 („Leber  $T_{1/2}$ “) gelistet. Hier konnte das höchste ermittelte Fluoreszenzsignal 10 min nach Applikation abgelesen werden (Leber max. bzw. Total max.).



**Abb. 35: Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte zur Anreicherung der vier spezifischen Fluorophor-markierten Chemerin-Sonden und *scrambled* Sonden im gesamten Tier.** Die Fluoreszenzaufnahme des gesamten Tieres (Mittelwert zwischen dorsaler und ventraler Aufnahme) wurde analysiert. Als Fluoreszenzfarbstoff diente ITCC (Indotricarbocyanin). Zur Kopplung von ITCC an die Sonden wurden verschiedene Linker (AHX: CG35/CG63, TTDS: CG49/CG79, PEG11: CG75/CG81, LysCap: CG77/CG80) verwendet. Als Negativkontrolle zu den spezifischen Chemerin-Sonden wurden *scrambled*-Sonden mit vertauschter Aminosäurenreihenfolge eingesetzt. Vor der Injektion erfolgte die initiale Messung (0 min). Die Zeit ( $t$  in h) ist hier auf der x-Achse logarithmisch aufgetragen. Nach der Injektion von 1 nmol Konjugat (i.v.) wurden nach folgenden Zeitpunkten die Akkumulation der Sonden detektiert: 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h sowie 48 h. Nach der Messung kann mittels Pearl Software die Anreicherung der Sonden im Tier berechnet werden.  $n=6-9$ ;  $\mu \pm$  SEM. **A:** ITCC-AHX-CG34. CG35: spezifische Sonde. CG 63: *scrambled* Sonde. **B:** ITCC-TTDS-CG36. CG49: spezifische Sonde. CG 79: *scrambled* Sonde. **C:** ITCC-PEG11-CG34. CG75: spezifische Sonde. CG 81: *scrambled* Sonde. **D:** ITCC-LysCap-CG34. CG77: spezifische Sonde. CG 80: *scrambled* Sonde.

Die so errechneten  $T_{1/2}$ -Werte gaben eine Aussage zur Biodistribution der Chemerin-Sonden. So lag der  $T_{1/2}$ -Wert der Leber, mit Ausnahme der hydrophilsten Sonden (CG75/CG81), zwischen 0,9 und 2,1 h. Die Zirkulationsdauer der hydrophoben Konjugate CG77/CG80 im gesamten Tier war mit  $T_{1/2}$ -Werten von 10,7 h beziehungsweise 14,7 h am längsten. CG35/CG63 sowie CG49/CG79 wiesen hier mit  $T_{1/2}$ -Werten zwischen 3,1 und 6 h kürzere Zeiten auf. Die Zirkulationsdauer der hydrophilsten Konjugate CG75 und CG81 war am geringsten. Nach 1,3 h beziehungsweise 2,4 h war bei CG75/CG81 bereits die Hälfte der totalen Signalstärke erreicht.

Tab. 25: Bestimmung der systemischen Halbwertszeiten ( $T_{1/2}$ ) zur Anreicherung der vier spezifischen Fluorophor-markierten Chemerin-Sonden und *scrambled* Sonden im gesamten Tier und in der Leber. **grün**: hydrophile Peptide/Linker; **rot**: hydrophobe Peptide/Linker. Anhand des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzsignale konnten  $T_{1/2}$ -Werte der Leber und im gesamten Tier berechnet werden (Mittelwert zwischen dorsaler und ventraler Aufnahme).

	spezifisch			<i>scrambled</i>		
	Konjugat	Leber $T_{1/2}$ [h]	Total $T_{1/2}$ [h]	Konjugat	Leber $T_{1/2}$ [h]	Total $T_{1/2}$ [h]
ITCC-AHX-CG34	CG35	1,5	3,8	CG63	0,9	5,0
ITCC-TTDS-CG36	CG49	1,7	3,1	CG79	1,8	6,0
ITCC-PEG11-CG34	CG75	0,3	2,4	CG81	n.d.	1,3
ITCC-LysCap-CG34	CG77	1,5	10,7	CG80	2,1	14,7

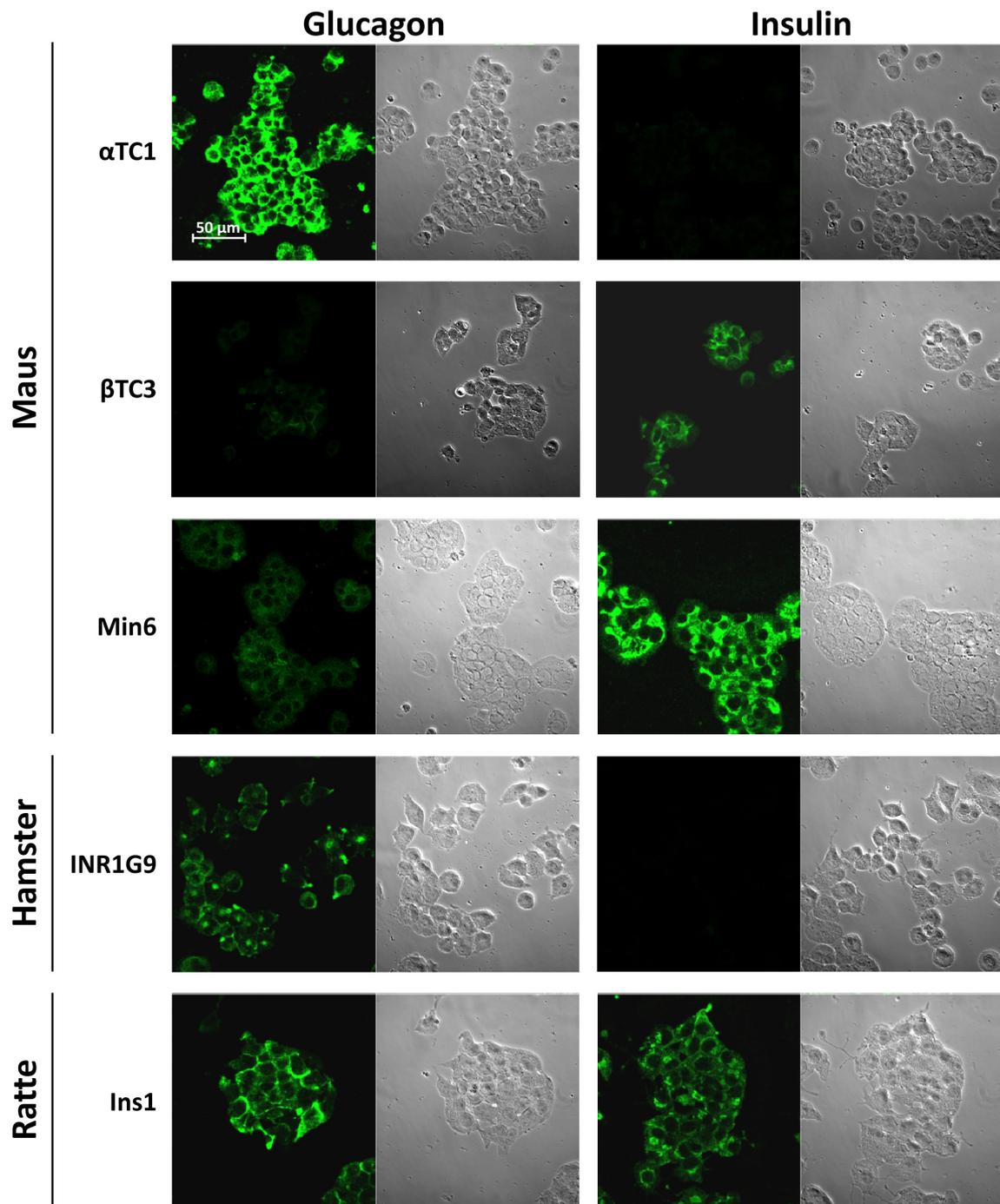
## 5.2. CMKLR1 IN DER GLUKOSEHOMÖOSTASE

Das CMKLR1-Rezeptorsystem ist sowohl in der Adipogenese als auch bei der Regulierung des Glukosemetabolismus involviert [156], [160], [162]. In vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde der Chemerin-Rezeptor CMKLR1 in Gewebeschnitten des humanen Pankreas in  $\alpha$ -Zellen nachgewiesen. Da  $\alpha$ -Zellen in ihrer Hauptfunktion über die Sekretion von Glucagon auf die Glukosehomöostase einwirken, sollte die Glugacon-regulatorische Funktion von CMKLR1 untersucht werden.

### *5.2.1. VALIDIERUNG VON PANKREATISCHEN NAGERZELLMODELLEN FÜR DIE INSULIN- UND GLUCAGON-SEKRETION*

Da keine humanen Zelllinien aus dem endokrinen Pankreas zur Verfügung standen, sollten zunächst verschiedene tumoröse Nagerzelllinien pankreatischen Ursprungs auf ihre physiologischen Funktionen hin untersucht werden.

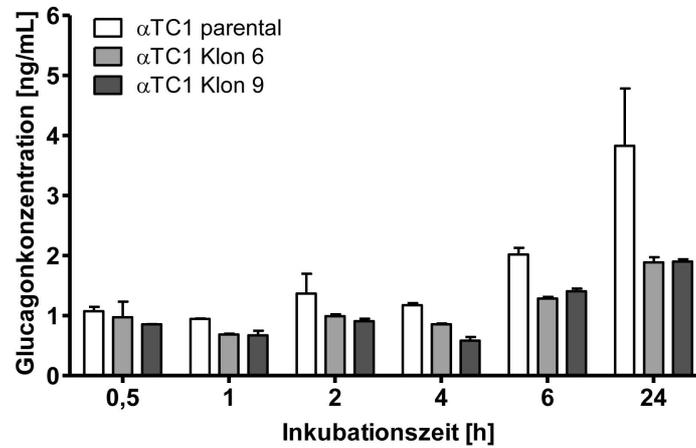
Hierfür wurden die, laut Literatur, ausschließlich Glucagon-exprimierenden Zelllinien  $\alpha$ TC1 und INR1G9, die ausschließlich Insulin-exprimierende Zelllinie  $\beta$ TC3 und die sowohl Glucagon als auch Insulin sekretierenden Zelllinien Min6 und Ins1 verwendet. Die Überprüfung der Insulin-beziehungsweise Glucagonexpression mittels Immunfluoreszenz bestätigt die beschriebenen Expressionsmuster (Abb. 36).



**Abb. 36: Expression von Insulin und Glucagon in pankreatischen Nagerzelllinien.** Immunfluoreszenz an Nagerzelllinien pankreatischen Ursprungs. Exemplarisches Beispiel. n=3. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: anti-Insulin (1:1000; Biotrend; aus Maus) bzw. anti-Glucagon (1:2000; Sigma; aus Maus). Als Negativ- bzw. Isotypkontrollen diente 1 % BSA in PBS sowie Mausserum in der äquivalenten Konzentration (1:4000), diese Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen. Als Sekundärantikörper diente *goat* anti-Maus-Cy2 (1:400).

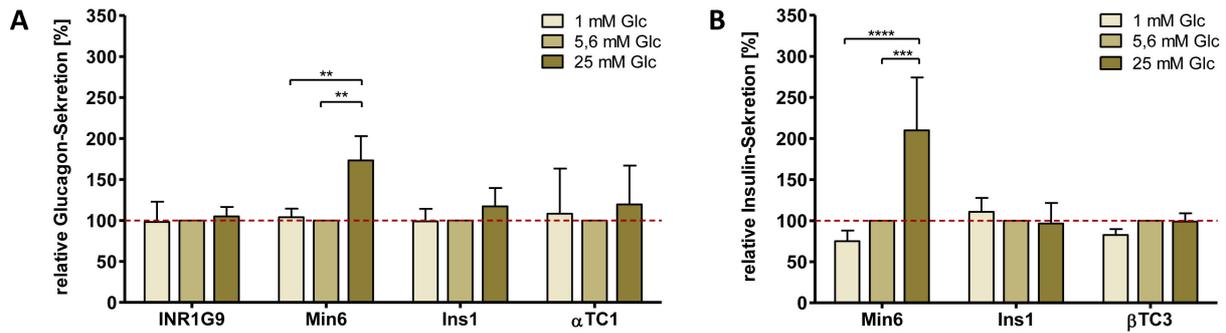
Da verschiedene  $\alpha$ TC1-Klone (parental, Klon 6, Klon 9) zur Verfügung standen, wurde die Glucagonsekretion der einzelnen Klone zu verschiedenen Zeitpunkten (0,5; 1; 2; 4; 6 sowie 24 h) analysiert. Abb. 37 zeigt, dass sich die basale Glucagonkonzentration der Klone 6 und 9 nach 24 h im Vergleich zu 30 min verdoppelt. Ein kontinuierlicher und damit physiologischer Anstieg der

Glucagonkonzentration konnte durch die parentale Zelllinie verzeichnet werden. Aus diesem Grund wurden für weitere Untersuchungen die parentalen  $\alpha$ TC1-Zellen eingesetzt.



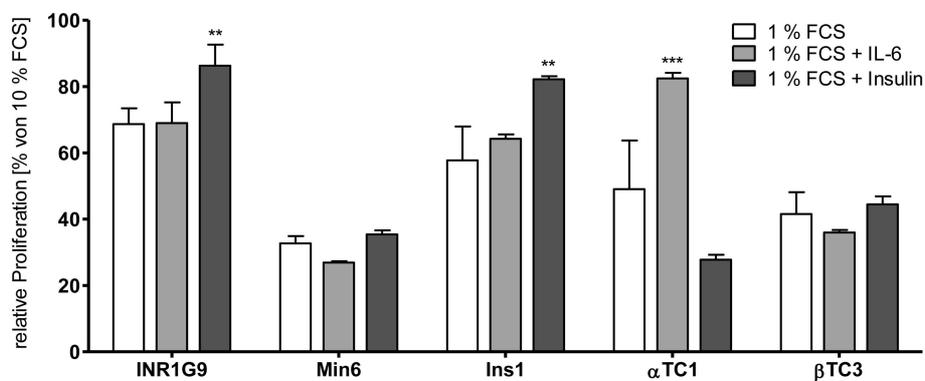
**Abb. 37: Abhängigkeit der Glucagonsekretion von verschiedenen  $\alpha$ TC1-Klonen von der Sekretionszeit.** Die Zellaussaat erfolgte in einer 10 cm Zellkulturschale in 10 mL Zellkulturmedium (RPMI mit 5,6 mM Glukose) und die Entnahme des Überstandes (200  $\mu$ L) zu den jeweiligen Zeitpunkten aus der gleichen Zellkulturschale. Die Analyse erfolgte mittels Glucagon-ELISA. Dargestellt ist  $\mu \pm$  SD von einem Experiment mit je zwei Replikaten.

Da die verwendeten Zelllinien tumorösen Ursprungs sind, war die Untersuchung der physiologischen Reaktion essentiell. Hierfür wurde zunächst die basale Glucagonsekretion in drei verschiedenen Glukosekonzentrationen (1 mM; 5,6 mM, 25 mM Glukose) gemessen, wobei 5,6 mM Glukose der physiologischen Plasmaglukosekonzentration entspricht [126]. Bei einer physiologischen Regulation wären bei hypoglykämischen Bedingungen hohe Glucagonwerte und niedrige Insulinwerte beziehungsweise bei hyperglykämischen Bedingungen niedrige Glucagonwerte und hohe Insulinwerte zu erwarten. Abb. 38 zeigt, dass außer Min6 keine der Zelllinien eine veränderte Hormonsekretion bei verschiedenen Glucagonkonzentrationen zeigt. Min6 weist bei 25 mM Glukose sowohl eine erhöhte Insulin-Sekretion (210 %) als auch erhöhte Glucagonwerte (173 %) auf.



**Abb. 38: Glucagon- und Insulinsekretion von Nagerzelllinien nach Stimulation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen.** Normalisiert wurden die Werte auf den Sekretionswert von 5,6 mM Glukose (= 100 %). Dargestellt ist  $\mu \pm$  SD. INR: n = 6; jeweils in Triplikaten; 3 h Inkubation in RPMI.  $\alpha$ TC1: n = 5; jeweils in Triplikaten; 3 h Inkubation in RPMI. Ins1: n = 3; jeweils in Triplikaten; 1 h Inkubation in KRBH. Min6: n = 3; jeweils in Triplikaten; 1 h Inkubation in KRBH.  $\beta$ TC3: n = 3; jeweils in Triplikaten; 1 h Inkubation in KRBH. 2-way-ANOVA (Bonferroni post-hoc Test). **A:** Glucagonsekretion. Die Analyse erfolgte mittels Glucagon-ELISA. **B:** Insulinsekretion. Die Analyse erfolgte mittels Insulin-ELISA.

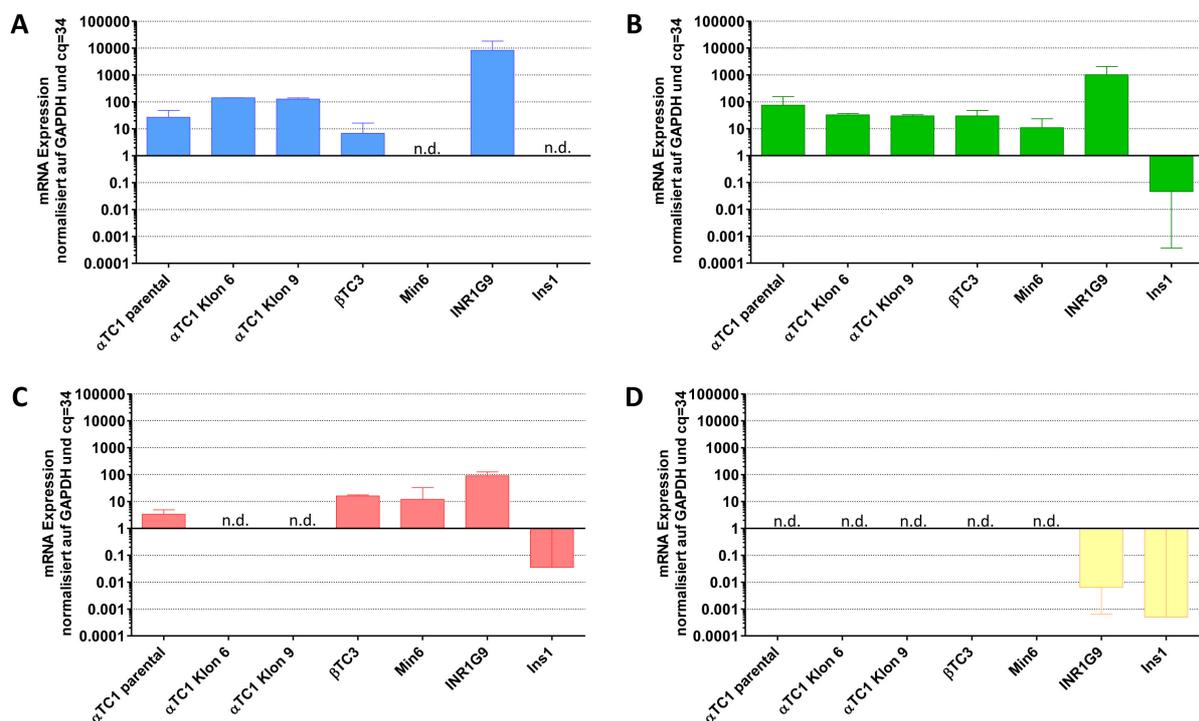
Neben den Sekretionsanalysen wurde die Änderung der Proliferation der pankreatischen Nagerzelllinien durch verschiedene Stimuli getestet. Als Positivkontrollen wurden hier Interleukin-6 (IL-6) sowie Insulin verwendet. Laut Literatur soll Insulin die Proliferation von  $\alpha$ TC1-Zellen steigern [176] und IL-6 einen proliferativen Effekt auf sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Zellen ausüben [177]. Die Untersuchung erfolgte in Medium mit 1 % FCS, da diese FCS-Konzentration eine minimierte, aber deutliche Proliferation sicherstellt und aus diesem Grund die Detektion von sowohl proliferationshemmenden als auch proliferationsinduzierenden Effekten möglich ist. Als Positivkontrolle diente das entsprechende Zellkulturmedium mit 10 % FCS. Abb. 39 zeigt, dass Insulin nach 96 h Inkubation einen pro-proliferativen Effekt auf INR1G9 (18 % Erhöhung zu 1 % FCS) und Ins1 (25 % Erhöhung zu 1 % FCS) hat. IL-6 wirkt sich proliferationsfördernd auf  $\alpha$ TC1 aus (33 % Erhöhung zu 1 % FCS).  $\beta$ TC3 und Min6 zeigten keine veränderte Proliferation durch die beiden Substanzen.



**Abb. 39: Wirkung von verschiedenen Substanzen auf die Proliferation von pankreatischen Nagerzelllinien nach 96 h Substanzinkubation.** Ein Mediumwechsel erfolgte 24 und 72 h nach Zellaussaat. Substanzen: 100 ng/mL IL-6; 1  $\mu$ M Insulin. Die Normalisierung erfolgte auf 10 % FCS (= 100 %). Die hier dargestellten Signifikanzen beziehen sich auf 1 % FCS. Die Messung erfolgte 1-4 h nach AlamarBlue-Zugabe. 1-way-ANOVA (Bonferroni post-hoc Test). n = 3-5; jeweils in Quadruplikaten;  $\mu \pm$  SD.

### 5.2.2. EINFLUSS DES CHEMERIN-CHEMERINREZEPTORSYSTEMS AUF DIE PHYSIOLOGISCHE FUNKTION IN PANKREATISCHEN NAGERZELLMODELLEN

Um einen möglichen Einfluss von Chemerin auf pankreatische Nagerzellmodelle nachweisen zu können, war es zuerst notwendig diese auf ihre Rezeptor-Expression hin zu untersuchen. Abb. 40 zeigt die mRNA-Expression der drei Chemerin-Rezeptoren, CMKLR1, CCRL2 und GPR1, sowie von Chemerin (Genbezeichnung: RARRES2) in verschiedenen Nagerzelllinien.



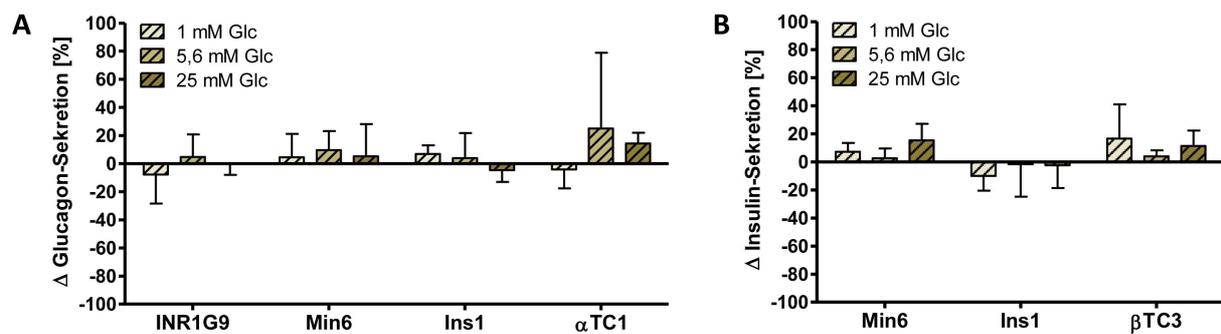
**Abb. 40: Expressionsanalyse von pankreatische Nagerzelllinien auf vier verschiedene Gene mittels quantitativer Real-Time PCR.** Normalisiert wurden die cq-Werte auf das Referenzgen GAPDH und den cq-Wert = 34 (entspricht dem Wert 1). n = 2-6; jeweils in Duplikaten;  $\mu \pm$  SD.  $\alpha$ TC1,  $\beta$ TC3, Min6 (Mauszelllinien): TaqMan Sonden. INR1G9 (Hamsterzelllinie): SybrGreen. Ins1 (Rattenzelllinie): TaqMan Sonden. **A:** CMKLR1. **B:** GPR1. **C:** CCRL2. **D:** RARRES2 (Gen für Chemerin). n.d.: nicht detektiert.

In pankreatischen Nagerzelllinien konnte eine mRNA-Expression von CMKLR1 in den drei  $\alpha$ TC1-Klonen (relative mRNA Expression [rmRNA-E]: 25-140) sowie in  $\beta$ TC3 (rmRNA-E: 7) nachgewiesen werden. In der Zelllinie Ins1 konnte keine CMKLR1-mRNA und nur geringe mRNA-Level an CCRL2 sowie GPR1 verzeichnet werden, wobei in INR1G9 die mRNA aller drei Chemerin-Rezeptoren vorhanden war. INR1G9 wies einen besonders hohen Gehalt an CMKLR1-mRNA auf (rmRNA-E: 8200).

Insgesamt konnte keine beziehungsweise wenig (rmRNA-E < 0,01) mRNA des Chemerin-codierenden Gens RARRES2 detektiert werden (rmRNA-E < 0,01; Abb. 40). Dieses Resultat be-

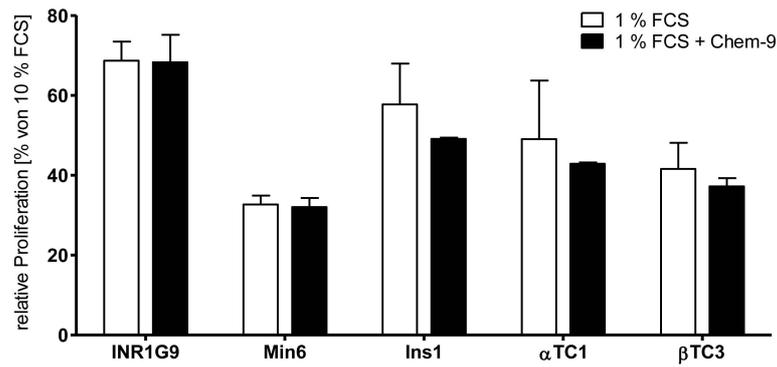
stättigt Tendenzen, die zuvor durch ELISA-Analysen ermittelt worden waren. Auch hier konnte in keinem der Überstände der getesteten Nagerzelllinien Chemerin nach 24 h Kultivierung in einer 80 % konfluenten Zellkulturschale nachgewiesen werden.

Die Detektion der mRNA könnte auf das Vorhandensein der Chemerin-Rezeptoren, insbesondere von CMKLR1, in den Nagerzelllinien auf Proteinebene hinweisen. Aus diesem Grund und anhand der Tatsache, dass diese Zellen teilweise physiologisch in der Proliferation reagierten (vgl. Kapitel 5.2.1), wurden mit ihnen ein Stimulationsversuch mit Chemerin-9 (Chem-9) durchgeführt. Ziel hierbei war die Untersuchung des Chem-9-Einflusses auf den Hormonhaushalt. Die Stimulation erfolgte mit Chem-9 in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. Für die Analyse wurden die Zellkulturüberstände geerntet und der Glucagon- und Insulingehalt bestimmt. Abb. 41 zeigt die Differenz des Hormongehaltes der mit Chem-9 stimulierten Proben zur entsprechenden Mediumkontrolle. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Sekretion ermittelt werden.



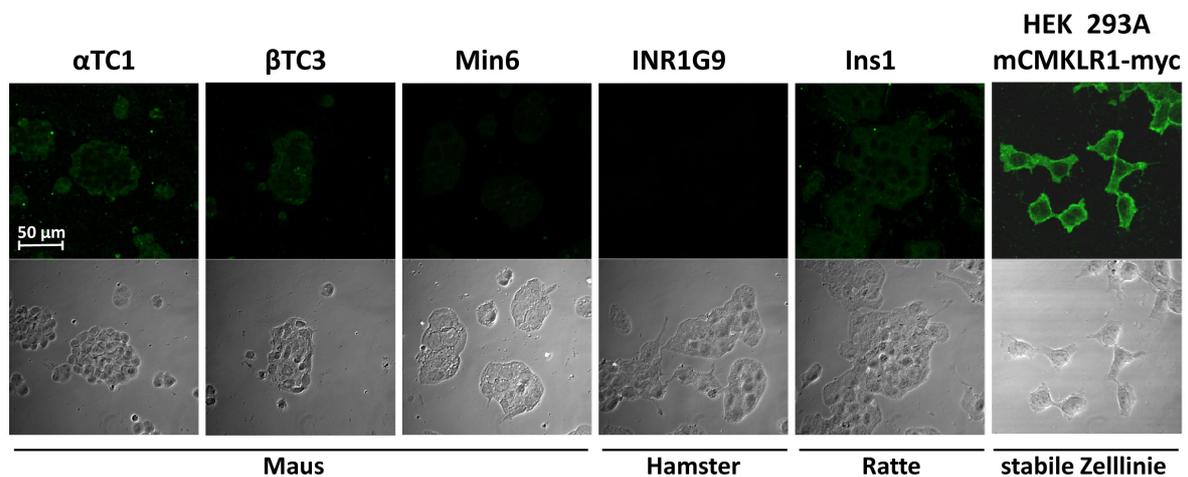
**Abb. 41: Differenz der Glucagon- und Insulinsekretion von Nagerzelllinien nach Stimulation mit Chemerin-9.** Dargestellt ist  $\mu \pm$  SD der Differenz der Hormonsekretion im Bezug auf die jeweilige Glukosekonzentration (Resultate aus der Sekretion mit Chemerin substrahiert mit denen der Sekretion ohne Chemerin). INR: n = 6; jeweils in Triplikaten; 3 h Inkubation in RPMI.  $\alpha$ TC1: n = 5; jeweils in Triplikaten; 3 h Inkubation in RPMI. Ins1: n = 3; jeweils in Triplikaten; 1 h Inkubation in KRBH. Min6: n = 3; jeweils in Triplikaten; 1 h Inkubation in KRBH.  $\beta$ TC3: n = 3; jeweils in Triplikaten; 1 h Inkubation in KRBH. 1-way-ANOVA (Bonferroni post-hoc Test). **A:** Glucagonsekretion. Die Analyse erfolgte mittels Glucagon-ELISA. **B:** Insulinsekretion. Die Analyse erfolgte mittels Insulin-ELISA.

Um zu überprüfen, ob Chem-9 einen Einfluss auf die Proliferation ausübt, wurde ein Proliferationsassay mit Chem-9 durchgeführt (Abb. 42). Bei keiner der getesteten Zelllinien resultierte ein signifikanter Effekt von Chem-9 im Vergleich zur Kontrolle (1 % FCS).



**Abb. 42: Wirkung von Chemerin-9 auf die Proliferation von pankreatischen Nagerzelllinien nach 96 h Substanzinkubation.** Ein Mediumwechsel erfolgte 24 und 72 h nach Zellaussaat. 1  $\mu$ M Chem-9 wurde eingesetzt. Die Normalisierung erfolgte auf 10 % FCS (= 100 %). Die hier angewandte Statistik bezieht sich auf 1 % FCS. Messung erfolgte 1-4 h nach AlamarBlue-Zugabe. 1-way-ANOVA (Bonferroni post-hoc Test). n = 3-5; jeweils in Quaduplikaten;  $\mu \pm$  SD.

Zur Abschätzung der Chemerin-Rezeptor-Lokalisation auf der Zelloberfläche, wurden die Zelllinien mit einem anti-Maus-CMKLR1-Antikörper gefärbt. Der hier verwendete Antikörper war erst nach den funktionellen Analysen verfügbar und konnte aus diesem Grund nicht vorher zum Einsatz kommen. Antikörper gegen den Ratten- und Hamster-Rezeptor sowie gegen CCRL2 und GPR1 waren nicht verfügbar. Aufgrund der hohen Homologie von CMKLR1 in Nagern (zwischen 84,1 % und 89,5 %; vgl. Anhang; Abb. 61) wurden die Zelllinien INR1G9 (Hamster) sowie Ins1 (Ratte) ebenfalls mit dem murinen Antikörper gefärbt.



**Abb. 43: Expression von CMKLR1 in pankreatischen Nagerzelllinien.** Immunfluoreszenz an Nagerzelllinien pankreatischen Ursprungs. HEK mCMKLR1-myc: stabil transfizierte HEK 293A Zelllinie mit dem murinen CMKLR1. Exemplarisches Beispiel. n=3. Als primär Antikörper wurde anti-CMKLR1 (1:10; Biozol; aus Ratte) verwendet. Als Negativ- bzw. Isotypkontrolle diente 1 % BSA in PBS sowie Rattenserum in der äquivalenten Konzentration (1:100), diese Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen. Als Sekundäntikörper diente *goat* anti-Ratte-Cy2 (1:200).

Abb. 43 zeigt ein exemplarisches Beispiel für die CMKLR1-Färbung an den Nagerzellmodellen sowie einer mCMKLR1 stabil transfizierten HEK 293A-Zelllinie als Positivkontrolle. In keiner der

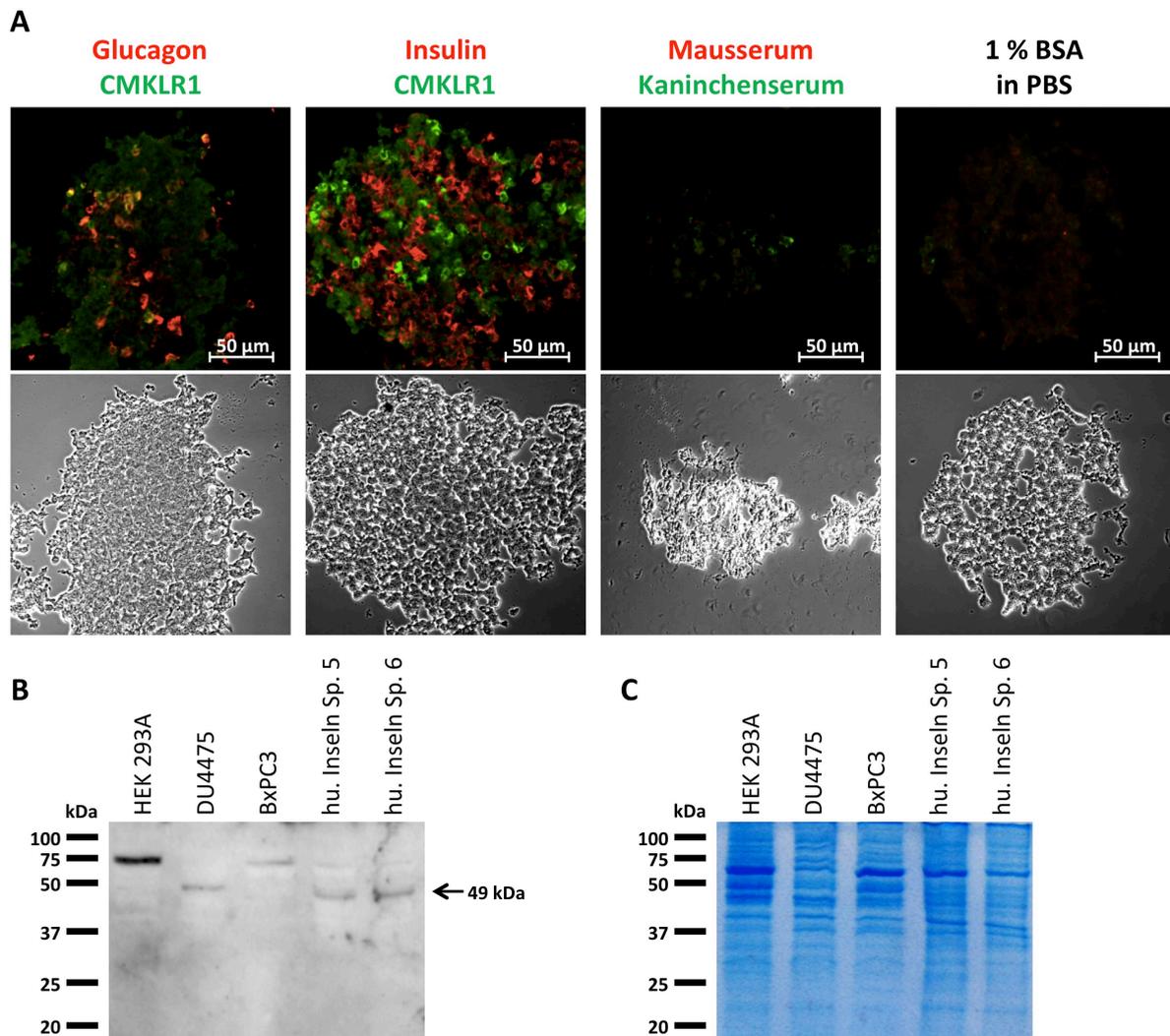
getesteten pankreatischen Zelllinien konnte CMKLR1 nachgewiesen werden. Der hier verwendete Antikörper zeigte an dem stabil transfizierten Klon ein deutliches membranständiges Signal, was die Detektierbarkeit von mCMKLR1 mit dem hier verwendeten Antikörper bestätigt.

### 5.2.3. EINFLUSS DES CHEMERIN-CHEMERINREZEPTORSYSTEMS AUF DIE PHYSIOLOGISCHE FUNKTION VON PRIMÄREN PANKREATISCHEN INSELZELLEN

Wie in Kapitel 5.2.2 dargestellt, konnte mit den pankreatischen Nagerzelllinien kein Effekt von Chem-9 auf die Glucagon- oder Insulinsekretion nachgewiesen werden. Der Einfluss von Chem-9 auf den Glukosestoffwechsel wurde daher an primären humanen pankreatischen Inseln untersucht (tebu-bio). Pankreatische Inseln sind kleine Mikroorgane, die für *in vitro*-Experimente der Biologie des humanen Organismus am nächsten und im Gegensatz zu den pankreatischen Nagerzellmodellen nicht tumorösem Ursprungs sind.

Zur funktionellen Charakterisierung der primären Inseln wurde die Proteinexpression von Glucagon, Insulin und CMKLR1 mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Aufgrund der unterschiedlichen Herkunftsspezies der Antikörper konnte die Färbung an CMKLR1 mit Glucagon ( $\alpha$ -Zellen) beziehungsweise Insulin ( $\beta$ -Zellen) kombiniert werden.

Analog zu Abb. 11 (Kapitel 1.4.4) konnte auch hier eine Ko-Lokalisation von CMKLR1 und den Glucagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen verzeichnet werden (gelbe Überlagerung). Insulinproduzierende  $\beta$ -Zellen zeigten keine Ko-Lokalisation mit CMKLR1 (Abb. 44A). Dieses Resultat bestätigt vorherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, welche zur Hypothese, CMKLR1 könne die Glucagonsekretion regulieren, im Wesentlichen beigetragen haben. Als Negativkontrollen dienten Seren aus den Spezies der Primärantikörper. Western Blot-Analysen bestätigten das Vorhandensein von humanem CMKLR1 in den Inseln (Abb. 44B). Als Positivkontrolle wurde hier die Mammakarzinomzelllinie DU4475 und als Negativkontrollen die Zelllinien HEK 293A sowie BxPC3 (Adenokarzinom des endokrinen Pankreas) getestet. Abb. 44B zeigt ausschließlich bei den humanen Inseln und bei der DU4475-Zelllinie ein positives Signal in der entsprechenden Laufhöhe (49 kDa).

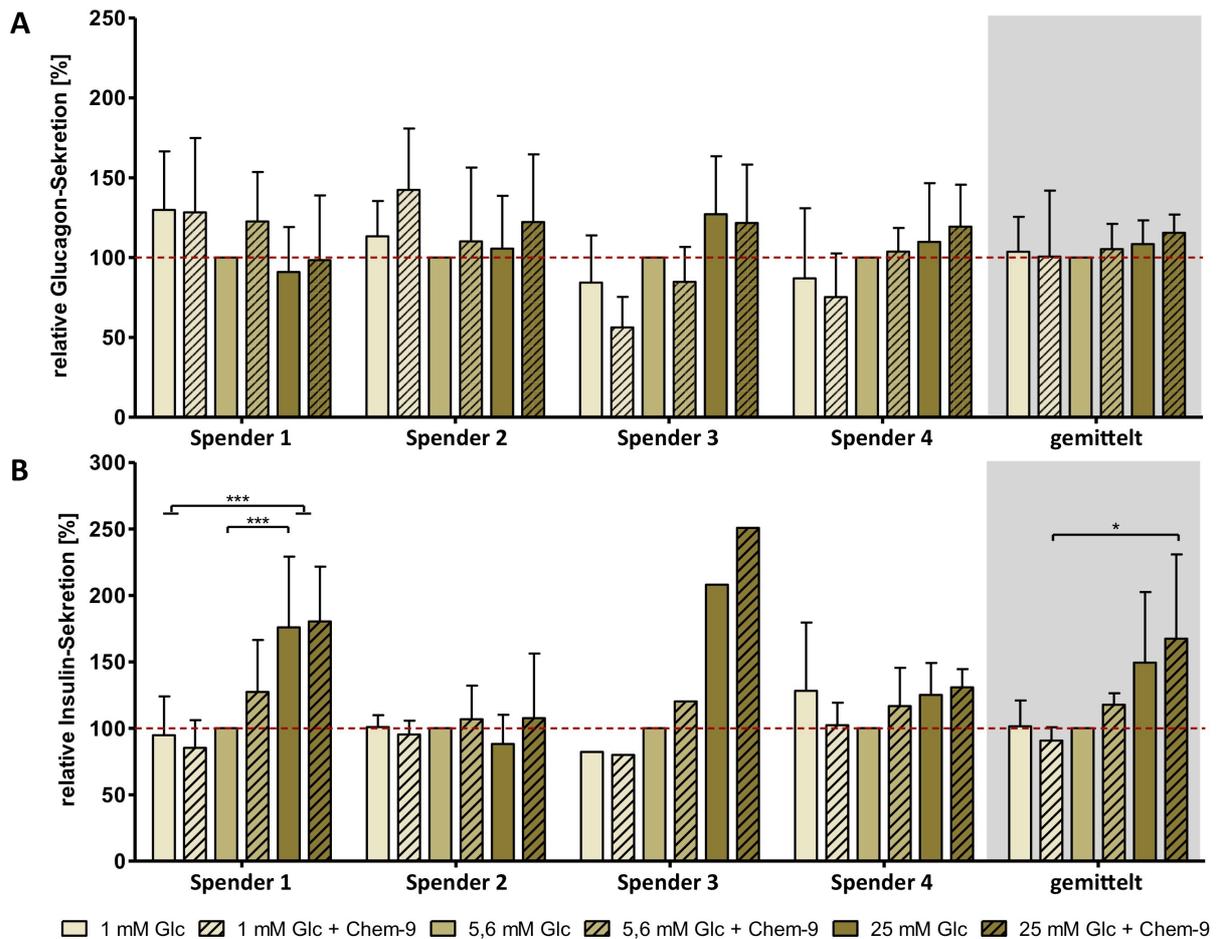


**Abb. 44: Expression von CMKLR1 in humanen pankreatischen Inseln.** **A:** Immunfluoreszenz an Kryogewebeschnitten von humanen Inseln von Spender 6. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: anti-CMKLR1 (1:65; #21-86; aus Kaninchen), anti-Insulin (1:800; Biotrend; aus Maus), anti-Glucagon (1:2000; Sigma; aus Maus). Als Negativkontrolle diente 1 % BSA in PBS sowie Maus- und Kaninchenserum in den äquivalenten Konzentrationen (Mausserum: 1:2000; Kaninchenserum: 1:1200). Als Sekundäntikörper dienten *goat* anti-Kaninchen-Cy2 (1:100) sowie *goat* anti-Maus-Cy3 (1:400). Ko-Lokalisationen werden aufgrund der roten und grünen Überlagerung als gelbe Fluoreszenz visualisiert. **B/C:** Zellysate von humanen Inseln (Spender 5 und 6) sowie humanen Kontrollzelllinien wurden auf zwei identische Polyacrylamid-Gele aufgetragen und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. **B:** Western Blot Analyse. Als Primäntikörper wurde anti-CMKLR1 (1:10.000; Cayman) und als Sekundäntikörper *goat* anti-Kaninchen-POD (1:10.000) verwendet. Die erwartete Proteingröße entspricht 49 kDa. **C:** Coomassie-Färbung des Western Blots (B).

Um den Chemerineffekt zu untersuchen, wurden die humanen pankreatischen Inseln mit Chem-9 stimuliert. Insgesamt wurden hierfür Inseln von vier Patienten bezogen. Um physiologische Reaktionen zu gewährleisten wurde darauf geachtet, dass die Spender nach Angaben von tebu-bio weder adipös waren (BMI < 30) noch Hinweise auf Diabetes vorlagen.

Inseln aus einem Patienten sind aufgrund ihrer natürlichen Diversität nicht identisch und können unterschiedliche prozentuale Anteile an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen enthalten. Weiterhin können sie sich in ihrer Größe, Hormonsekretion und Vitalität unterscheiden. Aus diesen Gründen wurde jede Stimulation auf die basale Hormonsekretion bei 5,6 mM Glukose vor der Stimulation normalisiert.

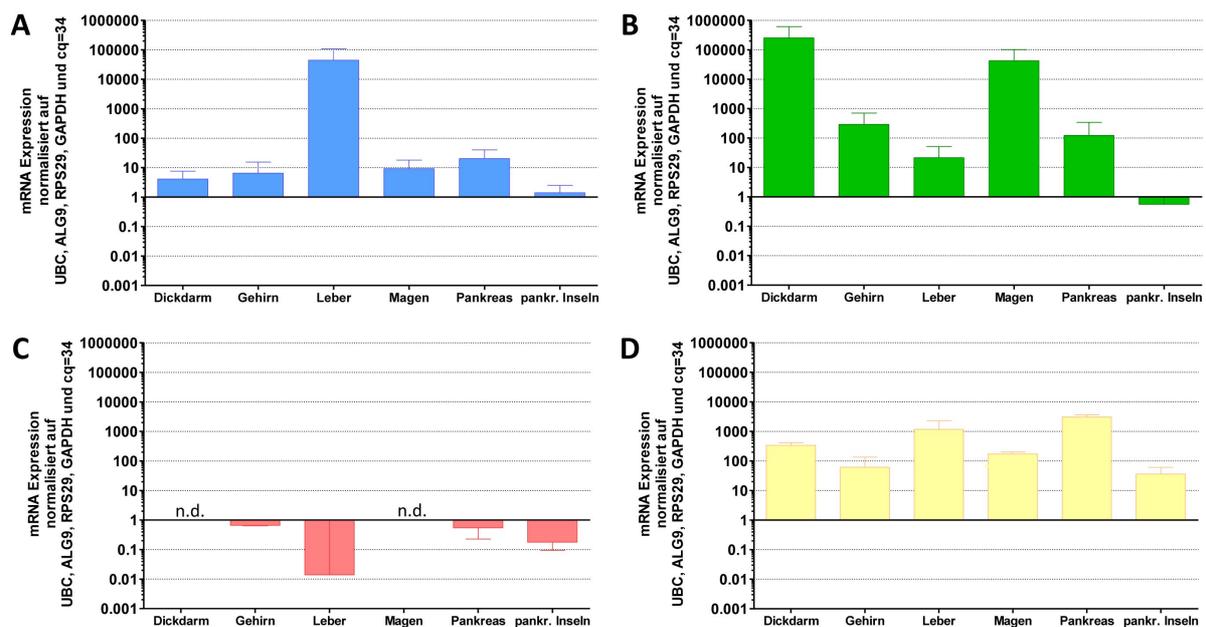
Abb. 45 zeigt die Ergebnisse der Stimulationsversuche und die gemittelten Werte der vier Patienten. Bei keinem der Spender konnte eine physiologische Glucagonsekretion in Abhängigkeit vom Glukosegehalt verzeichnet werden (Abb. 45A). Eine physiologische Glukose-abhängige Insulinsekretion wurde nur bei den Patienten 1 und 3 gemessen (Abb. 45B). Nach der Mittelung der Werte konnte weder in der Glucagon- noch in der Insulinsekretion ein signifikanter Einfluss von Chem-9 gezeigt werden.



**Abb. 45: Glucagon- und Insulinsekretion von humanen Inselzellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen und Chemerin-9 für 1 h.** Das Experiment wurde je Spender an verschiedenen Tagen (n), jeweils in Triplikaten durchgeführt. Bezogen wurden die Werte auf den jeweiligen basalen Sekretionswert (5,6 mM Glukose in KRBH für 1 h). Normalisiert wurde auf den Sekretionswert von 5,6 mM Glukose (= 100 %). Dargestellt ist  $\mu \pm$  SD. Spender 1: n = 5. Spender 2: n = 6. Spender 3: n = 1. Spender 4: n = 3. 2-way-ANOVA (Bonferroni post-hoc Test). **A:** Glucagonsekretion. Die Analyse erfolgte mittels Glucagon-ELISA. **B:** Insulinsekretion. Die Analyse erfolgte mittels Insulin-ELISA.

### 5.2.4. CHARAKTERISIERUNG DER EXPRESSION VON CHEMERIN-REZEPTOREN IN VERSCHIEDENEN SPEZIES

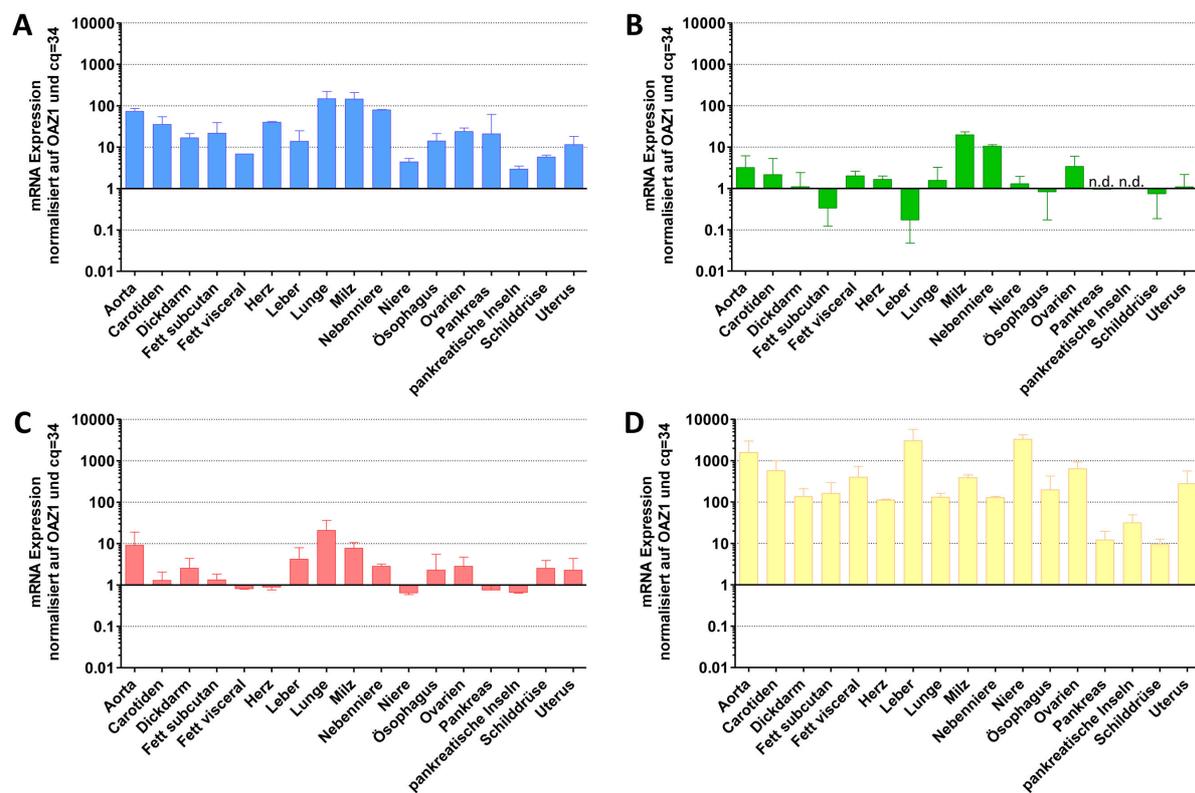
Weiterhin sollte die Expression der Chemerin-Rezeptoren in Geweben verschiedener Spezies analysiert werden. Abb. 46 zeigt die mRNA-Expression von CMKLR1 (A), GPR1 (B), CCRL2 (C) und RARRES2 (D) in humanen Geweben und in den humanen Inselzellen (tebu-bio). In jedem getesteten Gewebe wurde CMKLR1, GPR1 und RARRES2 mRNA nachgewiesen. Die höchste CMKLR1 mRNA-Expression wurde in der humanen Leber detektiert (rmRNA-E: 44.284). Die mRNA-Expression von CMKLR1 war im Pankreas höher als in den insulierten Inselzellen (Pankreas: rmRNA-E: 1,4; Inseln: rmRNA-E: 20). Insgesamt wurden sehr hohe GPR1-mRNA-Level im Dickdarm (rmRNA-E: 254.551) sowie im Magen (rmRNA-E: 42.436) detektiert. Das CCRL2-mRNA-Niveau war in allen humanen Proben gering (rmRNA-E unter 0,66). RARRES2 konnte in jedem der getesteten Gewebe mit einer relativen Expression über 36 nachgewiesen werden.



**Abb. 46: Expressionsanalyse an humanem Gewebe auf vier verschiedene Gene mittels quantitativer Real-Time PCR.** SybrGreen (CMKLR1, GPR1) sowie TaqMan (RARRES2, CCRL2) Sonden. Für die Präparation von RNA aus humanen Inselzellen wurden die Inseln der Patienten 3, 4, 5, 6, 7 und 8 verwendet. Normalisiert wurden die cq-Werte auf die Referenzgene UBC, ALG9, GAPDH und RPS29 sowie den cq-Wert = 34 (entspricht dem Wert 1). n = 2-3; jeweils in Duplikaten;  $\mu \pm$  SD. **A:** CMKLR1. **B:** GPR1. **C:** CCRL2. **D:** RARRES2 (Gen für Chemerin). n.d.: nicht detektiert.

Nachfolgend wurde die Expression von Chemerin und dessen Rezeptoren an den Modellorganismen Schwein und Maus untersucht. Die Schweine hierfür wurden uns freundlicherweise von Dr. Dipl. Biol. Thore Dietrich (Deutsches Herzzentrum Berlin) zur Verfügung gestellt. Die höchste CMKLR1 und CCRL2 mRNA-Expression wurde in der Aorta (CMKLR1-rmRNA-E: 73; CCRL2-

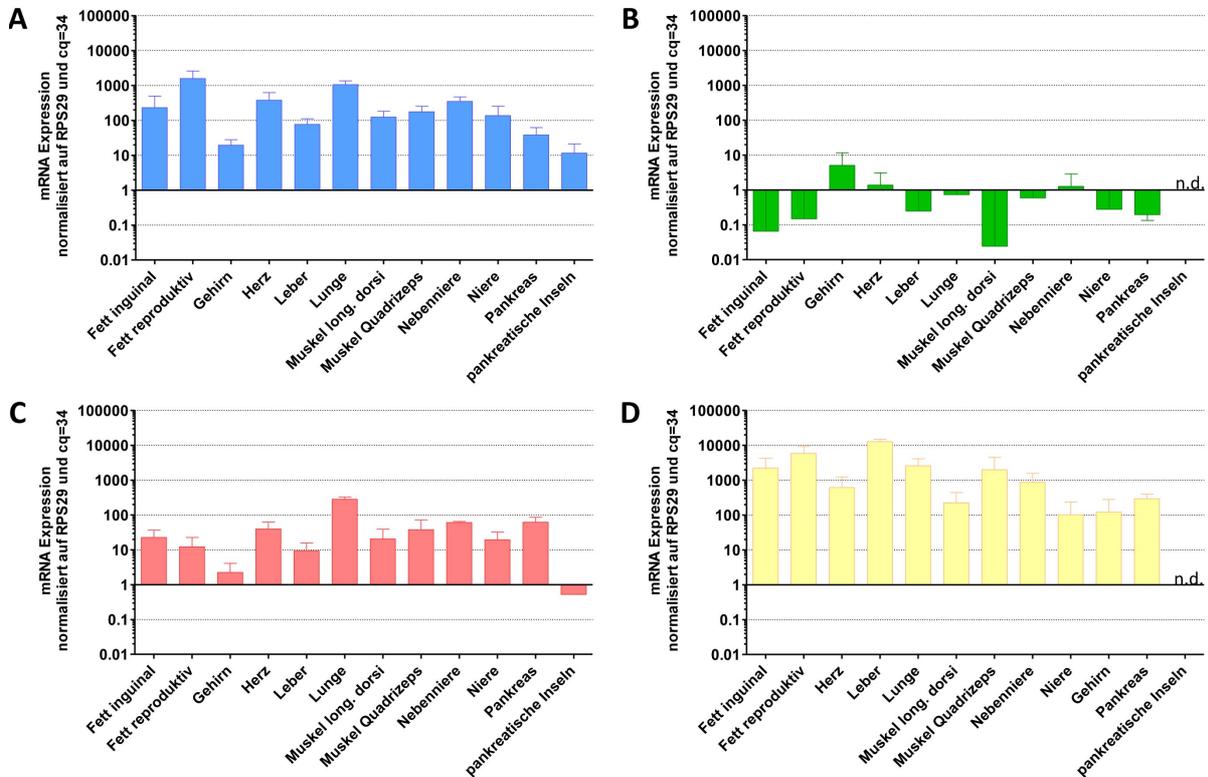
rmRNA-E: 9), in der Lunge (CMKLR1-rmRNA-E: 148; CCRL2-rmRNA-E: 21), in der Nebenniere (CMKLR1-rmRNA-E: 79; CCRL2-rmRNA-E: 2,8) und in der Milz (CMKLR1-rmRNA-E: 145; CCRL2-rmRNA-E: 7,7) nachgewiesen (Abb. 47 A und C). In Milz und Nebenniere konnte der größte Anteil an GPR1 detektiert werden (Milz: 19,7 rmRNA-E; Nebenniere: 10,4 rmRNA-E) (Abb. 47B). Im Pankreas war die CMKLR1-Expression höher als in den Inseln (Pankreas: 20,9 rmRNA-E; Inseln: 3 rmRNA-E). In jedem der analysierten Gewebe konnte mRNA des Liganden (RARRES2) gemessen werden (Abb. 47D).



**Abb. 47: Expressionsanalyse von Schweinegewebe auf vier verschiedene Gene mittels quantitativer Real-Time PCR.** SybrGreen-Analyse. Normalisiert wurden die cq-Werte auf das Referenzgen OAZ1 und den cq-Wert = 34 (entspricht dem Wert 1). n = 2-3; jeweils in Duplikaten;  $\mu \pm$  SD. **A:** CMKLR1. **B:** GPR1. **C:** CCRL2. **D:** RARRES2 (Gen für Chemoerin). n.d.: nicht detektiert.

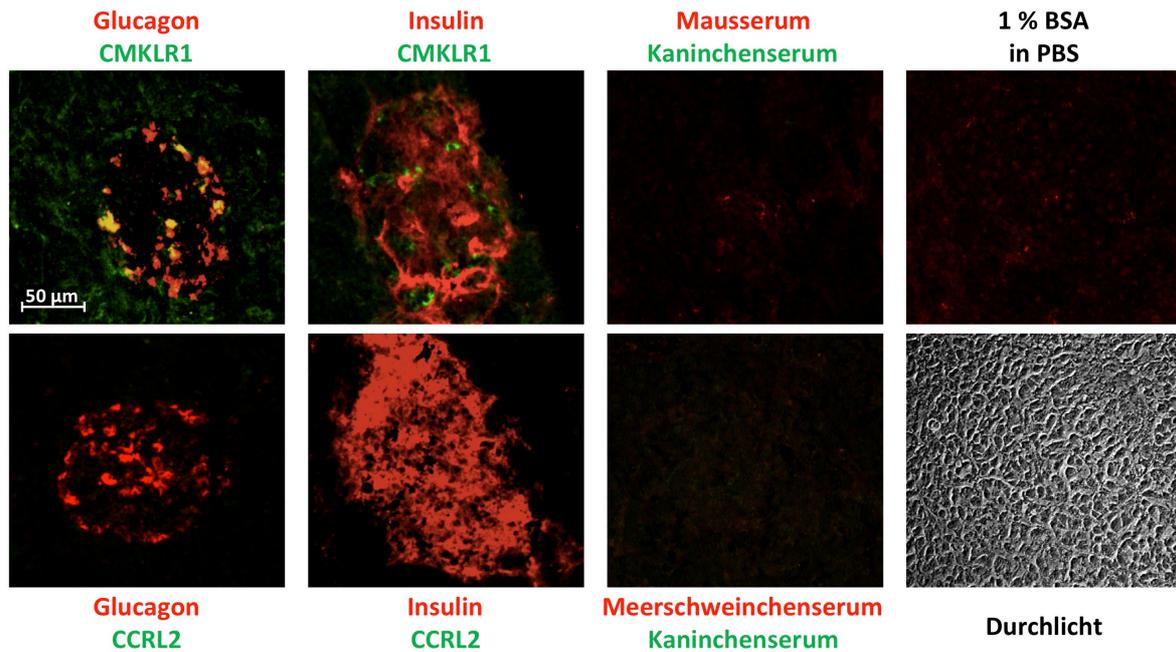
Die Ergebnisse zur mRNA-Expression an Mausegewebe zeigte die höchsten CMKLR1 und CCRL2 mRNA-Level im Fettgewebe (CMKLR1-rmRNA-E: 233-1591; CCRL2-rmRNA-E: 12-23) sowie in der Lunge (CMKLR1-rmRNA-E: 153; CCRL2-rmRNA-E: 283), im Muskel (CMKLR1-rmRNA-E: 124-177; CCRL2-rmRNA-E: 21-38), im Herz (CMKLR1-rmRNA-E: 377; CCRL2-rmRNA-E: 40), in der Niere (CMKLR1-rmRNA-E: 137; CCRL2-rmRNA-E: 19,5) und Nebenniere (CMKLR1-rmRNA-E: 351; CCRL2-rmRNA-E: 61) (Abb. 48 A, C). Auch hier wurde ein höherer CMKLR1 mRNA-Gehalt im Pankreas im Vergleich zu den pankreatischen Inseln gemessen (Pankreas: 38 rmRNA-E; Inseln: 11,5 rmRNA-E). Mit Ausnahme der pankreatischen Inseln konnte in jedem getesteten Ge-

webe RARRES2 detektiert werden (Abb. 48D). Insgesamt wurden geringe Mengen an GPR1 mRNA bestimmt (Abb. 48B)



**Abb. 48: Expressionsanalyse von Mausgewebe auf vier verschiedene Gene mittels quantitativer Real-Time PCR. TaqMan-Analyse.** Normalisiert wurden die cq-Werte auf die Referenzgene GAPDH und RPS29 sowie den cq-Wert = 34 (entspricht dem Wert 1). n = 3-4; jeweils in Duplikaten;  $\mu \pm$  SD. **A:** CMKLR1. **B:** GPR1. **C:** CCRL2. **D:** RARRES2 (Gen für Chemerin). n.d.: nicht detektiert.

Um die Expression von CMKLR1 auf Proteinebene zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen an Pankreasgewebeschnitten durchgeführt. Da keine funktionalen spezifischen Antikörper gegen Schweine- und Mausgewebe vorhanden waren, beschränkte sich diese Analyse auf humane Gewebeproben. Abb. 49 zeigt eine Ko-Lokalisation von CMKLR1 und Glucagon ( $\alpha$ -Zellen) im humanen Pankreas. CCRL2 konnte dort nicht nachgewiesen werden. Als Negativkontrollen dienten Seren, welche der jeweiligen Ursprungsspezies des Primärantikörpers entsprachen sowie 1 % BSA in PBS.



**Abb. 49: Expression von CMKLR1 und CCRL2 in humanem Pankreas.** Immunfluoreszenz an Kryo-Gewebeschnitten von humanem Pankreas. Exemplarisches Beispiel. n=2. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: anti-CMKLR1 (1:65; #21-86; aus Kaninchen), anti-CCRL2 (1:500; Sigma; aus Kaninchen), anti-Insulin (1:1000; Dako; aus Meerschweinchen), anti-Glucagon (1:2000; Sigma; aus Maus). Als Negativkontrolle dienten 1 % BSA in PBS sowie Maus-, Meerschweinchen- bzw. Kaninchenserum in den äquivalenten Konzentrationen (Mausserum: 1:4000; Meerschweinchenserum: 1:1080; Kaninchenserum: 1:2400). Als Sekundärantikörper dienten *goat* anti-Kaninchen-Cy2 (1:100), *goat* anti-Meerschweinchen-Cy3 (1:200) sowie *goat* anti-Maus-Cy3 (1:400). Ko-Lokalisationen werden aufgrund der roten und grünen Überlagerung als gelbe Fluoreszenz visualisiert.

## 6. DISKUSSION

### 6.1. CHEMERIN-REZEPTOREN IN TUMOREN

Chemerin und dessen Rezeptor CMKLR1 wurden bereits mit der Tumorentwicklung in Melanomen, Plattenepithelkarzinomen, Tumoren der Lunge und des Dickdarms in Zusammenhang gebracht [113], [115], [116]. So wurden sowohl Tumor-suppressive [113] als auch -progressive [114], [118], [119] Einflüsse des Chemerin-Rezeptorsystems festgestellt. Ziel dieser Dissertation war es, CMKLR1 als mögliche Zielstruktur für die Tumordiagnostik genauer zu untersuchen und zu validieren.

#### *6.1.1. DER CHEMERIN-REZEPTOR CMKLR1 ALS TUMORTARGET IM MAMMAKARZINOM*

Eine Überexpression von CMKLR1 im ösophagialen Plattenepithelkarzinom und im pankreatischen Adenokarzinom im Vergleich zum Normalgewebe wurde bereits gezeigt [120]. CMKLR1 wäre aufgrund seiner Lokalisation an der Zellmembran ein geeignetes Tumortarget, da ein optimaler Zugang von Liganden/Sonden über den systemischen Kreislauf und die parazelluläre Diffusion möglich sein könnte.

Zur Klärung, welche Tumorentitäten und Tumorzelllinien als Modell infrage kommen, wurde zunächst eine Auswahl humaner Tumorzelllinien auf die mRNA-Expression der Chemerin-Rezeptoren CMKLR1, CCRL2 sowie GPR1 untersucht.

Die Mammakarzinomzelllinie DU4475 zeigte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine hohe CMKLR1-Expression (Kapitel 5.1.1). Weiterhin konnte in kompetitiven Bindungsstudien die spezifische Bindung von Chemerin-9 (Chem-9) nachgewiesen werden. Die Suspensionszelllinie DU4475 wurde 1979 von Langlois et al. aus einer Brustkrebsmetastase isoliert und charakterisiert [178].

In der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurde ebenfalls mRNA der drei Chemerin-Rezeptoren nachgewiesen. MDA-MB-231 war bereits vielfach in der Literatur als Brustkrebs-Modellzelllinie beschrieben [179], [180]. Aus diesem Grund wurde MDA-MB-231 in einem Migrationsassay eingesetzt, wobei eine signifikante Migrationssteigerung durch Chem-9 und dessen Analoga festgestellt werden konnte.

Somit waren zwei Mammakarzinomzelllinien mit einer erhöhten CMKLR1-Expression identifiziert. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass CMKLR1 für die Diagnostik von Mammakarzinomen infrage kommen könnte. Für eine gerichtete Tumordiagnostik und -therapie wäre es un-

abdingbar, wenn CMKLR1 als Zielstruktur ausschließlich oder deutlich im Tumorgewebe exprimiert wird und das umliegende gesunde Gewebe keine Expression aufweist. Aus diesem Grund wurde ein *Frozen Tissue Array* mit humanen Mammakarzinomgeweben und gesunden Kontrollgeweben mittels Immunfluoreszenz auf das Vorhandensein von CMKLR1 hin untersucht (Kapitel 5.1.2). Die drei getesteten gesunden Kontrollgewebe wiesen keine CMKLR1-Expression auf. Von den gefärbten 37 Brustkrebsproben zeigten 37,8 % ein positives und membranständiges Signal mit einem CMKLR1-spezifischen Antikörper. Dieser Prozentsatz ist vergleichbar mit den Daten zur GPCR-Überexpression in Tumoren aus der Literatur. Hier zeigen GPCR-Tumorzielstrukturen eine Überexpressionsrate in 30-80 % der Tumore im Vergleich zum Normalgewebe [181], [182]. Weiterhin wurden in vier der sechs (66,6 %) Mammakarzinomzelllinien CMKLR1-mRNA und in einer der sechs (16,6 %) Mammakarzinomzelllinien CMKLR1-Protein detektiert, was ebenfalls mit den Ergebnissen des *Tissue Array* korreliert.

Aus einer aktuellen Studie war bekannt, dass CMKLR1 in bovinen Milchdrüsen der Brust exprimiert wird [183]. Das duktales Karzinom stellt die häufigste Form des Mammakarzinoms dar, wobei der Tumor aus entarteten Milchdrüsenzellen entsteht [184]. Damit kann der Ursprung der CMKLR1-Expression in Mammakarzinomen erklärt werden.

Die Daten des *Tissue Array* unterstreichen CMKLR1 als interessante Zielstruktur für die personalisierte Mammakarzinomdiagnostik oder -therapie. Brustkrebs ist mit über 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland und einer weltweiten Mortalitätsrate von ca. 500.000 Patientinnen die häufigste Krebsart bei Frauen (Deutsche Krebsgesellschaft, 2015; Global Health Estimates, WHO 2013). Die Überlebensrate ist dabei stark abhängig von der Region und schwankt zwischen 80 % in Nordamerika, Schweden sowie Japan und unter 40 % in Staaten mit geringem Bruttonationaleinkommen [185]. Die niedrige Überlebensrate in Entwicklungsländern ist größtenteils mangelnden diagnostischen Früherkennungsmaßnahmen und fehlenden angemessenen Therapien geschuldet. Generell ist die Früherkennung entscheidend für eine erfolgreiche Krebstherapie und bleibt der wichtigste Grundstein zur Kontrolle von Tumoren [186].

### 6.1.2. EXPRESSION VON CMKLR1 IN DU4475-XENOGRAFTS

Die endogene Expression von CMKLR1 in der Brustkrebszelllinie DU4475 sollte eingesetzt werden, um die Nutzbarkeit von CMKLR1 als Zielstruktur für eine gerichtete Tumordiagnostik im Tiermodell zu verifizieren. Hierfür musste sichergestellt werden, dass die Zielstruktur in einem subkutanen Xenograft-Mausmodell erhalten bleibt (Kapitel 5.1.3). Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Generierung subkutaner Tumore mit der Brustkrebszelllinie DU4475 möglich ist [100], [187].

*Ex-vivo*-Untersuchungen an Tumoren zeigten, dass die mRNA-Expression von CMKLR1 in DU4475-Tumoren erhalten bleibt. Auch auf Proteinebene konnte der Rezeptor membranständig detektiert werden. Zusätzlich zur CMKLR1-positiven DU4475-Zelllinie wurde die CMKLR1-negative SW13-Zelllinie als Negativkontrolle verwendet. Auch diese war bereits als tumorbildende Zelllinie für Maus-Xenografts publiziert [188], [189]. Die Verwendung von Zielstruktur-negativen Tumoren ist bei bildgebenden Verfahren eine gängige Methode, um eine unspezifische Anreicherung der Konjugate zu erkennen und auszuschließen [190], [191].

In SW13-Tumoren konnte eine schwache Erhöhung der CMKLR1-mRNA im Vergleich zur Zelllinie verzeichnet werden. Dass sich die Proteinexpression zwischen Xenografts und Zellkultursystemen unterscheiden kann, war aus der Literatur bekannt [192], [193]. Auf Proteinebene konnte in SW13-Xenografts kein CMKLR1 nachgewiesen werden. Die stabilisierten Chemerin-Sonden verdrängten sowohl auf den Tumor- als auch auf den DU4475-Zellmembranen das radioaktiv markierte Chem-9-Wildtyppeptid im radioaktiven kompetitiven Bindungsassay. Mit SW13 wurde keine Bindung verzeichnet (Kapitel 5.1.3). Diese Analyse der DU4475- und SW13-Xenografts und die daraus resultierende Erhaltung der Zielstruktur im subkutanen DU4475-Tumormodell bestätigte dessen Eignung für das NIRF-*Imaging*.

Zusätzlich zu den mRNA-Analysen humaner Gene wurden murine Expressionsmuster der Tumore untersucht. Mit Ausnahme von GPR1 wurden identische mRNA-Level der Chemerin-Rezeptoren und RARRES gemessen. Die hohe GPR1-mRNA-Expression in DU4475-Xenografts könnte die Ligandenaufnahme durch murine Zellen in den Tumor begünstigen. Dass murine Gene in humanen Xenografts humaner Zelllinien messbar waren, ließ auf Angiogenese sowie auf das Einwandern Immunsystem-assoziiierter Zellen schließen. So werden CMKLR1 und CCRL2 in Immunzellen, wie zum Beispiel Makrophagen, dendritischen Zellen und Leukozyten exprimiert [50]–[55], [67]–[69]. GPR-mRNA1 hingegen wird in Blutgefäßen exprimiert (genecards.org). Dies könnte also für eine verstärkte Vaskularisierung in DU4475-Xenografts sprechen.

### 6.1.3. DER EINSATZ VON STABILISIERTEN CHEMERIN-9-ANALOGA FÜR DIE ZIELGERICHTETE TUMORDIAGNOSTIK

Der Jahresumsatz der zugelassenen Peptid-basierten Pharmazeutika betrug 2012 ca. 20 Milliarden US\$, was etwa 2 % des gesamten Arzneimittelmarktes ausmacht [194]. Derzeit sind ca. 100 Peptide auf dem Markt, 100-200 in der klinischen Entwicklung und 400-600 in präklinischen Studien [80], [194]. Zu den Peptid-basierten Pharmazeutika, die auf GPCRs wirken, zählen unter anderem Exenatide (Byetta) gegen den Glucagon-*like-peptide*-1-Rezeptor zur Therapie von Diabetes [80], Degarelix gegen den Gonadotropin-*releasing-hormone*-Rezeptor zur Behandlung des Prostatakarzinoms [195] sowie Octreotid gegen den Somatostatinrezeptor 2 und 5 zur Therapie von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren [83].

Der natürliche Peptidligand Chem-9 weist eine Serumhalbwertszeit von 24 Minuten auf. Daher ist für diagnostische Zwecke die Etablierung von serumstabilen und hoch-spezifischen CMKLR1 Peptid-Analoga nötig. Durch den Einsatz nicht-natürlicher Aminosäuren und D-Aminosäuren konnten in unserer Arbeitsgruppe zwei Chemerin-Analoga (CG34 und CG36) mit einer hohen Serumstabilität und einer daraus resultierenden hohen biologischen Verfügbarkeit generiert und patentiert werden [121], [125] (WO2013117581 A1). CMKLR1 wurde damit als vielversprechender Zielrezeptor für die Tumordiagnostik nutzbar gemacht. Die Validierung erfolgte bisher jedoch nur *in vitro* an einem stabil transfizierten Zellmodell und nicht an einer endogenen CMKLR1-exprimierenden Zelllinie wie DU4475. In dieser Zelllinie konnte CMKLR1 auf mRNA- und Proteinebene detektiert werden. Da die Möglichkeit besteht, dass Antikörper und qPCR-Primer Mutationen nicht erfassen, kann nicht automatisch auf Ligandenbindung und Funktionalität geschlossen werden.

Die spezifische Bindung der stabilisierten Chemerin-Analoga CG34 und CG36 an der Mammakarzinom-Modellzelllinie DU4457 war essentiell für die spätere *in vitro*-Bildgebung. Mittels kompetitiven radioaktiven Bindungsassays konnte die spezifische Bindung von CG34 und CG36 an den endogenen Rezeptor gezeigt werden. Dabei sind sowohl die IC<sub>50</sub>-Werte als auch das Verhältnis von verdrängter zu unverdrängter Radioligandbindung vergleichbar mit den Daten aus den Bindungsexperimenten mit Chem-9 an DU4475-Zellmembranen.

Zur Visualisierung der Ligandbindung *in vivo* kam die NIRF-Bildgebung zum Einsatz. Die NIRF-Bildgebung repräsentiert eine innovative, optisch-basierte Technologie zur Sichtbarmachung von Tumorgewebe in Echtzeit während der Operation. Weitere Einsatzgebiete sind Endoskopien und die allgemeine Diagnostik. Sie wird heute bereits klinisch bei der chirurgischen Entfernung von zum Beispiel Ovarialkarzinomen, Gehirntumoren und kolorektalen Lebermetastasen eingesetzt [98], [99], [196], [197]. In der klinischen Anwendung resultierte die NIRF-Bildgebung bereits in einer präziseren diagnostischen Einschätzung und beschleunigt die stereotaktische Gewebeentnahme bei Glioblastomen an Patienten [198].

Die Chemerin-Peptidliganden wurden über verschiedene Linker an ein signalgebendes Agens (Fluoreszenzfarbstoff) gekoppelt. Linker und Farbstoff können die physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Konjugate, wie zum Beispiel die Ausscheidung, Verteilung, Plasmaproteinbindung und Zirkulationsdauer, entscheidend beeinflussen. Diese Faktoren können sich auf den Tumor-zu-Hintergrund-Kontrast auswirken. Aus diesem Grund wurden je Peptid fünf verschiedene Linker-Farbstoff-Varianten getestet. Zum Einsatz kamen zwei hydrophile (PEG11: Undeca-Ethylenglykol, TTDS: Trioxatridecan-Succinamidsäure) und zwei hydrophobe Linker (AHX: 6-Amino-hexansäure, LysCap: Lysin-Capryloyl), die an den Nahinfrarotfarbstoff ITCC gekoppelt wurden [199]. Zusätzlich wurde sowohl CG34 als auch CG36 ohne Linker direkt an ITCC gekoppelt. Die Linker AHX, TTDS sowie PEG11 wurden bereits umfassend in der Literatur für die Anwendung der optischen und nuklearmedizinischen Bildgebung an Patienten und Tiermodellen beschrieben [200]–[203]. Der Linker LysCap wurde in Zusammenarbeit mit der Firma peptides & elephants (Potsdam, DE) generiert. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass diese Konjugate eine ähnliche Affinität zu CMKLR1 wie die Ausgangspeptide CG34 und CG36 haben. Aufgrund der unterschiedlichen Hydrophobizität von CG34 und CG36 entstand eine weitere Variabilität. CG36 ist durch den höheren Anteil nicht-polarer Aminosäuren (zum Beispiel Phenylalanin, Prolin, Glycin, Methionin, Alanin) insgesamt deutlich hydrophober als CG34. Diese zunächst theoretisch hervorgesagten strukturbezogenen Tendenzen zur Hydrophobizität konnten durch Dr. Lars Niederstadt in unserer Arbeitsgruppe mittels HPLC (C18-Säule) bestätigt werden (Abb. 59 im Anhang).

Internalisierungsexperimente mit den NIRF-Sonden an GPR1-EGFP stabil exprimierenden Zellen zeigten eine Translokation des Rezeptors in das Zellinnere. Bisher waren ausschließlich Internalisierungsexperimente an GPR1 mit einem  $\beta$ -Arrestin-Reporterassay (Tango Assay) publiziert [62], [67]. Eine Internalisierung der Sonde kann in der Diagnostik eine verbesserte Akkumulation im Tumor und damit ein optimiertes Tumor-zu-Hintergrund-*Ratio* hervorrufen [204], [205]. Es ist bekannt, dass Chemerin GPR1 mit einer ähnlichen Potenz wie CMKLR1 aktiviert [62].

Die  $EC_{50}$ -Werte der GPR1-Internalisierung waren insgesamt um den Faktor 10 höher, als die der Kalzium-Mobilisierung mit CMKLR1. Unterschiede zwischen den beiden GPCR-Funktionalitätsassays konnte bereits Sebastian Bandholtz in seiner Dissertation feststellen [121]. Diese Differenzen sind auf die verschiedenen Aktivierungskaskaden zurückzuführen. Internalisierungsanalysen über  $\beta$ -Arrestin basieren auf dem Prinzip der G-Protein-unabhängigen Signalweiterleitung, während bei der G-Protein-abhängigen Kalzium-Mobilisierung die Quantifizierung eines signalverstärkenden „*second messenger*“ erfolgt [170]. Die Arbeitsgruppe von Barnea et al. zeigte, dass Chemerin in einem Internalisierungsversuch ein stärkerer Agonist für GPR1 als für CMKLR1 ist, während bei der Kalzium-Mobilisierung das CMKLR1-induzierte Signal stärker war [62].

Trotz ähnlicher Aktivität in der Kalzium-Mobilisierung unterschied sich die Vesikelanzahl nach Internalisierung deutlich zwischen CG34 und CG36. CG36-basierte NIRF-Sonden zeigten hier eine

stärkere Internalisierung im Vergleich zu den hydrophileren CG34-basierten Varianten. Der Ligand scheint dabei einen größeren Einfluss auf die Internalisierung auszuüben als der Linker. Eine Ausnahme bildeten die PEG11-Konjugate. Sowohl das CG34-Konjugat CG75 als auch das CG36-Konjugat CG76 induzierten lediglich eine schwache Internalisierung mit geringer Vesikelanzahl. Mäde et al. demonstrierten, dass einige chemische Modifikationen bei der identischen Peptidstruktur einen *biased*-Effekt erzeugen [206]. So vermittelte eine Lipidisierung die Arrestin-Rekrutierung und eine PEGylierung den G-Protein-vermittelten Signalweg. Dass Signalwege und Signaltransduktionsprofile eines Rezeptors abhängig vom Liganden sein können [207]–[209] und dass hydrophobe Peptide eine stärkere Rezeptor-unabhängige Internalisierung vermitteln [210], [211], wurde bereits gezeigt.

#### 6.1.4. DIE SPEZIFISCHEN STABILISIERTEN CHEMERIN-SONDEN ERMÖGLICHEN EINE IN VIVO-BILDGEBUNG AN CMKLR1-POSITIVEN TUMOREN

Initiales NIRF-*Imaging* mit vier Mäusen je Sonde ließ erste Auswertungen zum Einfluss des Linkers auf die Anreicherung im Tumor und zur Bioverteilung zu.

Dabei wurden die Mäuse an verschiedenen Zeitpunkten nach Sondeninjektion im NIRF-*Imager* gemessen (vor der Injektion [0 min]; 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h; 48 h).

Insgesamt wurden bei allen Konjugaten deutliche Signale in der Leber detektiert. Die Leber ist ein zentrales Versorgungs- und Ausscheidungsorgan für periphere Gewebe mit Stoffwechselprodukten und daher sehr stark durchblutet. Die Tatsache, dass Pharmazeutika oder kontrastgebende Substanzen über den Blutkreislauf in die Leber gelangen und dort akkumulieren, ist bekannt [212], [213]. Da die Leber stark von Metastasen verschiedener Entitäten, wie zum Beispiel Mammakarzinom, kolorektales Karzinom und neuroendokrinen Tumoren, betroffen ist, wird deren Detektion erschwert und der Tumorkontrast verringert [212].

Auffällig war, dass das hydrophobste Konjugat CG78 (ITCC-LysCap-CG36) das stärkste und langanhaltendste Lebersignal zeigte und das hydrophilste Konjugat CG75 (ITCC-PEG11-CG34) die geringste Akkumulation in der Leber aufwies. Nach 48 Stunden war bei CG78 noch 60 % der Intensität im Vergleich zu dem 10 Minuten-Wert in der Leber detektierbar, wobei alle anderen Sonden nach 48 h nicht oder kaum in der Leber nachweisbar waren. Die Hydrophobizität von Peptiden und Peptidkonjugaten erhöht die Bindung an Plasmaproteinen im Blut, verstärkt damit die Leberakkumulation und hat Einfluss auf die unspezifische Aufnahme in die Leber [214]–[216]. Dabei stellt die Hydrophobizität nicht die einzige relevante Eigenschaft dar, die einen Einfluss auf die Leberanreicherung ausübt. Die Affinität der Peptide zu Plasmamembran-Transportproteinen kann ebenfalls eine Rolle spielen [215]. Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass CMKLR1-mRNA in der murinen Leber exprimiert wird (Expressionsdatenbank BioGPS), was in Kapitel

5.2.4 bestätigt werden konnte. Aufgrund der Korrelation der Hydrophobizität der Chemerin-Sonden mit dem Lebersignal (HPLC, von Dr. Lars Niederstadt, Abb. 59 im Anhang), liegt die Vermutung nahe, dass diese Eigenschaft den größten Einfluss auf die Leber-Bindung ausübt.

CG75 (ITCC-PEG11-CG34) sowie CG77 (ITCC-LysCap-CG34) vermittelten eine signifikante Akkumulation über die Zeit im DU4475-Tumor, wobei CG75 nach 6 h und CG77 nach 24 h das höchste Signal zeigte. Die frühe Anreicherung von CG75 im Vergleich zu CG77 kann mit dessen deutlich hydrophileren Eigenschaften erklärt werden. Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von CG75 betrug nach 24 Stunden 1, das Konjugat akkumulierte somit nicht im Tumor. Im *Target*-negativen SW13-Tumor konnte mit keiner der Chemerin-Varianten eine Anreicherung detektiert werden.

Bei beiden direkt-gekoppelten Sonden, CG46 (ITCC-CG34) sowie CG48 (ITCC-CG36), konnte keine Tumorakkumulation verzeichnet werden. Offenbar war der Linker und der damit verbundene Abstand zum Fluorophor essentiell, um die Peptid-Rezeptor-Wechselwirkung nicht sterisch durch den Farbstoff zu behindern. Signalgebende Moleküle können die Affinität oder Spezifität des Liganden *in vivo* negativ beeinträchtigen. Linker bzw. Spacer werden bei der klinischen Anwendung eingesetzt, um einen räumlichen Abstand zwischen Ligand und Signalgeber zu erreichen [217].

Die beiden hydrophobsten Konjugate CG37 (ITCC-Ahx-CG36) sowie CG78 (ITCC-LysCap-CG36) vermittelten keine Anreicherung im Tumor. Mit CG76 (ITCC-PEG11-CG36) konnte nach 30 Minuten ein schwaches Signal in DU4475-Tumoren verzeichnet werden, allerdings zeigte sich diese Tendenz auch im SW13-Tumor, was für ein unspezifisches Signal spricht.

Kossatz et al. (2013) publizierten bereits, dass Sonden mit verschiedenen Linkern, die sich *in vitro* in ihrer Affinität zum Rezeptor ähnelten, zu unterschiedlichen Tumorsignalen *in vivo* führen können [218]. Hierin zeigt sich, dass eine Prognose über den Erfolg eines Konjugates nicht allein durch zellbasierte *Assays* möglich ist. Die Akkumulation in Organen wie Leber oder Niere und die Zirkulationsdauer im Organismus sind abhängig von der chemischen Struktur der Sonden. Diese spielt damit für das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis und damit für die spätere klinische Anwendung eine wesentliche Rolle [218].

Um Aussagen zu treffen, welche Sonden interessant für weiterführende *in vivo*-Experimente wären, wurde der Quotient aus den Fluoreszenzsignalen der CMKLR1-positiven DU4475-Tumore und der CMKLR1-negativen SW13-Tumore berechnet. Chemerin-Konjugate mit einem Wert größer als 1,5 wurden für weitere Experimente verwendet. Anhand dieses Grenzwertes qualifizierten sich CG35 (ITCC-Ahx-CG34; *Ratio*: 1,75), CG49 (ITCC-TTDS-CG36; *Ratio*:1,71), CG75 (ITCC-PEG11-CG34; *Ratio*: 2,25) sowie CG77 (ITCC-LysCap-CG34; *Ratio*: 2,17).

Damit zeigte sich, dass die Eignung der Konjugate für die *in vivo* Bildgebung nicht allein von der Stärke der Internalisierung abhängt. CG35, CG75 und CG77 internalisierten schwächer im Vergleich zu den CG36-Konjugaten. CG49 war eines der CG36-basierenden Sonden mit einer vergleichsweise geringeren maximalen Vesikelanzahl. Somit ist ein *Targeting* für die optische

Bildgebung auch mit Sonden möglich, die gut an den Rezeptor binden, aber nicht oder nur schwach internalisieren.

Neben der Testung von *Target*-negativen Tumoren wurden sogenannte *scrambled*-Sonden als zusätzliche Negativkontrolle zur Einschätzung der unspezifischen Bindung eingesetzt. Die *scrambled*-Sonden entsprechen bis auf ihre willkürlich ausgetauschte Aminosäureabfolge den jeweiligen spezifischen Konjugaten. Dies resultierte in einer Unspezifität zum Rezeptor und ermöglichte die direkte Detektion von unspezifischen Signalen. Diese Strategie war bereits aus der Literatur bekannt [219], [220]. *In vitro*-Untersuchungen mit den *scrambled*-Konjugaten zeigten keine Aktivierung von CMKLR1 (Kalzium-Mobilisierung) beziehungsweise GPR1 (Internalisierung). Eine Ausnahme bildete hier CG81, dieses zeigte bei höheren Konzentrationen (>100 nM) einen geringen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in CMKLR1-exprimierenden Zellen.

CG77 zeigte auch bei den *Imagings* mit einer größeren Tierzahl die höchste Anreicherung im DU4475-Tumor. Weder mit dessen *scrambled*-Sonde (CG80) noch im SW13-Tumor wurden Signale detektiert. Dies spricht für eine spezifische und signifikante Bindung an CMKLR1 im *Target*-positiven Tumor. CG75 vermittelte eine zeitabhängige Signalzunahme im DU4475-Tumor, jedoch zeigte auch die *scrambled*-Variante (CG81) eine schwache, aber signifikante Zunahme nach drei Stunden. Dieses Verhalten ist mit dem geringen Signalanstieg nach Applikation von CG81-Konzentrationen >100 nM auf HEK 293A CMKLR1-Zellen im Kalziumimaging zu erklären. CG81 weist somit eine geringe aber vorhandene Affinität zu CMKLR1 auf, was eine Bindung an DU4475-Tumore erklären könnte.

Insgesamt zeigte sich, wie wichtig die *scrambled*-Sonden als zusätzliches Kontrollsystem sind. CG35 und CG49 zeigten keine signifikante Anreicherung über die Zeit. Somit war CG77 die vielversprechendste Chemerin-Sonde für die optische Bildgebung. Aufgrund der umfassenden Negativkontrollen (*Target*-negativer Tumor sowie unspezifisches *scrambled*-Konjugat) konnte mit CG77 ein spezifisches, hochaffines Konjugat für das CMKLR1-*Targeting* identifiziert werden. Die ähnlichen Leberwerte der *scrambled*-Sonden im Vergleich zu den spezifischen Sonden widerlegten die Vermutung, dass die Leberanreicherung durch CG35, CG49, CG75 und CG77 aus einer spezifischen Bindung resultiert.

Untersuchungen zur Gesamtintensität ergab für das Konjugat CG77 eine Halbwertszeit von 10,7 Stunden. Insgesamt waren nach eineinhalb Stunden in der Leber beziehungsweise nach 10,7 Stunden im gesamten Organismus noch 50 % des Konjugates nachweisbar. Damit wäre CG77 aus klinischer Sichtweise praktikabel. Hier sollte jedoch abgewogen werden, wann nach der Applikation die optische Bildgebung erfolgen soll. Der stärkste Kontrast (Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis) wurde für CG77 nach 24 Stunden detektiert, was bei einer Halbwertszeit von 10,7 Stunden eine geringe Gesamtpeptidkonzentration im Organismus bedeutet. Jedoch sind ein hoher Tumorkontrast und ein schwaches Hintergrundsignal wichtige Kriterien für die

Bildgebung. Somit vermitteln hydrophobe Konjugate Vorteile durch die verlängerte *in vivo* Retentionszeit und eine daraus resultierende, verbesserte Tumoranreicherung.

Am Beispiel des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) konnte durch Kopplung einer albuminbindenden Nanobodykomponente an den anti-EGFR-Nanobody die Retentionszeit verlängert und somit die Tumorakkumulation deutlich verbessert werden [221]. Da die Molekülmasse von Nanobodies (ca. 15 kDa) im Verhältnis zu groß zu den hier verwendeten Peptiden (ca. 1 kDa) sein würde, wurde diese Methode für diese Arbeit nicht in Betracht gezogen [222].

### 6.1.5. AUSBLICK: EINSATZ DER CHEMERIN-SONDEN FÜR DIE KLINISCHE ANWENDUNG

Zur Therapie von Krebserkrankungen kommen derzeit meist Operation, Chemotherapie oder Bestrahlung zur Anwendung. Dabei kann eine einzelne (Monotherapie) oder mehrere aufeinander abgestimmte Therapien (Kombinationstherapie) zum Einsatz kommen. Eine Operation als invasive Methode zielt auf die vollständige Sektion des Tumorgewebes ab, um die Bildung eines neuen Tumors zu vermeiden. Die konventionelle Chemotherapie ist sehr unspezifisch und wirkt zytotoxisch auch auf gesunde Zellen im Organismus, wobei die Strahlentherapie neben dem Tumor auch das umliegende gesunde Gewebe trifft. Aufgrund der mangelnden Selektivität treten bei diesen Therapieformen häufig Lebensqualitäts-beeinflussende Nebenwirkungen auf.

Das Koppeln von Therapeutika an spezifische Liganden ermöglicht eine zielgerichtete Diagnostik und Therapie, erhöht die Tumorselektivität und verringert die Belastungen für gesundes Gewebe [223]. Ziel dieser personalisierten Krebsmedizin ist eine Therapieform, die selektiv auf den Tumor wirkt, aber keinen schädigenden Einfluss auf das gesunde, umliegende Gewebe hat und damit keine Nebenwirkungen aufweist [78].

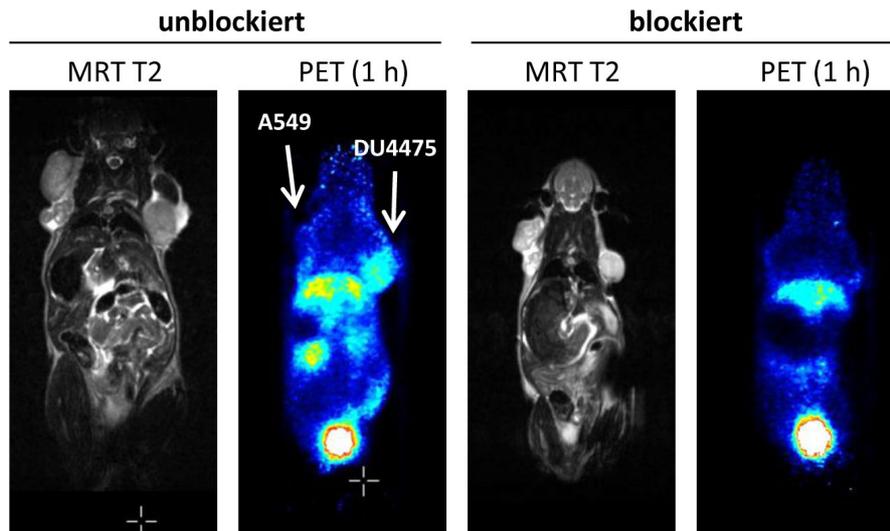
Somit stellt die gerichtete, personalisierte Therapie eine vielversprechende Anwendung dar. Viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind an der Tumorigenese und Metastasierung beteiligt und im Tumorgewebe überexprimiert. Neben dem hier verifizierten Rezeptor CMKLR1 wären als weitere Beispiele die Somatostatinrezeptoren (2 und 5), der Neurotensinrezeptor, der *Gastrin-releasing Peptide Receptor*, der *Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor* sowie Endothelin- und Chemokin-Rezeptoren zu nennen [76], [224]–[228]. GPCRs sind als spezifische Oberflächenmarker zur Identifizierung und Behandlung von Tumoren geeignet und können für die molekularbiologische, zielgerichtete Krebsmedizin zum Einsatz kommen.

Augrund der hohen Inzidenz von Brustkrebs, der CMKLR1-Überexpression in 37,8 % der getesteten Mammakarzinomgeweben und der erfolgreichen Akkumulation der NIRF-Sonde CG77 im DU4475-Xenograft-Mausmodell, wäre der diagnostische und therapeutische Einsatz des stabilisierten Chemerin-Analogons als Leitstruktur denkbar. In weiterführenden Experimenten wurden

in unserer Arbeitsgruppe von Sarah Erdmann und Dr. Lars Niederstadt erste nuklearmedizinische *Imagings* zur zusätzlichen Charakterisierung der Chemerin-Peptide durchgeführt. Diese Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem *Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center* (BERIC) an einem multimodalem *Imaging*gerät (nanoScan, Mediso, Münster, DE) mit kombiniertem PET- (Positronen-Emissions-Tomographie) und MR- (Magnetresonanztomographie) *Imaging* (PET/MR).

Die PET beruht auf dem Prinzip der gleichzeitigen Detektion zweier Gammastrahlungspotonen, die nach dem Zerfall eines Positronen-emittierenden Radionuklids entstehen [229], [230]. Vorteile dieser Technik liegen in der sehr guten Quantifizierbarkeit und Abbildungsqualität. Die Kombination von PET und MR realisiert außerdem die zusätzliche Aufnahme von hochauflösenden anatomischen Informationen und ermöglicht die partielle Volumenkorrektur der PET-Daten [231].

Für diese Analysen wurden CG34 und CG36 über die beschriebenen Linker an den Chelator DOTA gekoppelt, wodurch eine Markierung mit dem Radioisotop  $^{68}\text{Ga}$  ermöglicht wird. Ein erstes Ergebnis dieser nuklearmedizinischen Bildgebung ist in Abb. 50 dargestellt. Hierfür wurde die CMKLR1-positive DU4475-Zelllinie sowie A549 als CMKLR1-negative Zelllinie verwendet. Die subkutane Inokulation der Zellen erfolgte, aufgrund des zu erwartenden starken Nierensignals der  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-CG34-Sonde, nicht auf den Flanken, sondern in den Schulterbereich [232]. Mittels PET konnte im *Target*-positiven DU4475-Tumor ein starkes Signal visualisiert werden, während im *Target*-negativen A549-Tumor kein Signal detektiert werden konnte. Durch Zugabe eines 50-100-fachen Überschusses an CG34 fand eine Verdrängung der  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-CG34-Sonde im DU4475 statt. Die Quantifizierung des Tumor-zu-Nieren-Verhältnisses ergab einen Wert von 0,75. Dies ist ein sehr guter Wert, da die Tumor-zu-Nieren-*Ratios* laut Literatur für PET-Anwendungen häufig bei 0,25 oder niedriger liegen [233]–[235].



**Abb. 50: PET/MR-Imaging mit einer stabilen Chemerin-basierten- $^{68}\text{Ga}$ -Sonde.** *In vivo* Imaging von DU4475- (*Target*-positiv) und A549- (*Target*-negativ) Tumoren in einem Nacktmausmodell. Links: MRT und PET-Aufnahme 1 h nach der Injektion eines  $^{68}\text{Ga}$ -gelabelten DOTA-CG34-Konjugates. 15 MBq der Sonde wurden i.v. injiziert. Rechts: MRT und PET-Aufnahme 1 h nach der gleichzeitigen Injektion von 200 nmol CG34 und 15 MBq des  $^{68}\text{Ga}$ -gelabelten DOTA-CG34-Konjugates. Mit freundlicher Genehmigung von Sarah Erdmann und Dr. Lars Niederstadt.

Damit konnte mit den optimierten Chemerin-Sonden sowohl in der NIRF-Bildgebung als auch im nuklearmedizinischen *Imaging* an einem Tumormodell ein spezifisches *Targeting* von CMKLR1 realisiert werden. Klinische Anwendungsmöglichkeiten der ITCC-gekoppelten Sonden zur Visualisierung von CMKLR1-positiven Mammakarzinomen mittels optischer Bildgebung lägen zum Beispiel in der Mammografie oder in dem intraoperativen *Imaging*.  $^{68}\text{Ga}$ -gelabelte Sonden finden Anwendung in der nuklearmedizinischen Diagnostik mittels PET, Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) und der peptidvermittelten Radiorezeptorthherapie (PRRT).

## 6.2. DIE ROLLE DER CHEMERIN-REZEPTOREN IN DER GLUKOSEHOMÖOSTASE

CMKLR1 wurde in unserer Arbeitsgruppe in Glucagon-exprimierenden  $\alpha$ -Zellen des humanen Pankreas nachgewiesen [120]. In dieser Arbeit wurde daher die Hypothese, dass Chemerin als natürlicher Ligand von CMKLR1 die Glucagon-Sekretion steuern könnte, untersucht.

### 6.2.1. *PHYSIOLOGISCHE FUNKTION PANKREATISCHER NAGERZELLMODELLE*

Als Modell für die Funktion pankreatischer Inseln wurden tumoröse Nagerzelllinien endokrinen Ursprungs benutzt.

Zunächst wurde die Insulin- sowie Glucagonexpression der Zelllinien  $\alpha$ TC1,  $\beta$ TC3, Min6, INR1G9 und Ins1 auf Proteinebene untersucht. Die Untersuchungen bestätigten, wie bereits publiziert, dass  $\alpha$ TC1 und INR1G9 ausschließlich Glucagon exprimieren, während  $\beta$ TC3 ausschließlich Insulin exprimiert [236]–[241]. Die von einem Insulinom abstammenden Zelllinien Min6 und Ins1 sekretieren sowohl Glucagon als auch Insulin. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass Insulinome Charakteristiken von sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Zellen aufweisen können [242]. Dieser Phänotyp entspricht dabei dem von unreifen Stammzellen, wobei die exprimierten Gene zur Reifung von Inselzellen essentiell sind [243], [244].

Zur weiteren Validierung dieser Nagerzelllinien als Modell für Hormonsekretionsstudien wurden Sekretions- und Proliferationsassays durchgeführt. Für Fragestellungen zur Glucagonsekretion standen neben der parentalen  $\alpha$ TC1-Zelllinie unterschiedliche  $\alpha$ TC1-Klone (Klon 6 und 9) zur Verfügung, welche sich in ihrer zellulären Antwort auf Zytokine unterscheiden [245]. Demnach sollte die parentale  $\alpha$ TC1-Zelllinie neben Glucagon auch Insulin sekretieren, was im Zuge dieser Dissertation nicht bestätigt werden konnte. Um zu entscheiden, welche der drei  $\alpha$ TC1-Zellen für weiterführende Assays verwendet wird, wurde die Glucagonsekretion in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Ein kontinuierlicher und damit physiologischer Anstieg der Glucagonkonzentration konnte ausschließlich durch die parentale Zelllinie verzeichnet werden. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Glucagonsekretionsassays die parentale  $\alpha$ TC1-Zelllinie eingesetzt.

Die Stimulation der pankreatischen Nagerzelllinien mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (1; 5,6 und 25 mM) erbrachte sowohl in der Insulin- als auch in der Glucagonsekretion keine physiologische Reaktion. Lediglich die Zelllinie Min6 wies eine erhöhte Insulin-Sekretion bei steigender Glukosekonzentration auf, zusätzlich wurden erhöhte Glucagonwerte bei 25 mM Glukose gemessen. Le Marchand und Piston publizierten 2010 eine unphysiologisch zunehmende Glucagonsekretion bei erhöhten Glukosekonzentrationen durch isolierte  $\alpha$ -Zellen im Vergleich zu kompakten Inseln [246]. Dass Insulin-produzierende  $\beta$ -Zellen essentiell für eine physiologische

Glucagonsekretion pankreatischer  $\alpha$ -Zellen sind, war bereits bekannt [247]. So zeigte eine Studie von Dumonteil et al. (1998), dass neben Glukose auch Insulin ein wichtiger Regulator der Glucagonexpression darstellt [248]. Eine Möglichkeit, die physiologische Reaktion der Zelllinien zu verbessern, könnte die Ko-Kultivierung von  $\alpha$ -Zellen mit Insulin-produzierenden Zelllinien sein [176], [249], [250]. Diese Daten suggerieren eine parakrine Regulation der Glucagonsekretion durch  $\beta$ -Zell-spezifische Faktoren. Wie genau Glukose pankreatische  $\alpha$ -Zellen inhibiert (intrinsisch oder über parakrine Mechanismen), ist nicht vollständig geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert [131], [251]–[259]. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass sich das Verhalten von isolierten  $\alpha$ -Zellen stark von dem im Insel-Verbund unterscheidet und dass es nur bedingt möglich ist, von der Reaktion isolierter Zellen auf die Resonanz der kompakten pankreatischen Insel zu schließen.

Proliferationssteigernde Effekte durch IL-6 sowie Insulin wurden bereits publiziert [176], [177]. Zur zusätzlichen Kontrolle der physiologischen Reaktion wurden die pankreatischen Nagerzelllinien in einem Proliferationsassay untersucht. Signifikante pro-proliferative Effekte konnten durch Interleukin-6 (IL-6) an  $\alpha$ TC1-Zellen sowie durch Insulin an INR1G9 und Ins1 nachgewiesen werden, wohingegen Min6 und  $\beta$ TC3 keine erhöhte Proliferation durch die beiden Substanzen zeigten und damit keine physiologische Reaktion abgebildet werden konnte. Aus diesem Grund waren diese beiden Zelllinien für weiterführende Stimulationsexperimente mit Chem-9 nur bedingt geeignet.

### 6.2.2. EXPRESSION UND FUNKTION VON CHEMERIN-REZEPTOREN IN PANKREATISCHEN NAGERZELLINIEN

Da eine physiologische proliferationssteigernde Reaktion durch Stimuli an den pankreatischen Nagerzelllinien  $\alpha$ TC1, INR1G9 und Ins1 gezeigt werden konnte, kommen diese als Modell für Stimulationsexperimente mit Chem-9 prinzipiell infrage. Um eine Aussage über das Vorhandensein der Chemerin-Rezeptoren zu treffen, wurden die Zelllinien näher auf ihre mRNA-Expression hin untersucht. Mit Ausnahme von Ins1 konnte in allen pankreatischen Nagerzelllinien mindestens einer der drei Chemerin-Rezeptoren (CMKLR1, GPR1 oder CCRL2) nachgewiesen werden. In INR1G9,  $\alpha$ TC1 parental sowie  $\beta$ TC3 konnte mRNA von allen drei Chemerin-Rezeptoren detektiert werden. Die CMKLR1-Expression in INR1G9 war hierbei am höchsten, wobei in  $\alpha$ TC1-Zelllinien ebenfalls CMKLR1-mRNA nachgewiesen werden konnte. In Min6 konnte kein CMKLR1 detektiert werden.

Um autokrine Effekte ausschließen zu können, wurde die endogene Expression des Liganden Chemerin in Zellkulturüberständen gemessen. Auf mRNA-Ebene waren keine oder nur geringe

Expressionslevel und auf Proteinebene in Zellkulturüberständen kein Chemerin nachweisbar. Somit konnte sichergestellt werden, dass die Resultate aus den Stimulationsversuchen nicht durch endogenes Chemerin verfälscht werden.

Stimulationsexperimente der pankreatischen Nagerzelllinien mit Chem-9 unter verschiedenen Glukosebedingungen (1; 5,6; 25 mM Glukose) zeigten keine signifikanten Effekte auf die Hormonsekretion und auf die Proliferation.

Nach der Charakterisierung eines spezifischen Antikörpers gegen murines CMKLR1 wurden die verwendeten Zelllinien auf ihre CMKLR1-Expression auf Proteinebene hin untersucht. Hierbei sollte beachtet werden, dass INR1G9 und Ins1 nicht murinen Ursprungs sind und der hier verwendete Antikörper möglicherweise trotz einer Sequenzidentität von über 84 % (Abb. 61; Anhang) keine ausreichende Spezifität aufweist. Dass in den murinen Zelllinien kein CMKLR detektiert werden konnte, erklärt teilweise die mangelnde Wirkung von Chem-9 sowohl auf die Hormonsekretion als auch auf die Proliferation. Für die Chemerin-Rezeptoren CCRL2 und GPR1 waren keine spezifischen Antikörper verfügbar.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz sind konträr zu den Studien von Takahashi et al. (2011), wo eine CMKLR1-Expression auf Proteinebene in Min6 beschrieben wurde [158]. Allerdings zeigte die immunhistochemische Analyse von Takahashi et al. (2011) ein äußerst schwaches Signal auf Min6-Zellen, entsprechende Kontrollen fehlten. Im Zuge dieser Dissertation konnte außerdem mit validierten TaqMan-Primern keine CMKLR1-mRNA in Min6 detektiert werden, was gegen die Ergebnisse von Takahashi spricht. Eine mRNA-Analyse an Min6 fehlt in jener Publikation, obwohl qPCR-Primer offensichtlich vorlagen und für die Analyse von Mausgewebe verwendet wurden.

### *6.2.3. EXPRESSION UND FUNKTION VON CHEMERIN-REZEPTOREN IN PRIMÄREN HUMANEN PANKREATISCHEN INSELN*

Die Stimulationsversuche an Monolayer-Zellkulturen zeigten eine gestörte Antwort auf Glukose. Verschiedene Studien diskutierten bereits, dass eine Glukose-abhängige Hormonsekretion an pankreatischen Zellkulturmodellen schwierig darzustellen ist [246], [250], [260]. Aus diesem Grund sollten zukünftig primäre pankreatische Inseln verwendet werden. Primäre Zellsysteme stellen generell eine geeignetere und organismusnähere Alternative dar. Sie sind jedoch in ihrer Handhabung und Anschaffung aufwändig.

Offensichtlich ist auch die interne Kommunikation zwischen den verschiedenen Zelltypen der pankreatischen Insel entscheidend. So wurde ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung von *Gap Junctions* und der Insulin-Sekretion festgestellt [261], [262]. Xu et al. (2006) publizierten, dass Insulin einen essentiellen regulatorischen Suppressor für die Glucagon-Sekretion im Insel-

verbund darstellt [263]. Somit bilden Experimente mit Zellkulturen aus einem Zelltyp nur bedingt das biologische System ab. Um die Frage, ob das Chemerin-Rezeptorsystem einen Einfluss auf den Glukosestoffwechsel ausübt, näher zu untersuchen, wurden deshalb für weitere Experimente primäre humane pankreatische Inseln verwendet (Fa. tebu-bio).

Die Ko-Lokalisation von CMKLR1 und den Glucagon-exprimierenden  $\alpha$ -Zellen wurde an der isolierten Insel bestätigt. CMKLR1 konnte außerdem mittels Western Blot-Analysen in den Inseln nachgewiesen werden. In Stimulationsassays bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen an Inseln von vier Spendern konnte keine physiologische Glucagonsekretion in Abhängigkeit vom Glukosegehalt verzeichnet werden. Eine physiologische Insulinsekretion wurde hingegen bei zwei der vier Spender gemessen. Die hier generierten Ergebnisse suggerieren, dass diese primären Inseln für Untersuchungen der Glukose-stimulierten Glucagonsekretion nur bedingt geeignet waren und ihre Funktionalität teilweise verloren haben. Entsprechend konnte kein signifikanter Einfluss von Chem-9 auf die Glucagonsekretion gemessen werden.

Generell ist das hier verwendete Experimentdesign mit der basalen Vorinkubation und der anschließenden Messung des Hormongehalts eine gängige Methode [263]–[265]. Die Variabilität zwischen den einzelnen Individuen, die Qualität und Vitalität der Inseln, der Zeitpunkt der Organentnahme sowie die Art der enzymatischen Isolation üben einen nicht unwesentlichen Einfluss auf diese sensiblen Mikroorgane aus [266], [267]. Des Weiteren spielen die Transportbedingungen (Dauer, Temperatur, mechanische Beanspruchung) eine wichtige Rolle [268]. Da die hier verwendeten Inseln aus den USA stammen, betrug die Zeitspanne zwischen Isolation und Stimulation mindestens drei Tage.

Inseln im komplexen Organismus sind außerdem stark vaskularisiert und werden mit Hilfe von Arteriolen mit Blut versorgt. Nagermodelle zeigten, dass Blut von den zentral gelegenen  $\beta$ -Zellen direkt zu den umliegenden  $\alpha$ -Zellen geleitet wird, bevor es zur hepatischen Pfortader zurückgeführt wird [250], [269]. Dies könnte erklären, warum die physiologische Reaktionen durch Stimulationsassays *in vitro* sehr schwierig nachzubilden sind.

Dass das Chemerin-Rezeptorsystem einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die Glukosehomöostase ausübt, belegen verschiedene Publikationen. So korreliert ein erhöhter Chemerin-Serumgehalt mit einem erhöhten *Body-Mass-Index* und erhöhtem Blutdruck [53], [160]. In adipösen Mäusen konnten gesteigerte Chemerinwerte gemessen werden und die Gabe von rekombinantem Chemerin führte zu einer reduzierten Glukoseaufnahme und einer zunehmenden Glukoseintoleranz [156].

In der Literatur sind verschiedene kontroverse Ergebnisse zu finden. Takahashi et al. (2008) zeigten eine gesteigerte und von Kralisch et al. (2009) eine verminderte Glukoseaufnahme in 3T3-Adipozyten durch Chemerin [161], [162]. Weiterhin zeigen CMKLR1-*knock-out*-Mäuse eine verschlechterte Glukosetoleranz, eine Abnahme der Glukose-stimulierten Insulinsekretion, eine verringerte Nahrungsaufnahme [155], eine unveränderte Glukose- oder Insulintoleranz und eine

unveränderte Nahrungsaufnahme [157], [159]. Der bei diesen Publikationen verwendete Maus-Stamm war C57BL/6, jedoch wurden die CMKLR1-*knock-outs* von unterschiedlichen Firmen (MSD, NL und Deltagen, USA) generiert. Diese Fakten legen nahe, dass womöglich der genetische Hintergrund eine wesentliche Rolle spielt.

Hinweise darauf, dass nicht nur CMKLR1, sondern auch GPR1 als weiterer Chemerin-Rezeptor an der Glukosehomöostase beteiligt ist, lieferten Studien von Rourke et al. (2014) [63]. Hier zeigten adipöse GPR1-*knock-out*-Mäuse eine zunehmende Glukoseintoleranz, erhöhte Blutglukosewerte und erniedrigte Serum-Insulinkonzentrationen.

Wie genau Chemerin wirkt, ist nicht bekannt. Die Lokalisation von CMKLR1 auf humanen pankreatischen  $\alpha$ -Zellen, könnte für eine direkte Wirkung auf die Glucagonsekretion sprechen. Im Zuge dieser Dissertation konnte kein ausreichend sensitives Modell gefunden werden, um diesen Effekt zu belegen. Optimal wäre der Bezug der Inseln von einer Quelle in der direkten Umgebung, um einen lange Transportdauer zu vermeiden und eine zeitnahe Stimulation ohne Verlust der Funktionalität zu gewährleisten.

Sollte die Wirkung von Chemerin auf die Glucagon-Sekretion der  $\alpha$ -Zellen zukünftig nachgewiesen werden, wäre CMKLR1 aufgrund der Diabetes-bedingten Hyperglucagonämie womöglich ein interessantes *Target* zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2.

#### 6.2.4. EXPRESSION VON CHEMERIN UND CHEMERIN-REZEPTOREN IN GEWEBEN

Da die Publikationen und die hier generierten Daten in verschiedenen Spezies teilweise zu kontroversen Ergebnissen führen, stellt sich die Frage der Vergleichbarkeit zwischen den Spezies. Hierfür wurde humanes, murines sowie porcines Gewebe auf die Expression von CMKLR1, CCRL2, GPR1 und RARRES2 mittels quantitativer Real-Time PCR analysiert. Da die Verfügbarkeit von gesundem humanen Gewebe begrenzt war, konnte hier nur mRNA-Analysen an Dickdarm, Gehirn, Leber, Magen, Pankreas und den pankreatischen Inseln durchgeführt werden.

Insgesamt wurde eine hohe CMKLR1-Expression in der Lunge von Schweine- und Mausgewebe (human wurde nicht analysiert) gemessen, was mit publizierten Daten übereinstimmt ([63], [158]; [www.GTEXPortal.org](http://www.GTEXPortal.org); [www.BioGPS.org](http://www.BioGPS.org); [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)).

Besonders auffällig war hier der Vergleich der CMKLR1 mRNA-Expression zwischen pankreatischen Inseln und dem gesamten Pankreas, welcher sowohl endokrine als auch exokrine Zellen enthält. Bei allen getesteten Spezies war das CMKLR1-mRNA-Level in den Inseln geringer als im gesamten Pankreas. Somit scheint ein Großteil von CMKLR1 im exokrinen Pankreas lokalisiert zu sein. In der Biodatenbank BioGPS hingegen wurden vergleichsweise hohe Werte von CMKLR1-mRNA in humanen Inseln im Vergleich zum Pankreas publiziert.

Bei Untersuchungen auf Proteinebene an humanen Pankreas-Kryoschnitten konnte eine Ko-Lokalisation von CMKLR1 und Glucagon ( $\alpha$ -Zellen) verzeichnet werden. Takahashi et al. konnten eine Ko-Lokalisation von CMKLR1 mit Insulin an Mausinseln zeigen. Immunhistochemische Experimente zur Glucagonexpression wurden in jener Publikation nicht dargestellt [158]. Hier wäre eine Variation in der Rezeptorexpression zwischen unterschiedlichen Spezies denkbar. Da kein Antikörper für Gefriergewebe gegen Schweine- und Maus-CMKLR1 existiert, konnten keine Untersuchungen zur Bestätigung dieser Hypothese an murinem oder porcinem Pankreas erfolgen.

Die Immunfluoreszenzerggebnisse sind auf dem ersten Blick widersprüchlich zu den mRNA-Daten, andererseits kann vom mRNA-Level nicht uneingeschränkt auf die Proteinexpression geschlossen werden [270], [271]. So könnte in den pankreatischen Inseln durchaus ein größerer Rezeptoranteil lokalisiert sein, wohingegen im exokrinen Pankreas kein Protein exprimiert wird oder der posttranslationale Proteintransport nicht korrekt erfolgte und der Rezeptor damit nicht membranständig nachweisbar war.

Die Resultate der Immunfluoreszenz an humanem Pankreas zeigten außerdem ein typisch diverses Muster in der Anordnung endokriner Zellen. Vergangene Studien belegten bereits, dass größere Säugetiere eine eher zufällige Verteilung der  $\alpha$ -Zellen innerhalb der gesamten Insel aufweisen, während die  $\alpha$ -Zellen von Nagetieren einen gleichmäßigen Mantel um einen inneren Kern von  $\beta$ -Zellen ausbilden [127], [272].

Ein erhöhter CMKLR1-mRNA-Gehalt konnte in den Leberproben von allen verwendeten Spezies bestimmt werden, wobei die Expression in der humanen Leber besonders hoch ausfiel. Diese Ergebnisse gehen konform mit Daten der Expressionsdatenbank BioGPS. Weiterhin wurde eine mRNA-Expression von CMKLR1 in weißem Fettgewebe sowie im Herzen von Maus und Schwein nachgewiesen (human wurde nicht analysiert). Dies stimmt mit den Analysen von Takahashi et al. (2011), Rourke et al. (2014) und der Biodatenbank BioGPS überein [63], [158]. Wanninger et al. detektierten CMKLR1-Protein in murinen und humanen Hepatozyten und vermuten eine regulatorische Rolle bei der nichtalkoholischen Fettlebererkrankung [273].

Niedrige Level an CMKLR1-mRNA wurde in murinem und humanem Gehirn gefunden. Peng et al. detektierten murines CMKLR1-Protein in den Gliazellen der Mikroglia sowie in Astrozyten und beschrieben das Alzheimer-progressierende  $\beta$ -Amyloid-Peptid als neuen Liganden für CMKLR1 [274]. Diese Studien beschreiben außerdem eine erhöhte CMKLR1-Expression im Gehirn bei Alzheimerpatienten [274]. Im Zuge dieser Arbeit zeigten Expressionsuntersuchen an GPR1-mRNA zusätzlich eine Expression in murinem und porcinem Gehirn (übereinstimmend mit [63] und [www.BioGPS.org](http://www.BioGPS.org)). Eine detailliertere Lokalisation erfolgte durch Hossain et al.. Sie wiesen GPR1-mRNA sowohl in murinen Neuronen als auch in Astrozyten nach [275].

Anhand dieser Studien wäre ein Einfluss von CMKLR1 auf die Entwicklung von Alzheimer denkbar. Neben einer Affinität des  $\beta$ -Amyloid-Peptids zu CMKLR1 könnte dieses womöglich ein wei-

terer Ligand für GPR1 sein. Damit wären diese Rezeptoren neue interessante *Targets* für die Alzheimerforschung.

Die stärkste GPR1-Expression in Schweinegewebe wurde in der Milz und Nebenniere verzeichnet. Weiterhin wurde hier GPR1-mRNA in der Lunge und den Ovarien gemessen (übereinstimmend mit [www.BioGPS.org](http://www.BioGPS.org)). Die Expression von GPR1-mRNA in muriner Nebenniere und Lunge war hingegen sehr gering. Hierin zeigten sich große Unterschiede zwischen den Spezies Maus und Schwein.

Die Analyse der CCRL2-mRNA ließ auf weitere Spezies-abhängige Diversitäten schließen. In den getesteten humanen Proben konnte nur wenig bis gar keine CCRL2-mRNA detektiert werden. Die CCRL2-Expression an Schweinegewebe war in der Lunge am höchsten (übereinstimmend mit [www.BioGPS.org](http://www.BioGPS.org)). Außerdem konnte in allen analysierten murinen Geweben CCRL2-mRNA nachgewiesen werden, wobei die Expressionsverhältnisse zwischen Herz, Gehirn, Leber, Fettgewebe und Pankreas mit den publizierten Daten von Takahashi et al. (2011) konform sind [158]. Die Analyse der mRNA des Liganden Chemerin (Genbezeichnung RARRES2) zeigte die höchste Expressionen in der Leber sowie im humanen und murinen Pankreas (übereinstimmend mit [158]; [www.BioGPS.org](http://www.BioGPS.org); [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org) und [www.GTExPortal.org](http://www.GTExPortal.org)). Die gemessene RARRES2-Expression in Ovarien, Niere, Nebenniere und Fettgewebe war ebenfalls aus der Literatur bekannt ([www.BioGPS.org](http://www.BioGPS.org); [www.GTExPortal.org](http://www.GTExPortal.org); [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)).

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Eine frühzeitige Erkennung von Tumoren und Metastasen sowie die Krebsdiagnose bestimmt maßgeblich den Erfolg einer Krebstherapie. Das *Targeting* von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) in Krebszellen ermöglicht die gezielte Visualisierung und selektive Behandlung von *Target*-positiven Tumorentitäten. Der *Chemokine-like receptor 1* (CMKLR1) wird in Tumoren verschiedener Entitäten, wie zum Beispiel dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und dem pankreatischen Adenokarzinom, überexprimiert. Stabilisierte Varianten von Chemerin-9 als Ligand von CMKLR1 wurden bereits in der Arbeitsgruppe entwickelt und deren Affinität bestätigt. Ziel dieser Dissertation war die Identifizierung neuer CMKLR1-positiver Tumorentitäten und die Charakterisierung der stabilisierten Chemerin-9-Sonden an CMKLR1-exprimierenden Xenografts für die bildgebende Diagnostik.

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde eine Überexpression von CMKLR1 in der Brustkrebszelllinie DU4475 nachgewiesen. Expressionsanalysen an einem *Tissue-Array* verifizierten das Mammakarzinom als neue CMKLR1-positive Tumorentität.

Durch Kombination der zwei optimierten Chemerin-9 Peptidanaloga mit verschiedenen Linkern und dem Nahinfrarotfarbstoff ITCC ergaben sich zehn Konjugate. In initialen optischen *Imaging*-versuchen wurden diese an tumortragenden Nacktmäusen mit CMKLR1-positiven DU4475- und *Target*-negativen SW13-Xenografts getestet. Die vier Sonden mit dem höchsten Signalverhältnis zwischen CMKLR1-positiven und CMKLR1-negativen Tumorsignalen wurden durch die Kombination mit unspezifischen *scrambled*-Sonden auf ihre *Target*-Spezifität in der NIRF-Bildgebung *in vivo* weiter charakterisiert. Hieraus resultierte eine signifikante *Target*-spezifische Anreicherung von zwei Chemerin-9-basierten Sonden in den CMKLR1-positiven DU4475-Tumoren. Die *in vivo* Tumorakkumulation der Konjugate war abhängig von deren physikochemischen Eigenschaften. Exemplarische klinische Anwendungsmöglichkeiten der hochaffinen, optimierten Chemerin-Sonden liegen in der Mammografie und der intraoperativen Bildgebung.

Ein weiteres Ziel dieser Doktorarbeit war die Untersuchung des Einflusses von Chemerin auf die Glucagonsekretion. Aus der Literatur war bekannt, dass Chemerin im Pankreas exprimiert wird und den Fettstoffwechsel sowie die Glukosehomöostase beeinflusst. CMKLR1 konnte außerdem in unserer Arbeitsgruppe auf humanen pankreatischen  $\alpha$ -Zellen nachgewiesen werden.

Weder Glucagon- noch Insulin-Sekretionsassays an pankreatischen Nagerzelllinien zeigten einen Einfluss von Chemerin, obwohl eine Rezeptorexpression auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde. Als Organismus-bezogenes System wurden Sekretionsuntersuchungen an primären humanen pankreatische Inseln durchgeführt. Auch hier wurde kein Einfluss von Chemerin auf die Glucagon- sowie Insulin-Sekretion nachgewiesen. Nur Inseln von zwei der vier getesteten Patienten zeigten eine physiologische Antwort in der Insulinsekretion. Durch unterschiedliche Gluko-

sekonzentrationen im Zellkulturmedium konnte keine veränderte Glucagonsekretion festgestellt werden. Damit konnte *in vitro* das biologische Verhalten nicht nachgebildet werden.

Expressionsanalysen an den pankreatischen Inseln bestätigten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene das Vorhandensein von CMKLR1, wobei immunhistochemische Färbungen die Ko-Lokalisation von CMKLR1 und den Glucagon-exprimierenden  $\alpha$ -Zellen verifizierten. Für die Bestätigung der Theorie, ob CMKLR1 ein *Target* für  $\alpha$ -Zellen darstellt und somit für die Behandlung von Diabetes mellitus geeignet ist, ist ein funktionierendes experimentelles System Voraussetzung. Die hier beschriebenen Inseln zeigten keine physiologische Resonanz und es konnte bis *dato* keine weitere Bezugsquelle für humane pankreatische Inseln gefunden werden.

## 7.1. SUMMARY

Early detection of tumors and metastases and cancer diagnosis are essential for a successful cancer therapy. The targeting of G protein-coupled receptors (GPCRs) in cancer cells enables the targeted visualization and selective treatment of target-positive tumors. The chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) is overexpressed in different tumor entities, such as esophageal squamous cell carcinoma and pancreatic adenocarcinoma. Stabilized variants of chemerin-9, a ligand of CMKLR1, have already been developed in the group. The aim of this thesis was the identification of novel CMKLR1-expressing tumor entities and to characterize stabilized chemerin-9 probes on CMKLR1-positive xenografts for diagnostic imaging approaches.

Overexpression of CMKLR1 was detected in the mamma cacinoma cell line DU4475. Tissue array analysis verified breast cancer as a new CMKLR1-positive tumor entity.

Through combination of the two optimized chemerin-9-based peptide analogs with different linkers and the nearinfrared dye ITCC, ten conjugates were developed. In initial optical imaging experiments, they were tested on tumor-bearing nude mice with CMKLR1-positive DU4475- and target-negative SW13 xenografts. By combination with non-specific scrambled probes, the four probes with the highest ratio between CMKLR1-positive and CMKLR1-negative tumor signals were further characterized regarding their target specificity. This resulted in a significant, target-specific accumulation of two chemerin-9 probes in the CMKLR1-positive DU4475 tumors. The *in vivo* tumor accumulation of the conjugates was dependent on their physicochemical properties. Clinical applications of the optimized chemerin peptid probes could be mammography and intraoperative imaging.

Another aim of this thesis was to investigate the impact of chemerin on glucagon secretion. It was published that chemerin is expressed in the pancreas and affects fat metabolism and glucose homeostasis. Furthermore, CMKLR1 could be detected in human pancreatic  $\alpha$ -cells.

Neither glucagon nor insulin secretion analysis with pancreatic rodent cell lines showed an impact of chemerin although a receptor expression (mRNA) was detectable. Further secretion studies were performed on primary human pancreatic islets as an organism-homologous system. Again, no influence of chemerin on the glucagon and insulin secretion was detected. Islets of two of the four tested patients showed a physiological response of insulin secretion. Different concentrations of glucose did not alter glucagon secretion. Thus, the biological response could not be reproduced *in vitro*.

Analysis of the pancreatic islets confirmed both at the mRNA and the protein level, the presence of CMKLR1. By immunohistochemical stainings, colocalization of CMKLR1 and the glucagon expressing  $\alpha$ -cells was verified.

To confirm that CMKLR1 is a promising target for  $\alpha$ -cells and suitable for the treatment of diabetes mellitus, a reliable experimental system is required.

The tested islets did not show a physiological response and for now no other source of human pancreatic islets could be identified.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. L. Pierce, R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz, "Seven-transmembrane receptors.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 9, pp. 639–50, Sep. 2002.
- [2] R. J. Lefkowitz, "Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors.," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 25, no. 8, pp. 413–22, Aug. 2004.
- [3] A. Salahpour, S. Angers, and M. Bouvier, "Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 11, no. 5, pp. 163–168, 2000.
- [4] M. C. Lagerström and H. B. Schiöth, "Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 4, pp. 339–57, Apr. 2008.
- [5] R. Fredriksson, D. E. I. Gloriam, P. J. Höglund, M. C. Lagerström, and H. B. Schiöth, "There exist at least 30 human G-protein-coupled receptors with long Ser/Thr-rich N-termini," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 301, pp. 725–734, 2003.
- [6] D. K. Vassilatis, J. G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J. E. Ranchalis, M. T. Mortrud, A. Brown, S. S. Rodriguez, J. R. Weller, A. C. Wright, J. E. Bergmann, and G. a Gaitanaris, "The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, pp. 4903–4908, 2003.
- [7] M. Laburthe, a Couvineau, P. Gaudin, J. J. Maoret, C. Rouyer-Fessard, and P. Nicole, "Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 805, pp. 94–109; discussion 110–111, 1996.
- [8] K. Takeda, O. Takeuchi, and S. Akira, "Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors.," *J. Endotoxin Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 459–463, 2002.
- [9] C. M. Tang and P. a. Insel, "GPCR expression in the heart: 'New' receptors in myocytes and fibroblasts," *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 14, no. 3, pp. 94–99, 2004.
- [10] J. K. Walker and J. T. Fisher, "Editorial overview: Respiratory: GPCR signaling and the lung," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 16, pp. iv–vi, 2014.
- [11] T. Zyryanova, R. Schneider, V. Adams, D. Sittig, C. Kerner, C. Gebhardt, H. Ruffert, S. Glasmacher, P. Hepp, K. Punkt, J. Neuhaus, J. Hamann, and G. Aust, "Skeletal muscle expression of the adhesion-GPCR CD97: CD97 deletion induces an abnormal structure of the sarcoplasmic reticulum but does not impair skeletal muscle function," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, pp. 1–16, 2014.
- [12] A. C. Emery, M. V Eiden, T. Mustafa, and L. E. Eiden, "Activation in Neuronal and Endocrine Cells," *Sci. Signal*, vol. 6, no. 281, 2014.
- [13] E. Serebryany, G. A. Zhu, and E. C. Y. Yan, "Artificial membrane-like environments for in vitro studies of purified G-protein coupled receptors.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1818, no. 2, pp. 225–33, Feb. 2012.
- [14] H. Fehmann and M. Jangen, "Interaction of glucagon-like peptide-I (GLP-I) and galanin in insulin (bTC-1)- and somatostatin (RIN T3)-secreting cells and evidence that both peptides have no receptors on glucagon ( INR1G9 ) -secreting cells," *Diabetologia*, vol. 32, pp. 176–181, 1995.
- [15] J. Bockaert and J. P. Pin, "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success," *EMBO J.*, vol. 18, no. 7, pp. 1723–1729, 2000.
- [16] T. Yamauchi, J. Kamon, and Y. Ito, "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects," vol. 423, no. June, 2003.
- [17] M. Wistrand, L. Käll, E. L. L. Sonnhhammer, M. Wistrand, and L. Ka, "A general model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs A general

- model of G protein-coupled receptor sequences and its application to detect remote homologs," pp. 509–521, 2006.
- [18] T. Warne, M. J. Serrano-Vega, J. G. Baker, R. Moukhametzianov, P. C. Edwards, R. Henderson, A. G. W. Leslie, C. G. Tate, and G. F. X. Schertler, "Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor.," *Nature*, vol. 454, pp. 486–491, 2008.
- [19] S. M. Foord, T. O. M. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J. Pin, A. P. Davenport, M. Spedding, and A. J. Harmar, "International Union of Pharmacology . XLVI . G Protein-Coupled Receptor List," *Pharmacol. Rev.*, vol. 57, no. 2, pp. 279–288, 2005.
- [20] D. T. Chalmers and D. P. Behan, "The use of constitutively active GPCRs in drug discovery and functional genomics.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, pp. 599–608, 2002.
- [21] P. a Hargrave and J. H. McDowell, "Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors.," *FASEB J.*, vol. 6, pp. 2323–2331, 1992.
- [22] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, I. Le Trong, D. C. Teller, and T. Okada, "Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein – Coupled Receptor," *Science (80-. )*, vol. 739, pp. 739–45, 2007.
- [23] E. Pebay-Peyroula, G. Rummel, J. P. Rosenbusch, and E. M. Landau, "X-ray Structure of Bacteriorhodopsin at 2 . 5 Angstroms from Microcrystals Grown in Lipidic Cubic Phases," *Science (80-. )*, vol. 277, no. 5332, pp. 1676–1681, 1997.
- [24] H. B. Schiöth and R. Fredriksson, "The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective.," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 142, no. 1–2, pp. 94–101, May 2005.
- [25] D. E. Gloriam, R. Fredriksson, and H. B. Schiöth, "The G protein-coupled receptor subset of the rat genome.," *BMC Genomics*, vol. 8, p. 338, 2007.
- [26] A. J. Harmar, R. a. Hills, E. M. Rosser, M. Jones, O. P. Buneman, D. R. Dunbar, S. D. Greenhill, V. a. Hale, J. L. Sharman, T. I. Bonner, W. a. Catterall, A. P. Davenport, P. Delagrangé, C. L. Dollery, S. M. Foord, G. a. Gutman, V. Laudet, R. R. Neubig, E. H. Ohlstein, R. W. Olsen, J. Peters, J. P. Pin, R. R. Ruffolo, D. B. Searls, M. W. Wright, and M. Spedding, "IUPHAR-DB: The IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, pp. 680–685, 2009.
- [27] F. Horn, J. Weare, M. W. Beukers, S. Hörsch, A. Bairoch, W. Chen, O. Edvardsen, F. Campagne, and G. Vriend, "GPCRDB: An Information System for G Protein Coupled Receptors," *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 227–281, 1998.
- [28] X. Tang, Y. Wang, D. Li, J. Luo, and M. Liu, "Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets.," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 33, no. 3, pp. 363–71, Mar. 2012.
- [29] O. Civelli, Y. Saito, Z. Wang, H.-P. Nothacker, and R. K. Reinscheid, "Orphan GPCRs and their ligands.," *Pharmacol. Ther.*, vol. 110, no. 3, pp. 525–32, Jun. 2006.
- [30] E. Jacoby, R. Bouhelal, M. Gerspacher, and K. Seuwen, "The 7 TM G-protein-coupled receptor target family.," *ChemMedChem*, vol. 1, no. 8, pp. 761–82, Aug. 2006.
- [31] M. Yoshida, M. Miyazato, and K. Kangawa, *Orphan GPCRs and Methods for Identifying Their Ligands*, 1st ed., vol. 514. Elsevier Inc., 2012.
- [32] E. Hermans, "Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors," *Pharmacol. Ther.*, vol. 99, pp. 25–44, 2003.
- [33] S. K. F. Wong, "G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs," *NeuroSignals*, vol. 12, pp. 1–12, 2003.
- [34] M. Sato, J. B. Blumer, V. Simon, and S. M. Lanier, "Accessory Proteins for G proteins: Partners in Signaling," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 46, pp. 151–87, 2006.
- [35] M. J. Marinissen and J. S. Gutkind, "G-protein-coupled receptors and signaling networks: Emerging paradigms," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 22, no. 7, pp. 368–376, 2001.

- [36] M. J. Marinissen, M. Chiariello, and J. S. Gutkind, "Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway.," *Genes Dev.*, vol. 15, pp. 535–553, 2001.
- [37] S. L. Ritter and R. a Hall, "NIH Public Access," *Mol. Cell*, vol. 10, no. 12, pp. 819–830, 2010.
- [38] W. M. Oldham and H. E. Hamm, "Structural basis of function in heterotrimeric G proteins.," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 39, pp. 117–166, 2006.
- [39] Y. Hakak, D. Shrestha, M. C. Goegel, D. P. Behan, and D. T. Chalmers, "Global analysis of G-protein-coupled receptor signaling in human tissues," *FEBS Lett.*, vol. 550, pp. 11–17, 2003.
- [40] K. Wang and Y. H. Wong, "G Protein signaling controls the differentiation of multiple cell lineages," *BioFactors*, vol. 35, no. 3, pp. 232–238, 2009.
- [41] S. S. Ferguson, "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–24, 2001.
- [42] A. C. Hanyaloglu and M. von Zastrow, "Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 48, pp. 537–568, 2008.
- [43] R. H. Moore, E. E. Millman, V. Godines, N. a. Hanania, T. M. Tran, H. Peng, B. F. Dickey, B. J. Knoll, and R. B. Clark, "Salmeterol stimulation dissociates  $\beta$ 2-adrenergic receptor phosphorylation and internalization," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 36, no. 15, pp. 254–261, 2007.
- [44] L. M. Luttrell, S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, "Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes.," *Science*, vol. 283, pp. 655–661, 1999.
- [45] R. J. Lefkowitz and S. K. Shenoy, "Review: Transduction of Receptor Signals," *Science (80-. ).*, vol. 512, pp. 512–518, 2005.
- [46] I. Gsandtner and M. Freissmuth, "A tail of two signals: the C terminus of the A(2A)-adenosine receptor recruits alternative signaling pathways.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 70, pp. 447–449, 2006.
- [47] E. J. Whalen, S. Rajagopal, and R. J. Lefkowitz, "Therapeutic potential of  $\beta$ -arrestin- and G protein-biased agonists," *Trends Mol. Med.*, vol. 17, no. 3, pp. 126–139, 2011.
- [48] I. Gantz, Y. Konda, Y. K. Yang, D. E. Miller, H. a Dierick, and T. Yamada, "Molecular cloning of a novel receptor (CMKLR1) with homology to the chemotactic factor receptors.," *Cytogenet. Cell Genet.*, vol. 74, no. 4, pp. 286–290, 1996.
- [49] M. Samson, A. L. Edinger, P. Stordeur, J. Rucker, V. Verhasselt, M. Sharron, C. Govaerts, C. Mollereau, G. Vassart, R. W. Doms, and M. Parmentier, "ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains," *Eur. J. Immunol.*, vol. 28, pp. 1689–1700, 1998.
- [50] W. Vermi, E. Riboldi, V. Wittamer, F. Gentili, W. Luini, S. Marrelli, A. Vecchi, J.-D. Franssen, D. Communi, L. Massardi, M. Sironi, A. Mantovani, M. Parmentier, F. Facchetti, and S. Sozzani, "Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin.," *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 4, pp. 509–515, 2005.
- [51] M. Arita, T. Ohira, Y.-P. Sun, S. Elangovan, N. Chiang, and C. N. Serhan, "Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation.," *J. Immunol.*, vol. 178, pp. 3912–3917, 2007.
- [52] S. Parolini, A. Santoro, E. Marcenaro, W. Luini, L. Massardi, F. Facchetti, D. Communi, M. Parmentier, A. Majorana, M. Sironi, G. Tabellini, A. Moretta, and S. Sozzani, "The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues," *Blood*, vol. 109, no. 9, pp. 3625–3632, 2007.

- [53] K. Bozaoglu, K. Bolton, J. McMillan, P. Zimmet, J. Jowett, G. Collier, K. Walder, and D. Segal, "Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome," *Endocrinology*, vol. 148, pp. 4687–4694, 2007.
- [54] J. Kaur, R. Adya, B. K. Tan, J. Chen, and H. S. Randeve, "Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 391, no. 4, pp. 1762–8, Jan. 2010.
- [55] B. a. Zabel, S. J. Allen, P. Kulig, J. a. Allen, J. Cichy, T. M. Handel, and E. C. Butcher, "Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 34661–34666, 2005.
- [56] V. Wittamer, J.-D. Franssen, M. Vulcano, J.-F. Mirjolet, E. Le Poul, I. Migeotte, S. Brézillon, R. Tyldesley, C. Blanpain, M. Detheux, A. Mantovani, S. Sozzani, G. Vassart, M. Parmentier, and D. Communi, "Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids.," *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 7, pp. 977–85, Oct. 2003.
- [57] W. Meder, M. Wendland, a. Busmann, C. Kutzleb, N. Spodsberg, H. John, R. Richter, D. Schleuder, M. Meyer, and W. G. Forssmann, "Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23," *FEBS Lett.*, vol. 555, no. 3, pp. 495–499, 2003.
- [58] V. Wittamer, F. Grégoire, P. Robberecht, G. Vassart, D. Communi, and M. Parmentier, "The C-terminal nonapeptide of mature chemerin activates the chemerin receptor with low nanomolar potency.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 11, pp. 9956–62, Mar. 2004.
- [59] K. Shimamura, M. Matsuda, Y. Miyamoto, R. Yoshimoto, T. Seo, and S. Tokita, "Identification of a stable chemerin analog with potent activity toward ChemR23.," *Peptides*, vol. 30, no. 8, pp. 1529–38, Aug. 2009.
- [60] V. Wittamer, B. Bondue, A. Guillaert, G. Vassart, M. Parmentier, and D. Communi, "Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity.," *J. Immunol.*, vol. 175, pp. 487–493, 2005.
- [61] J. L. Cash, R. Hart, A. Russ, J. P. C. Dixon, W. H. Colledge, J. Doran, A. G. Hendrick, M. B. L. Carlton, and D. R. Greaves, "Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 4, pp. 767–75, Apr. 2008.
- [62] G. Barnea, W. Strapps, G. Herrada, Y. Berman, J. Ong, B. Kloss, R. Axel, and K. J. Lee, "The genetic design of signaling cascades to record receptor activation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 1, pp. 64–69, Jan. 2008.
- [63] J. L. Rourke, S. Muruganandan, H. J. Dranse, N. M. McMullen, and C. J. Sinal, "Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice.," *J. Endocrinol.*, vol. 222, no. 2, pp. 201–15, Aug. 2014.
- [64] J. B. Regard, I. T. Sato, and S. R. Coughlin, "Anatomical Profiling of G Protein-Coupled Receptor Expression," *Cell*, vol. 135, no. 1998, pp. 561–571, 2008.
- [65] M. Reverchon, C. Rame, M. Bertoldo, and J. Dupont, "Adipokines and the Female Reproductive Tract," *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2014, pp. 2056–2057, 2013.
- [66] J. L. Rourke, H. J. Dranse, and C. J. Sinal, "Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease.," *Obes. Rev.*, vol. 14, no. 3, pp. 245–62, Mar. 2013.
- [67] B. Bondue, V. Wittamer, and M. Parmentier, "Chemerin and its receptors in leukocyte trafficking, inflammation and metabolism.," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 22, no. 5–6, pp. 331–8, 2011.
- [68] B. a Zabel, S. Nakae, L. Zúñiga, J.-Y. Kim, T. Ohyama, C. Alt, J. Pan, H. Suto, D. Soler, S. J. Allen, T. M. Handel, C. H. Song, S. J. Galli, and E. C. Butcher, "Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 10, pp. 2207–2220, 2008.
- [69] J. Monnier, S. Lewén, E. O'Hara, K. Huang, H. Tu, E. C. Butcher, and B. a Zabel, "Expression,

- regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells.," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 2, pp. 956–67, Jul. 2012.
- [70] K. Otero, A. Vecchi, E. Hirsch, J. Kearley, W. Vermi, A. Del Prete, S. Gonzalvo-feo, C. Garlanda, and O. Azzolino, "Europe PMC Funders Group Non-redundant role of CCRL2 in lung dendritic cell trafficking," *Blood*, vol. 116, no. 16, pp. 2942–2949, 2012.
- [71] J. P. Overington, J. P. Overington, B. Al-Lazikani, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, and A. L. Hopkins, "How many drug targets are there?," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, pp. 993–6, 2006.
- [72] N. Robas, M. O'Reilly, S. Katugampola, and M. Fidock, "Maximizing serendipity: Strategies for identifying ligands for orphan G-protein-coupled receptors," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 3, pp. 121–126, 2003.
- [73] K. Lundstrom, "Latest development in drug discovery on G protein-coupled receptors," *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 7, no. 5, pp. 465–70, 2006.
- [74] K. Lundstrom, "An overview on GPCRs and drug discovery: structure-based drug design and structural biology on GPCRs," *G Protein-Coupled Recept. Drug Discov.*, vol. 552, pp. 51–56, 2009.
- [75] D. Young, G. Waitches, C. Birchmeier, O. Fasano, and M. Wigler, "Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains.," *Cell Press*, vol. 45, pp. 711–719, 1986.
- [76] S. Li, S. Huang, and S.-B. Peng, "Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression.," *Int. J. Oncol.*, vol. 27, no. 5, pp. 1329–1339, 2005.
- [77] R. Lappano and M. Maggiolini, "G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 1, pp. 47–60, 2011.
- [78] C. Sawyers, "Targeted cancer therapy.," *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 294–297, 2004.
- [79] L. Baldi, D. L. Hacker, M. Adam, and F. M. Wurm, "Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives," *Biotechnol. Lett.*, vol. 29, pp. 677–684, 2007.
- [80] D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. Liras, and D. Price, "The Future of Peptide-based Drugs," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 81, pp. 136–147, 2013.
- [81] K. Bellmann-Sickert and A. G. Beck-Sickingler, "Peptide drugs to target G protein-coupled receptors," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 31, no. 9, pp. 434–441, 2010.
- [82] K. E. Öberg, "Is it time to widen the use of somatostatin analogs in neuroendocrine tumors?," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 28, pp. 3635–4636, 2009.
- [83] J. C. Reubi, "Peptide receptor expression in GEP-NET," *Virchows Arch.*, vol. 451, pp. 47–50, 2007.
- [84] J. C. Reubi, W. H. Hacki, and S. W. J. Lamberts, "Hormone-producing gastrointestinal tumors contain a high density of somatostatin receptors," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 65, no. 6, pp. 1127–1134, 1987.
- [85] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, and R. Guillemin, "Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone.," *Science (80- )*, vol. 179, pp. 77–79, 1973.
- [86] Y. C. Patel, "Somatostatin and its receptor family," *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 20, no. 3, pp. 157–198, 1999.
- [87] A. V Schally, "Oncological Applications of Somatostatin Analogues Oncological Applications of Somatostatin Analogues1," *Cancer Res.*, vol. 48, pp. 6977–6985, 1988.
- [88] C. Erem, A. Hacıhasanoglu, A. Sari, H. Onder Ersöz, K. Uking, and S. Fidan, "A rare case and a rapid tumor response to therapy: dramatic reduction in tumor size during octreotide treatment in a patient with TSH-secreting pituitary macroadenoma.," *Endocrine*, vol. 25, no. 2, pp. 141–

- 145, 2004.
- [89] K. E. Öberg, "Gastrointestinal neuroendocrine tumors," *Ann. Gastroenterol.*, vol. 16, no. Supplement 7, pp. 34–39, 2003.
- [90] E. Bombardieri, a. Coliva, M. Maccauro, E. Seregini, E. Orunesu, a. Chiti, and G. Lucignani, "Imaging of neuroendocrine tumours with gamma-emitting radiopharmaceuticals," *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 54, no. 1, pp. 3–15, 2010.
- [91] P. Pessaux, D. Varma, and J. P. Arnaud, "Pancreaticoduodenectomy: Superior Mesenteric Artery First Approach," *J. Gastrointest. Surg.*, vol. 10, no. 4, pp. 607–611, 2006.
- [92] P. Castaldi, V. Rufini, G. Treglia, I. Bruno, G. Perotti, G. Stifano, B. Barbaro, and a. Giordano, "Impatto della fusione di immagini SPECT/TC con <sup>111</sup>In-DTPA- octreotide nel management dei tumori neuroendocrini," *Radiol. Medica*, vol. 113, pp. 1056–1067, 2008.
- [93] E. S. Delpassand, J. Sims-Mourtada, H. Saso, A. Azhdarinia, F. Ashoori, F. Torabi, G. Espenan, W. H. Moore, E. Woltering, and L. Anthony, "Safety and efficacy of radionuclide therapy with high-activity In-111 pentetretotide in patients with progressive neuroendocrine tumors.," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 23, no. 3, pp. 292–300, 2008.
- [94] I. M. Modlin, M. Pavel, M. Kidd, and B. I. Gustafsson, "Review article: Somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 31, no. 2, pp. 169–188, 2010.
- [95] E. P. Krenning, W. H. Bakker, W. a Breeman, J. W. Koper, P. P. Kooij, L. Ausema, J. S. Lameris, J. C. Reubi, and S. W. Lamberts, "Localisation of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin.," *Lancet*, vol. 1, no. 8632, pp. 242–244, 1989.
- [96] M. Rizzo, R. Iyengar, S. G. a Gabram, J. Park, G. Birdsong, K. L. Chandler, and M. B. Mosunjac, "The effects of additional tumor cavity sampling at the time of breast-conserving surgery on final margin status, volume of resection, and pathologist workload.," *Ann. Surg. Oncol.*, vol. 17, pp. 228–234, 2010.
- [97] A. L. Vahrmeijer, M. Hutteman, and J. R. van der Vorst, "Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 10, no. 9, pp. 507–518, 2014.
- [98] B. E. Schaafsma, V. Der Vorst, P. J. K. Kuppen, C. W. G. M. Löwik, V. John, C. J. H. Van De Velde, and A. L. Vahrmeijer, "The clinical use of indocyanine green as NIR fluorescent contrast agent for image guided oncology surgery," *J. Surg. Oncol.*, vol. 104, no. 3, pp. 323–332, 2012.
- [99] S. Gioux, H. S. Choi, and J. F. Frangioni, "Fundamentals of Clinical Translation Principles of Operation," *Mol. Imaging*, vol. 9, no. 5, pp. 237–255, 2011.
- [100] C. Bremer, C. Tung, A. Bogdanov, and R. Weissleder, "Imaging of Differential Protease Expression in Breast Cancers for Detection of Aggressive Tumor Phenotypes 1," *Radiology*, 2002.
- [101] C. Bremer, M. Mustafa, A. Bogdanov, V. Ntziachristos, A. Petrovsky, and R. Weissleder, "Radiology Steady-State Blood Volume Measurements in Experimental Tumors with Different Angiogenic Burdens — A Study in Mice 1," *Radiology*, no. 5, pp. 214–20, 2003.
- [102] R. Weissleder, "A clearer vision for in vivo imaging. Progress continues in the development of smaller, more penetrable probes for biological imaging.," *Nature*, 2001.
- [103] D. K. Emerson, K. K. Limmer, D. J. Hall, S.-H. Han, W. C. Eckelman, C. J. Kane, a. M. Wallace, and D. R. Vera, "A Receptor-targeted Fluorescent Radiopharmaceutical for Multireporter Sentinel Lymph Node Imaging," *Radiology*, vol. 265, no. 1, pp. 186–193, 2012.
- [104] H. S. Choi, S. L. Gibbs, J. H. Lee, S. H. Kim, Y. Ashitate, F. Liu, H. Hyun, G. Park, Y. Xie, S. Bae, M. Henary, and J. V Frangioni, "Targeted zwitterionic near-infrared fluorophores for improved optical imaging.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 31, no. 2, pp. 148–53, 2013.
- [105] E. S. Olson, T. Jiang, T. a Aguilera, Q. T. Nguyen, L. G. Ellies, M. Scadeng, and R. Y. Tsien, "Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for in vivo fluorescence and MR imaging of proteases.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 9,

- pp. 4311–4316, 2010.
- [106] A. Richmond and Y. Su, "Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics.," *Dis. Model. Mech.*, vol. 1, no. 2–3, pp. 78–82, 2013.
- [107] S. P. Flanagan, "'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse," *Genet. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 295–309, 1966.
- [108] M. J. Bosma and A. M. Carroll, "The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 9, pp. 323–350, 1991.
- [109] C. L. Morton and P. J. Houghton, "Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice.," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 2, pp. 247–50, Jan. 2007.
- [110] P. J. Houghton, C. L. Morton, and C. Tucker, "The Pediatric Preclinical Testing Program: Description of Models and Early Testing Results," *Pediatr Blood Cancer*, vol. 49, no. 7, pp. 1526–1531, 2007.
- [111] N. K. Tafreshi, X. Huang, V. E. Moberg, N. M. Barkey, V. K. Sondak, H. Tian, D. L. Morse, and J. Vagner, "Synthesis and Characterization of a Melanoma-Targeted Fluorescence Imaging Probe by Conjugation of a Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Specific Ligand," *Bioconjug. Chem.*, 2012.
- [112] S. Kwon, S. Ke, J. P. Houston, W. Wang, Q. Wu, C. Li, and E. M. Sevick-Muraca, "Imaging dose-dependent pharmacokinetics of an RGD-fluorescent dye conjugate targeted to alpha-v-beta-3 receptor expressed in Kaposi's sarcoma," *Mol. Imaging*, vol. 4, no. 2, pp. 75–87, 2005.
- [113] R. K. Pachynski, B. a Zabel, H. E. Kohrt, N. M. Tejeda, J. Monnier, C. D. Swanson, A. K. Holzer, A. J. Gentles, G. V Sperinde, A. Edalati, H. a Hadeiba, A. a Alizadeh, and E. C. Butcher, "The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses.," *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 8, pp. 1427–35, Jul. 2012.
- [114] C. Wang, W. K. K. Wu, X. Liu, K.-F. To, G. G. Chen, J. Yu, and E. K. W. Ng, "Increased serum chemerin level promotes cellular invasiveness in gastric cancer: a clinical and experimental study.," *Peptides*, vol. 51, pp. 131–8, Jan. 2014.
- [115] Y. Zheng, G. Wang, Z. Peng, W. Zeng, S. Tan, Y. Xi, and J. Fan, "Downregulation of tazarotene induced gene-2 (TIG2) in skin squamous cell carcinoma," *Eur J Dermatol*, vol. 18, no. 6, pp. 638–641, 2008.
- [116] S. Zhao, C. Li, Y. -b. Ye, F. Peng, and Q. Chen, "Expression of Chemerin Correlates With a Favorable Prognosis in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer," *Lab. Med.*, vol. 42, no. 9, pp. 553–557, Aug. 2011.
- [117] N. Wang, Q.-J. Wang, Y.-Y. Feng, W. Shang, and M. Cai, "Overexpression of chemerin was associated with tumor angiogenesis and poor clinical outcome in squamous cell carcinoma of the oral tongue.," *Clin. Oral Investig.*, vol. 18, no. 3, pp. 997–1004, Apr. 2014.
- [118] X. Qu, L. Han, S. Wang, Q. Zhang, C. Yang, S. Xu, and L. Zhang, "[Detection of Chemerin and It's Clinical Significance in Peripheral Blood of Patients with Lung Cancer].," *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, vol. 12, no. 11, pp. 1174–7, Nov. 2009.
- [119] Y. Yamaguchi, X.-Y. Du, L. Zhao, J. Morser, and L. L. K. Leung, "Proteolytic cleavage of chemerin protein is necessary for activation to the active form, Chem157S, which functions as a signaling molecule in glioblastoma.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 45, pp. 39510–9, Nov. 2011.
- [120] Q. Schefer, "Generation of New GPCR-Antibodies for Target Validation in Tumor Diagnosis and Therapy," Freie Universität Berlin, 2012.
- [121] S. Bandholtz, "Entwicklung von Peptid-Analoga für die Rezeptor-vermittelte Tumordiagnostik," Universität Potsdam, 2011.
- [122] M. F. Powell, T. Stewart, L. Otvos Jr, L. Urge, F. C. a Gaeta, A. Sette, T. Arrhenius, D. Thomson, K. Soda, and S. M. Colon, "Peptide Stability in Drug Development. II. Effect of Single Amino Acid Substitution and Glycosylation on Peptide Reactivity in Human Serum,"

- Pharm. Res.*, vol. 10, no. 9, pp. 1268–1273, 1993.
- [123] S. Gazal, G. Geleman, O. Ziv, O. Karpov, P. Litman, M. Bracha, M. Afargan, and C. Gilon, "Human somatostatin receptor specificity of backbone-cyclic analogues containing novel sulfur building units," *J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 8, pp. 1665–1671, 2002.
- [124] P. B. Jeppesen, E. L. Sanguinetti, a Buchman, L. Howard, J. S. Scolapio, T. R. Ziegler, J. Gregory, K. a Tappenden, J. Holst, and P. B. Mortensen, "Teduglutide (ALX-0600), a dipeptidyl peptidase IV resistant glucagon-like peptide 2 analogue, improves intestinal function in short bowel syndrome patients.," *Gut*, vol. 54, no. 9, pp. 1224–1231, 2005.
- [125] C. Grötzinger, S. Bandholtz, and B. Wiedenmann, "Metabolically stable variants of chemerin 9 (WO2013117581 A1)," 2013.
- [126] A. R. Saltiel and C. R. Kahn, "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism.," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 799–806, 2001.
- [127] D. J. Steiner, A. Kim, K. Miller, and M. Hara, "Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition," *Islets*, vol. 2, no. 3, pp. 135–145, 2010.
- [128] K. Chu, E. Nemoz-Gaillard, and M. J. Tsai, "BETA2 and pancreatic islet development.," *Recent Prog. Horm. Res.*, vol. 56, pp. 23–46, 2001.
- [129] M. a. Von Mach, J. Schlosser, M. Weiland, P. J. Feilen, M. Ringel, J. G. Hengstler, L. S. Weilemann, J. Beyer, P. Kann, and S. Schneider, "Size of pancreatic islets of Langerhans: A key parameter for viability after cryopreservation," *Acta Diabetol.*, vol. 40, no. 3, pp. 123–129, 2003.
- [130] G. Kilimnik, J. Jo, V. Periwal, M. C. Zielinski, and M. Hara, "Quantification of islet size and architecture," *Islets*, vol. 4, no. 2, pp. 167–172, 2012.
- [131] I. Quesada, E. Tudurí, C. Ripoll, and A. Nadal, "Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes.," *J. Endocrinol.*, vol. 199, no. 1, pp. 5–19, Oct. 2008.
- [132] T. Scherer, J. O. Hare, K. Diggins-andrews, M. Schweiger, C. Lindtner, E. Zielinski, P. Vempati, K. Su, T. Milsom, M. Puchowicz, L. Scheja, R. Zechner, J. Fisher, S. F. Previs, and C. Buettner, "Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis," *Cell Metab.*, vol. 13, no. 2, pp. 183–194, 2011.
- [133] R. Pardal and J. López-Barneo, "Low glucose-sensing cells in the carotid body.," *Nat. Neurosci.*, vol. 5, pp. 197–198, 2002.
- [134] J. Gromada, I. Franklin, and C. B. Wollheim, "Alpha-Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research But the Enigma Remains," *Endocr. Rev.*, vol. 28, no. March, pp. 84–116, 2007.
- [135] C. V. Desouza, G. B. Bolli, and V. Fonseca, "Hypoglycemia, diabetes, and cardiovascular events," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 6, pp. 1389–1394, 2010.
- [136] M. R. Rickels and A. Naji, "Reactive hypoglycaemia following GLP-1 infusion in pancreas transplant recipients," *Diabetes Obes Metab.*, vol. 29, no. 8, pp. 997–1003, 2012.
- [137] P. Rorsman, P.-O. Berggren, and K. Bokvist, "Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABAA-receptor chloride channels.," *Nature*, 1981.
- [138] K. Kaneko, T. Shirohani, E. Araki, K. Matsumoto, T. Taguchi, H. Motoshima, K. Yoshizato, H. Kishikawa, and M. Shichiri, "Insulin inhibits glucagon secretion by the activation of PI3-kinase in In-R1-G9 cells," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 44, no. 2, pp. 83–92, May 1999.
- [139] Y. Yoshimoto, Y. Fukuyama, Y. Horio, A. Inanobe, M. Gotoh, and Y. Kurachi, "Somatostatin induces hyperpolarization in pancreatic islet  $\alpha$  cells by activating a G protein-gated K<sup>+</sup> channel," *FEBS Lett.*, vol. 444, no. 2–3, pp. 265–269, Feb. 1999.
- [140] J. S. Moon and K. C. Won, "Pancreatic  $\alpha$ -Cell Dysfunction in Type 2 Diabetes: Old Kids on the Block," *Diabetes Metab. J.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–9, 2015.
- [141] B. Gustafson, S. Hedjazifar, S. Gogg, A. Hammarstedt, and U. Smith, "Insulin resistance and

- impaired adipogenesis," *Trends Endocrinol. Metab.*, pp. 1–8, 2015.
- [142] M. O. Gore and D. K. McGuire, "The 10-year post-trial follow-up of the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS): cardiovascular observations in context," *Diab Vasc Dis Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 53–5, 2009.
- [143] R. S. Sherwin, "Bringing light to the dark side of insulin: A journey across the blood-brain barrier," *Diabetes*, vol. 57, no. 8, pp. 2259–2268, 2008.
- [144] G. J. Hasking, M. D. Esler, G. L. Jennings, D. Burton, J. a Johns, and P. I. Korner, "Norepinephrine spillover to plasma in patients with congestive heart failure: evidence of increased overall and cardiorenal sympathetic nervous activity.," *Circulation*, vol. 73, pp. 615–621, 1986.
- [145] M. Goldenberg, K. L. Pines, and E. F. Baldwin, "The Hemodynamic Response of Man to Nor-Epinephrine and Epinephrine and its Relation to the Problem of Hypertension," *Am. J. Med.*, vol. 5, no. 6, p. 17, 1948.
- [146] P. Rossetti, F. Porcellati, G. B. Bolli, and C. G. Fanelli, "Prevention of hypoglycemia while achieving good glycemic control in type 1 diabetes: the role of insulin analogs.," *Diabetes Care*, vol. 31, pp. 113–20, 2008.
- [147] H. B. Hubert, M. Feinleib, P. M. McNamara, and W. P. Castelli, "Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26- year follow-up of participants in the Framingham Heart Study," *Circulation*, vol. 67, pp. 968–977, 1983.
- [148] S. Moebus, J. Hanisch, P. Bramlage, C. Lösch, H. Hauner, J. Wasem, and K.-H. Jöckel, "Regional Differences in the Prevalence of the Metabolic Syndrome in Primary Care Practices in Germany," *Dtsch. Arztebl.*, vol. 105, no. 7, pp. 207–213, 2008.
- [149] E. a. Ryan, J. R. T. Lakey, R. V. Rajotte, G. S. Korbitt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J. F. Elliott, D. Bigam, N. M. Kneteman, G. L. Warnock, I. Larsen, and a. M. J. Shapiro, "Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the edmonton protocol," *Diabetes*, vol. 50, no. 4, pp. 710–719, 2001.
- [150] R. H. Unger and L. Orci, "The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus," *Lancet*, vol. 1, no. 7897, pp. 14–16, 1975.
- [151] B. E. Dunning and J. E. Gerich, "The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications.," *Endocr. Rev.*, vol. 28, pp. 253–283, 2007.
- [152] G. M. Reaven, Y.-D. I. Chen, and A. L. Golay, "Documentation of Hyperglucagonemia Throughout the Day in Nonobese and Obese Patients with Nininsulin-Dependent Diabetes mellitus," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 64, no. 1, pp. 106–110, 1987.
- [153] R. A. Miller, Q. Chu, and J. Xie, "Biguanides suppress hepatic glucagon signaling by decreasing production of cyclic AMP," *Nature*, vol. 494, no. 7436, pp. 256–260, 2013.
- [154] P. Shah, a Basu, R. Basu, and R. Rizza, "Impact of lack of suppression of glucagon on glucose tolerance in humans.," *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 2 Pt 1, pp. E283–E290, 1999.
- [155] M. C. Ernst, I. D. Haidl, L. a Zúñiga, H. J. Dranse, J. L. Rourke, B. a Zabel, E. C. Butcher, and C. J. Sinal, "Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance.," *Endocrinology*, vol. 153, no. 2, pp. 672–82, Feb. 2012.
- [156] M. C. Ernst, M. Issa, K. B. Goralski, and C. J. Sinal, "Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes.," *Endocrinology*, vol. 151, no. 5, pp. 1998–2007, May 2010.
- [157] L. Rouger, G. R. Denis, S. Luangsay, and M. Parmentier, "ChemR23 knockout mice display mild obesity but no deficit in adipocyte differentiation.," *J. Endocrinol.*, vol. 219, no. 3, pp. 279–89, Dec. 2013.
- [158] M. Takahashi, Y. Okimura, G. Iguchi, H. Nishizawa, M. Yamamoto, K. Suda, R. Kitazawa, W.

- Fujimoto, K. Takahashi, F. N. Zolotaryov, K. S. Hong, H. Kiyonari, T. Abe, H. Kaji, S. Kitazawa, M. Kasuga, K. Chihara, and Y. Takahashi, "Chemerin regulates  $\beta$ -cell function in mice.," *Sci. Rep.*, vol. 1, pp. 1–10, Jan. 2011.
- [159] N. Gruben, M. Aparicio Vergara, N. J. Kloosterhuis, H. van der Molen, S. Stoelwinder, S. Youssef, A. de Bruin, D. J. Delsing, J. A. Kuivenhoven, B. van de Sluis, M. H. Hofker, and D. P. Y. Koonen, "Chemokine-like receptor 1 deficiency does not affect the development of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in mice.," *PLoS One*, vol. 9, no. 4, p. e96345, Jan. 2014.
- [160] K. B. Goralski, T. C. McCarthy, E. a. Hanniman, B. a. Zabel, E. C. Butcher, S. D. Parlee, S. Muruganandan, and C. J. Sinal, "Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 38, pp. 28175–28188, 2007.
- [161] M. Takahashi, Y. Takahashi, K. Takahashi, F. N. Zolotaryov, K. S. Hong, R. Kitazawa, K. Iida, Y. Okimura, H. Kaji, S. Kitazawa, M. Kasuga, and K. Chihara, "Chemerin enhances insulin signaling and potentiates insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes.," *FEBS Lett.*, vol. 582, no. 5, pp. 573–8, Mar. 2008.
- [162] S. Kralisch, S. Weise, G. Sommer, J. Lipfert, U. Lossner, M. Bluher, M. Stumvoll, and M. Fasshauer, "Interleukin-1 $\beta$  induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro.," *Regul. Pept.*, vol. 154, no. 1–3, pp. 102–106, Apr. 2009.
- [163] S. Muruganandan, A. a Roman, and C. J. Sinal, "Role of chemerin/CMKLR1 signaling in adipogenesis and osteoblastogenesis of bone marrow stem cells.," *J. bone Miner. Res.*, vol. 25, no. 2, pp. 222–234, 2010.
- [164] T. Yoshimura and J. J. Oppenheim, "Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); two multifunctional receptors with unusual properties.," *Exp. Cell Res.*, vol. 317, no. 5, pp. 674–84, Mar. 2011.
- [165] Q. Schefer, S. Hallmann, and C. Grötzinger, "Knockin' on pHeaven's door: a fast and reliable high-throughput compatible zero-background cloning procedure.," *Mol. Biotechnol.*, vol. 56, no. 5, pp. 449–58, May 2014.
- [166] R. a Valdés-González, M. L. Silva-Torres, B. Ramírez-González, L. Terán, C. E. Ormsby, and J. T. Ayala-Sumuano, "Improved method for isolation of porcine neonatal pancreatic cell clusters.," *Xenotransplantation*, vol. 12, no. 3, pp. 240–4, May 2005.
- [167] P. R. O. Salvalaggio, S. Deng, C. E. Ariyan, I. Millet, W. S. Zawalich, G. P. Basadonna, and D. M. Rothstein, "Islet filtration: a simple and rapid new purification procedure that avoids ficoll and improves islet mass and function.," *Transplantation*, vol. 74, no. 6, pp. 877–9, Sep. 2002.
- [168] H. Noguchi, B. Naziruddin, A. Jackson, M. Shimoda, Y. Fujita, M. Ueda, T. Okitsu, Y. Iwanaga, H. Nagata, X. Liu, H. Kamiya, N. Onaca, M. F. Levy, and S. Matsumoto, "Comparison of Ulinastatin, Gabexate Mesilate, and Nafamostat Mesilate in Preservation Solution for Islet Isolation," *Cell Transplant.*, vol. 21, pp. 509–516, 2012.
- [169] S. Offermanns and M. I. Simon, "G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to Phospholipase C," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 25, pp. 15175–15180, 1995.
- [170] W. Thomsen, J. Frazer, and D. Unett, "Functional assays for screening GPCR targets," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 16, pp. 655–665, 2005.
- [171] F. C. Greenwood and W. M. Hunter, "The Preparation of <sup>131</sup>I-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity," *Biochem. J.*, vol. 89, no. 1957, pp. 114–123, 1963.
- [172] M. Kidd, B. Nadler, S. Mane, G. Eick, M. Malfertheiner, M. Champaneria, R. Pfragner, and I. Modlin, "GeneChip, geNorm, and gastrointestinal tumors: novel reference genes for real-time PCR.," *Physiol. Genomics*, vol. 30, no. 3, pp. 363–370, 2007.
- [173] C. Dethlefsen, G. Højfeldt, and P. Hojman, "The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 138, no. 3, pp. 657–664, 2013.
- [174] I. Barbieri, S. Pensa, T. Pannellini, E. Quaglino, D. Maritano, M. Demaria, A. Voster, J. Turkson,

- F. Cavallo, C. J. Watson, P. Provero, M. Piero, and V. Poli, "Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors via upregulation of Cten," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 6, pp. 2558–2567, 2010.
- [175] a. Badache and N. E. Hynes, "Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 1, pp. 383–391, 2001.
- [176] Z. Liu, W. Kim, Z. Chen, Y.-K. Shin, O. D. Carlson, J. L. Fiori, L. Xin, J. K. Napora, R. Short, J. O. Odetunde, Q. Lao, and J. M. Egan, "Insulin and glucagon regulate pancreatic  $\alpha$ -cell proliferation.," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, p. e16096, Jan. 2011.
- [177] H. Ellingsgaard, J. A. Ehses, E. B. Hammar, L. Van Lommel, R. Quintens, G. Martens, J. Kerrconté, F. Pattou, T. Berney, D. Pipeleers, P. A. Halban, F. C. Schuit, and M. Y. Donath, "Interleukin-6 regulates pancreatic  $\alpha$ -cell mass expansion," *PNAS*, vol. 105, no. 35, pp. 13163–13168, 2008.
- [178] A. J. Langlois, W. D. Holder, J. Iglehart, S. A. Wells, and P. Bobognesi, "Morphological and Biochemical Properties of a New Human Breast Cancer Cell Line," *Cancer Res.*, vol. 39, no. July, pp. 2604–2613, 1979.
- [179] R. Cailleau, R. Young, M. Olive, and W. J. Reeves, "Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions," *J Natl Cancer Inst*, vol. 53, no. 3, pp. 661–674, 1974.
- [180] M. Lacroix, G. Leclercq, and M.-Vi, "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update," *Breast Cancer Res.*, pp. 249–289, 2004.
- [181] N. Kuzumaki, A. Suzuki, M. Narita, T. Hosoya, A. Nagasawa, S. Imai, K. Yamamizu, H. Morita, T. Suzuki, Y. Okada, H. J. Okano, J. K. Yamashita, H. Okano, and M. Narita, "Multiple Analyses of G-Protein Coupled Receptor (GPCR) Expression in the Development of Gefitinib-Resistance in Transforming Non-Small-Cell Lung Cancer," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e44368, 2012.
- [182] R. T. Dorsam and J. S. Gutkind, "G-protein-coupled receptors and cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 2, pp. 79–94, 2007.
- [183] Y. Suzuki, S. Haga, D. Katoh, K. So, K. Choi, U. Jung, H. Lee, K. Katoh, and S. Roh, "Chemerin is a novel regulator of lactogenesis in bovine mammary epithelial cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 466, no. 3, pp. 283–288, 2015.
- [184] K. Polyak, "Science in medicine Breast cancer: origins and evolution," *Cell*, vol. 117, no. 11, pp. 3155–63, 2007.
- [185] M. P. Coleman, M. Quaresma, F. Berrino, J. M. Lutz, R. De Angelis, R. Capocaccia, P. Baili, B. Rachet, G. Gatta, T. Hakulinen, A. Micheli, M. Sant, H. K. Weir, J. M. Elwood, H. Tsukuma, S. Koifman, G. A. e Silva, S. Francisci, M. Santaquilani, A. Verdecchia, H. H. Storm, and J. L. Young, "Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD)," *Lancet Oncol.*, vol. 9, no. 8, pp. 730–756, 2008.
- [186] B. O. Anderson, C. H. Yip, R. a. Smith, R. Shyyan, S. F. Sener, A. Eniu, R. W. Carlson, E. Azavedo, and J. Harford, "Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: Overview of the breast health global initiative Global Summit 2007," *Cancer*, vol. 113, no. 8 SUPPL., pp. 2221–2243, 2008.
- [187] A. Wall, T. Persigehl, P. Hauff, K. Licha, M. Schirner, S. Müller, A. von Wallbrunn, L. Matuszewski, W. Heindel, and C. Bremer, "Differentiation of angiogenic burden in human cancer xenografts using a perfusion-type optical contrast agent (SIDAG).," *Breast Cancer Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 1–9, Jan. 2008.
- [188] W. Zeng, X. Chen, Y. A. N. Ma, Z. Huang, Y. Qin, F. Wu, L. Wu, X. Liang, Y. Qin, J. I. A. Zhou, D. Lu, X. Kuang, Q. Q. Li, and Z. Luo, "A Novel Approach for Enriching Cancer Stem Cells from the Human SW-13 Adrenocortical Carcinoma Cell Line," *Anticancer Res.*, vol. 34, pp. 117–123, 2014.
- [189] B. Mariniello, A. Rosato, G. Zuccolotto, B. Rubin, M. V. Cicala, I. Finco, M. Iacobone, A. C. Frigo, A. Fassina, R. Pezzani, and F. Mantero, "Combination of sorafenib and everolimus

- impacts therapeutically on adrenocortical tumor models," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 19, no. 4, pp. 527–539, 2012.
- [190] K. E. Adams, S. Ke, S. Kwon, F. Liang, Z. Fan, Y. Lu, K. Hirschi, M. E. Mawad, M. a Barry, and E. M. Sevick-Muraca, "Comparison of visible and near-infrared wavelength-excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer.," *J. Biomed. Opt.*, vol. 12, no. 2, p. 024017, 2015.
- [191] O. H. Aina, J. Marik, R. Gandour-Edwards, and K. S. Lam, "Near-infrared optical imaging of ovarian cancer xenografts with novel alpha 3-integrin binding peptide 'OA02'.," *Mol. imaging Off. J. Soc. Mol. Imaging*, vol. 4, no. 4, pp. 439–447, 2005.
- [192] V. C. Daniel, L. Marchionni, J. S. Hierman, J. T. Rhodes, L. Wendy, C. M. Rudin, R. Yung, G. Parmigiani, M. Dorsch, D. Peacock, and D. N. Watkins, "A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro.," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 8, pp. 3364–73, 2009.
- [193] M. P. Roberti, J. M. Arriaga, M. Bianchini, H. R. Quinta, A. I. Bravo, E. M. Levy, J. Mordoh, and M. M. Barrio, "Protein expression changes during human triple negative breast cancer cell line progression to lymph node metastasis in a xenografted model in nude mice.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 13, no. 11, pp. 1123–1140, 2012.
- [194] L. Sun, "Peptide-Based Drug Development," *Mod. Chem. Appl.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–2, 2013.
- [195] M. Gittelman, P. J. Pommerville, B.-E. Persson, J.-K. Jensen, and T. K. Olesen, "A 1-year, open label, randomized phase II dose finding study of degarelix for the treatment of prostate cancer in North America.," *J. Urol.*, vol. 180, no. 5, pp. 1986–1992, 2008.
- [196] G. M. van Dam, G. Themelis, L. M. A. Crane, N. J. Harlaar, R. G. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. S. de Jong, H. J. G. Arts, A. G. J. van der Zee, J. Bart, P. S. Low, and V. Ntziachristos, "Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- $\alpha$  targeting: first in-human results," *Nat. Med.*, vol. 17, no. 10, pp. 1315–1319, 2011.
- [197] A. L. Vahrmeijer, M. Hutteman, J. R. van der Vorst, C. J. H. van de Velde, and J. V Frangioni, "Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence.," *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 10, no. 9, pp. 507–18, 2013.
- [198] R. Rey-Dios, E. M. Hattab, and A. a Cohen-Gadol, "Use of intraoperative fluorescein sodium fluorescence to improve the accuracy of tissue diagnosis during stereotactic needle biopsy of high-grade gliomas.," *Acta Neurochir. (Wien).*, vol. 156, no. 6, pp. 1071–5, 2014.
- [199] a Becker, B. Riefke, B. Ebert, U. Sukowski, H. Rinneberg, W. Semmler, and K. Licha, "Macromolecular contrast agents for optical imaging of tumors: comparison of indotricarbocyanine-labeled human serum albumin and transferrin.," *Photochem. Photobiol.*, vol. 72, no. 2, pp. 234–241, 2000.
- [200] A. Sowa-Staszczak, D. Pach, R. Mikołajczak, H. Mäcke, A. Jabrocka-Hybel, A. Stefańska, M. Tomaszuk, B. Janota, A. Gilis-Januszewska, M. Małecki, G. Kamiński, A. Kowalska, J. Kulig, A. Matyja, C. Osuch, and A. Hubalewska-Dydejczyk, "Glucagon-like peptide-1 receptor imaging with [Lys40(Ahx-HYNIC- 99mTc/EDDA)NH2]-exendin-4 for the detection of insulinoma," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 40, pp. 524–531, 2012.
- [201] A. Hubalewska-Dydejczyk, A. Sowa-Staszczak, D. Pach, A. Gilis-Januszewska, and G. Kaminski, "Pitfalls of glucagonlike peptide-1 receptor imaging performed by [Lys40(Ahx-HYNIC-99mTc/EDDA)NH2]-exendin-4," *J. Nucl. Med.*, vol. 53, pp. 1–2, 2013.
- [202] J. Schymkowitz and F. Rousseau, "Molecules and methods for inhibition and detection of proteins; EP 2683419 A1," 2014.
- [203] M. Lin, S. Li, M. Mcguire, and K. Brown, "Effects of PEGylation and DOTA conjugation sites on  $\alpha$  v  $\beta$  6 targeting peptide conjugates," *J. Nucl. Med.*, vol. 49, pp. 1–2, 2008.
- [204] Q. Liu, R. Cescato, D. A. Dewi, J. Rivier, J. C. Reubi, and A. Schonbrunn, "Receptor signaling and endocytosis are differentially regulated by somatostatin analogs," *Mol Pharmacol*, vol. 68, no. 1, pp. 90–101, 2005.

- [205] J. C. Reubi, B. Waser, R. Cascato, B. Gloor, C. Stettler, and E. Christ, "Internalized somatostatin receptor subtype 2 in neuroendocrine tumors of octreotide-treated patients," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, no. May, pp. 2343–2350, 2010.
- [206] V. Mäde, S. Babilon, N. D. Jolly, L. Wanka, K. D. Bellmann-Sickert, L. D. Gimenez, and K. D. Mörl, "Peptide modifications differentially alter G protein-coupled receptor internalization and signaling bias.," *Angew. Chemie*, vol. 53, no. 38, pp. 10067–10071, 2014.
- [207] D. G. Tilley, I. M. Kim, P. A. Patel, J. D. Violin, and H. A. Rockman, " $\beta$ -Arrestin Mediates  $\beta$ 1-Adrenergic Receptor-Epidermal Growth Factor Receptor Interaction and Downstream Signaling," *J Biol Chem*, vol. 284, no. 30, pp. 20375–20386, 2009.
- [208] R. Magnan, B. Masri, C. Escrieut, M. Foucaud, P. Cordelier, and D. Fourmy, "Regulation of membrane cholecystinin-2 receptor by agonists enables classification of partial agonists as biased agonists.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 8, pp. 6707–19, 2011.
- [209] A. Reversi, V. Rimoldi, T. Marrocco, P. Cassoni, G. Bussolati, M. Parenti, and B. Chini, "The Oxytocin Receptor Antagonist Atosiban Inhibits Cell Growth via a 'Biased Agonist' Mechanism," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 16, pp. 16311–16318, 2005.
- [210] S. L. Ritter and R. A. Hall, "Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 12, pp. 819–830, 2009.
- [211] G. Drin, S. Cottin, E. Blanc, A. R. Rees, and J. Temsamani, "Studies on the Internalization Mechanism of Cationic Cell-penetrating Peptides," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 33, pp. 31192–31201, 2003.
- [212] S. J. Hosseinimehr, V. Tolmachev, and A. Orlova, "Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides: Considerations for targeting peptide conjugate design," *Drug Discov. Today*, vol. 17, no. 21–22, pp. 1224–1232, 2012.
- [213] S. Nakane, S. Matsumoto, T. Y, and H. M, "The accumulation mechanism of cationic mitomycin C-dextran conjugates in the liver: in-vivo cellular localization and in-vitro interaction with PubMed Commons," *J. Pharm Pharmacol*, vol. 40, no. 1, pp. 1–6, 1988.
- [214] E. B. Hunter, S. P. Powers, L. J. Kost, D. I. Pinon, L. J. Miller, and N. F. LaRusso, "Physicochemical determinants in hepatic extraction of small peptides," *Hepatology*, vol. 12, no. 1, pp. 76–82, 1990.
- [215] a M. Torres, M. Stebel, J. V Rodriguez, B. Gazzin, G. C. Lunazzi, and C. Tiribelli, "Difference in hepatic uptake of tetra- and di-bromosulfophthalein in rat. Role of hydrophobicity, binding to plasma proteins and affinity for plasma membrane carrier protein.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 46, no. 5, pp. 925–931, 1993.
- [216] Heinrich, Müller, and Graeve, *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. .
- [217] W. R. Hendee, M. J. Welch, and W. C. Eckelmann, *Targeted Molecular Imaging*. 2012.
- [218] S. Kossatz, R. Mansi, M. Béhé, P. Czerney, and I. Hilger, "Influence of d-glutamine and d-glutamic acid sequences in optical peptide probes targeted against the cholecystinin-2/gastrin-receptor on binding affinity, specificity and pharmacokinetic properties.," *EJNMMI Res.*, vol. 3, no. 1, p. 75, 2013.
- [219] S. R. Kumar, T. P. Quinn, and S. L. Deutscher, "Evaluation of an 111in-radiolabeled peptide as a targeting and imaging agent for ErbB-2 receptor-expressing breast carcinomas," *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, no. 20, pp. 6070–6079, 2007.
- [220] X. Sun, G. Niu, Y. Yan, M. Yang, K. Chen, N. Chan, and B. Shen, "Phage Display Derived Peptides for Osteosarcoma Imaging," *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, no. 16, pp. 997–1003, 2010.
- [221] B. M. Tjink, T. Laeremans, M. Budde, M. Stigter-van Walsum, T. Dreier, H. J. de Haard, C. R. Leemans, and G. a M. S. van Dongen, "Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 7, no. 8, pp. 2288–97, 2008.
- [222] R. C. Roovers, T. Laeremans, L. Huang, S. De Taeye, A. J. Verkleij, H. Revets, H. J. De Haard,

- and P. M. P. Van Bergen, "Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies," *Cancer Immunol Immunother*, vol. 56, pp. 303–317, 2007.
- [223] T. M. Allen, "Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, pp. 750–763, 2002.
- [224] J. C. Reubi, M. Körner, B. Waser, L. Mazzucchelli, and L. Guillou, "High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours.," *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, vol. 31, no. 6, pp. 803–810, 2004.
- [225] R. Markwalder and J. C. Reubi, "Gastrin-releasing Peptide Receptors in the Human Prostate : Relation to Neoplastic Transformation," *Cancer Res.*, vol. 59, pp. 1152–1159, 1999.
- [226] J. C. Reubi, "Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer Diagnosis and Therapy," *Endocr. Rev.*, vol. 24, no. 4, pp. 389–427, 2003.
- [227] E. Gourni, B. Waser, P. Clerc, D. Fourmy, J. C. Reubi, and H. R. Maecke, "The Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor : Preclinical Studies," *J. Nucl. Med.*, vol. 55, no. 6, pp. 976–983, 2014.
- [228] R. Bergmann, M. Scheunemann, C. Heichert, P. Mäding, H. Wittrisch, and M. Kretzschmar, "Biodistribution and catabolism of 18 F-labeled neurotensin ( 8 – 13 ) analogs," *Nucl. Med. Biol.*, vol. 29, pp. 61–72, 2002.
- [229] S. S. Gambhir, "Molecular imaging of cancer with positron emission tomography," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, pp. 683–693, 2002.
- [230] M. E. Phelps, "Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes," *Proc Natl Acad Sci*, vol. 97, no. 16, pp. 9226–33, 2000.
- [231] Y. Shao, S. R. Cherry, K. Farahani, and K. Meadors, "Simultaneous PET and MR imaging," *Phys. Med. Biol.*, vol. 42, pp. 1965–1970, 1997.
- [232] M. Brom, L. Joosten, P. Laverman, W. J. G. Oyen, M. Béhé, M. Gotthardt, and O. C. Boerman, "Preclinical evaluation of 68Ga-DOTA-minigastrin for the detection of cholecystikinin-2/gastrin receptor-positive tumors," *Mol. Imaging*, vol. 10, no. 2, pp. 144–152, 2011.
- [233] M. Ocak, A. G. Gillman, J. Bresee, L. Zhang, A. M. Vlad, C. Müller, R. Schibli, W. B. Edwards, C. J. Anderson, and H. M. Gach, "Folate Receptor-Targeted Multimodality Imaging of Ovarian Cancer in a Novel Syngeneic Mouse Model," *Mol. Pharm.*, vol. 12, no. 2, pp. 542–553, 2015.
- [234] G. Ren, Z. Liu, Z. Miao, H. Liu, and M. Subbarayan, "PET of malignant melanoma using 18F-labeled metalloptides.," *J. Nucl. Med.*, vol. 50, no. 11, pp. 1865–1872, 2009.
- [235] M. Fani, M. Tamma, G. P. Nicolas, E. Lasri, C. Medina, I. Raynal, M. Port, W. A. Weber, and H. R. Maecke, "In Vivo Imaging of Folate Receptor Positive Tumor Xenografts Using Novel 68 Ga-NODAGA-Folate Conjugates," *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 5, pp. 1136–1145, 2012.
- [236] M. González, U. Böer, C. Dickel, T. Quentin, I. Cierny, E. Oetjen, and W. Knepel, "Loss of insulin-induced inhibition of glucagon gene transcription in hamster pancreatic islet alpha cells by long-term insulin exposure.," *Diabetologia*, vol. 51, no. 11, pp. 2012–21, Nov. 2008.
- [237] D. J. Druckerf, J. Philippe, and S. Mojsov, "Proglucagon Gene Expression and Posttranslational Processing in a Hamster Islet Cell Line," *Endocrinology*, vol. 123, no. 4, pp. 1861–1867, 1988.
- [238] E. Göncz, M. Z. Strowski, C. Grötzinger, K. W. Nowak, P. Kaczmarek, M. Sassek, S. Mergler, B. F. El-Zayat, M. Theodoropoulou, G. K. Stalla, B. Wiedenmann, and U. Plöckinger, "Orexin-A inhibits glucagon secretion and gene expression through a Foxo1-dependent pathway.," *Endocrinology*, vol. 149, no. 4, pp. 1618–26, Apr. 2008.
- [239] K. C. Herold, S. Nagamatsu, J. B. Buse, P. Kulsakdinun, and D. F. Steiner, "Inhibition of glucose-stimulated insulin release from beta TC3 cells and rodent islets by an analog of FK506.," *Transplantation*, vol. 55, no. 1, pp. 186–192, 1993.
- [240] M. A. Ravier and G. A. Rutter, "Secretion From Mouse Pancreatic a-Cells," *Diabetes*, vol. 54,

- pp. 1789–1797, 2005.
- [241] Y. Rouillé, G. Westermark, S. K. Martin, and D. F. Steiner, "Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 8, pp. 3242–3246, 1994.
- [242] J. Lu, P. L. Herrera, C. Carreira, R. Bonnavion, C. Seigne, A. Calender, P. Bertolino, and C. X. Zhang, " $\alpha$  Cell-Specific Men1 Ablation Triggers the Transdifferentiation of Glucagon-Expressing Cells and Insulinoma Development," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 5, pp. 1954–1965.e8, 2010.
- [243] O. G. Chepurny and G. G. Holz, "Over-expression of the glucagon-like peptide-1 receptor on INS-1 cells confers autocrine stimulation of insulin gene promoter activity: A strategy for production of pancreatic b-cell lines for use in transplantation," *Cell Tissue Res.*, vol. 307, no. 2, pp. 191–201, 2002.
- [244] K. Nakashima, Y. Kanda, Y. Hirokawa, F. Kawasaki, M. Matsuki, and K. Kaku, "MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones.," *Endocr. J.*, vol. 56, no. 1, pp. 45–53, 2009.
- [245] K. Hamaguchi and E. H. Leiter, "Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic a-cell and b-cell lines. Viability, secretory function, and MHC antigen expression," *Diabetes*, vol. 39, no. 4, pp. 415–425, 1990.
- [246] S. J. Le Marchand and D. W. Piston, "Glucose suppression of glucagon secretion: metabolic and calcium responses from alpha-cells in intact mouse pancreatic islets.," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 19, pp. 14389–98, May 2010.
- [247] H. Ishihara, P. Maechler, A. Gjinovci, P.-L. Herrera, and C. B. Wollheim, "Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 330–5, Apr. 2003.
- [248] E. Dumonteil, C. Magnan, B. Ritz-laser, P. Meda, P. Dussoix, M. Gilbert, A. Ktorza, and J. Philippe, "Insulin, but not glucose lowering corrects the hyperglucagonemia and increased proglucagon messenger ribonucleic acid levels observed in insulinopenic diabetes," *Endocrinology*, vol. 139, no. 11, pp. 4540–4546, 1998.
- [249] K. Hamaguchi, N. Utsunomiya, R. Takaki, H. Yoshimatsu, and T. Sakata, "Cellular interaction between mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines: possible contact-dependent inhibition of insulin secretion.," *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, vol. 228, no. 10, pp. 1227–1233, 2003.
- [250] C. Kelly, N. H. McClenaghan, and P. R. Flatt, "Role of islet structure and cellular interactions in the control of insulin secretion," *Islets*, vol. 3, no. 2, pp. 41–47, 2011.
- [251] E. Gylfe and P. Gilon, "Glucose regulation of glucagon secretion.," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 103, no. 1, pp. 1–10, Jan. 2014.
- [252] J. N. Walker, R. Ramracheya, Q. Zhang, P. R. V Johnson, M. Braun, and P. Rorsman, "Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both?," *Diabetes*, vol. 13, pp. 95–105, 2011.
- [253] I. Franklin, J. Gromada, A. Gjinovci, S. Theander, and C. B. Wollheim, "b-Cell Secretory Products Activate a-Cell ATP-Dependent Potassium Channels to Inhibit Glucagon Release," *Diabetes*, vol. 54, pp. 1808–1815, 2005.
- [254] A. Wendt, B. Birnir, K. Buschard, J. Gromada, A. Salehi, S. Sewing, P. Rorsman, and M. Braun, "Glucose Inhibition of Glucagon Secretion From Rat a -Cells Is Mediated by GABA Released From," *Diabetes*, vol. 53, pp. 1038–1045, 2004.
- [255] H. L. Olsen, S. Theander, K. Bokvist, K. Buschard, C. B. Wollheim, and J. Gromada, "Glucose stimulates glucagon release in single rat alpha-cells by mechanisms that mirror the stimulus-secretion coupling in beta-cells.," *Endocrinology*, vol. 146, no. 11, pp. 4861–70, Nov. 2005.
- [256] P. E. MacDonald, Y. Z. De Marinis, R. Ramracheya, A. Salehi, X. Ma, P. R. V Johnson, R. Cox, L. Eliasson, and P. Rorsman, "A KATP channel-dependent pathway within  $\alpha$  cells regulates

- glucagon release from both rodent and human islets of langerhans," *PLoS Biol.*, vol. 5, no. 6, pp. 1236–1247, 2007.
- [257] C. Asplin, P. Raghu, D. Timothy, and P. Palmer, "Glucose regulation of glucagon secretion independent of B cell activity," *Metabolism*, vol. 32, no. 3, pp. 292–295, 1983.
- [258] J. Gromada, X. Ma, M. Høy, K. Bokvist, A. Salehi, P. Berggren, and P. Rorsman, "ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel – Dependent Regulation of," *Diabetes*, vol. 53, pp. 181–189, 2004.
- [259] E. Vieira, a. Salehi, and E. Gylfe, "Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells.," *Diabetologia*, vol. 50, no. 2, pp. 370–379, 2007.
- [260] A. Chowdhury, V. P. Satagopam, L. Manukyan, K. a Artemenko, Y. M. E. Fung, R. Schneider, J. Bergquist, and P. Bergsten, "Signaling in insulin-secreting MIN6 pseudoislets and monolayer cells.," *J. Proteome Res.*, vol. 12, no. 12, pp. 5954–62, 2013.
- [261] P. Meda, P. Halban, a Perrelet, a E. Renold, and L. Orci, "Gap junction development is correlated with insulin content in the pancreatic B cell.," *Science*, vol. 209, no. 4460, pp. 1026–1028, 1980.
- [262] P. Meda, A. Perrelet, and L. Orci, "Increase of gap junctions between pancreatic B-cells during stimulation of insulin secretion.," *J. Cell Biol.*, vol. 82, pp. 441–8, 1979.
- [263] E. Xu, M. Kumar, Y. Zhang, W. Ju, T. Obata, N. Zhang, S. Liu, A. Wendt, S. Deng, Y. Ebina, M. B. Wheeler, M. Braun, and Q. Wang, "Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system.," *Cell Metab.*, vol. 3, no. 1, pp. 47–58, Jan. 2006.
- [264] I. Franklin, J. Gromada, A. Gjinovei, S. Theander, and C. B. Wollheim, "Franklin -  $\beta$ -Cell Secretory Products Activate  $\alpha$ -Cell ATP-Dependent Potassium Channels to Inhibit Glucagon Release," *Diabetes*, 2005.
- [265] K. Kover, P. Y. Tong, D. Watkins, M. Clements, L. Stehno-Bittel, L. Novikova, D. Bittel, N. Kibiryeveva, J. Stuhlsatz, Y. Yan, S. Q. Ye, and W. V Moore, "Expression and regulation of nampt in human islets.," *PLoS One*, vol. 8, no. 3, p. e58767, Jan. 2013.
- [266] L. Kessler, P. Bucher, L. Milliat-Guittard, P. Benhamou, T. Berney, A. Penfornis, L. Badet, C. Thivolet, F. Bayle, J. Oberholzer, E. Renoult, M. Brun, G. Rifle, C. Atlan, C. Colin, and P. Morel, "Influence of islet transportation on pancreatic islet allotransplantation in type 1 diabetic patients within the Swiss-French GRAGIL network," *Transplantation*, vol. 77, no. 8, pp. 1301–1304, 2004.
- [267] M. Figliuzzi, S. Zappella, M. Morigi, P. Rossi, P. Marchetti, and A. Remuzzi, "Influence of donor age on bovine pancreatic islet isolation.," *Transplantation*, vol. 70, no. 7, pp. 1032–1037, 2000.
- [268] a Kinasiewicz, M. Juszczak, J. Pachecka, and P. Fiedor, "Pancreatic islets isolation using different protocols with in situ flushing and intraductal collagenase injection.," *Physiol. Res.*, vol. 53, no. 3, pp. 327–33, 2004.
- [269] E. Samols, J. I. Stagner, R. B. L. Ewart, and V. Marks, "The order of islet microvascular cellular perfusion is B—A—D in the perfused rat pancreas.," *Society*, vol. 98, no. 9, pp. 1966–1970, 1996.
- [270] Y. Guo, P. Xiao, S. Lei, F. Deng, G. G. Xiao, Y. Liu, X. Chen, L. Li, S. Wu, Y. Chen, H. Jiang, L. Tan, J. Xie, X. Zhu, S. Liang, and H. Deng, "How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 40, no. 5, pp. 426–436, 2008.
- [271] N. Fu, I. Drinnenberg, J. Kelso, J.-R. Wu, S. Pääbo, R. Zeng, and P. Khaitovich, "Comparison of protein and mRNA expression evolution in humans and chimpanzees.," *PLoS One*, vol. 2, no. 2, p. e216, 2007.
- [272] R. Scharfmann, X. Xiao, H. Heimberg, J. Mallet, and P. Ravassard, "Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors.," *PLoS One*, vol. 3, no. 10, p. e3559, Jan. 2008.
- [273] J. Wanninger, S. Bauer, K. Eisinger, T. Weiss S., R. Walter, C. Hellerbrand, A. Schäffler, and A.

- Higuchi, "Adiponectin upregulates hepatocyte CMKLR1 which is reduced in human fatty liver.," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 26, no. 2, pp. 248–254, 2012.
- [274] L. Peng, Y. Yu, J. Liu, S. Li, H. He, N. Cheng, and R. D. Ye, "The Chemerin Receptor CMKLR1 is a Functional Receptor for Amyloid- $\beta$  Peptide.," *J. Alzheimers. Dis.*, vol. 43, pp. 227–242, 2014.
- [275] S. Hossain, K. Mineno, and T. Katafuchi, "Neuronal Orphan G-Protein Coupled Receptor Proteins Mediate Plasmalogens-Induced Activation of ERK and Akt Signaling," *PLoS One*, pp. 1–14, 2016.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

## Liste der Abkürzungen und Begriffe

Ac	Acetylgruppe
AHX	6-Aminohexansäure
ALG9	Alpha-1,2-Mannosyltransferase
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	3',5'-cyclic AMP
CCRL2	<i>C-C chemokine receptor-like 2</i>
CMKLR1	<i>Chemokine receptor-like 1</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DOTA	Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DTT	Dithiothreitol
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	fetales Kälberserum
GFP	grün fluoreszierende Protein
GOI	<i>gene of interest</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptor
GPR1	<i>G protein-coupled receptor 1</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HFD	<i>High Fat Diet</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
T <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit

i.v.	intravenös
IDCC	Indodicarbocyanin
IEQ	Inselequivalent
IP3	Inositol Trisphosphat
ITCC	Indotricarbocyanin
KRBH	Krebs-RingerPuffer mit HEPES
LFD	<i>Low Fat Diet</i>
luc2	Gen für Luziferase
LysCap	Lysin-Capryloyl
MR	Magnetresonanztomographie
n.d.	nicht detektiert
NIR	Nah-Infrarotfluoreszenz
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween-20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG11	Undeca-Ethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PRRT	peptidvermittelte Radiorezeptorthherapie
RARRES2	<i>retinoic acid receptor responder protein 2</i> (Chemerin)
RNA	Ribonukleinsäure
RPS29	Ribosomal Protein S29
SCID	<i>severe combined immunodeficiency</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	trisgepufferte Salzlösung
TBS-T	trisgepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TR-FRET	time resolution fluorescence resonance energy transfer
TTDS	Trioxatridecan Succinamidsäure
UBC	Ubiquitin C
w/o	ohne ( <i>without</i> )

## Liste der Symbole

cpm	<i>counts</i> pro Minute
cq	<i>Cycle of Quantification</i>
mCi	Millicurie
rmRNA-E	relative mRNA-Expression
rpm	Umdrehungen pro Minute

## Abkürzungen der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Abkürzungen der nicht-natürlichen Aminosäuren

Cha	L-Zyklohexylalanin
Cit	L-Citrullin
Hyp	L-Hydroxyprolin
Tic	L-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-3-Carboxylsäure

## PUBLIKATIONEN

Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Konferenzen präsentiert:

### Posterpräsentationen:

1) Sarah Poenick, **Sandy Hallmann**, Asja Wagener, Kai Licha, Sebastian Bandholtz, Carsten Grötzinger; Targeted near-infrared imaging of breast cancer xenografts using optimized CMKLR1-targeted peptide probes; European Society for Molecular Imaging (EMIM), 18.-20.03.2015, Tübingen, Deutschland.

2) Sarah Poenick, **Sandy Hallmann**, Asja Wagener, Kai Licha, Sebastian Bandholtz, Carsten Grötzinger; Targeted near-infrared imaging of breast cancer xenografts using optimized CMKLR1-targeted peptide probes; DKTK Retreat, 13.-14.04.2015, Heidelberg, Deutschland.

3) Sarah Poenick, **Sandy Hallmann**, Asja Wagener, Kai Licha, Sebastian Bandholtz, Carsten Grötzinger; Targeted near-infrared imaging of breast cancer xenografts using optimized CMKLR1-targeted peptide probes; FEBS Congress, 04.-09.07.2015, Berlin, Deutschland.

4) Sarah Poenick, Eva Koziolk, Nicola Beindorff, **Sandy Hallmann**, Asja Wagener, Sebastian Bandholtz, Winfried Brenner, Carsten Grötzinger; PET imaging of breast cancer xenografts using optimized CMKLR1-targeted peptide probes; EANM Congress, 10.-14.10.2015, Hamburg, Deutschland.

# LEBENS LAUF

*Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des  
Datenschutzes nicht enthalten.*

# ANHANG

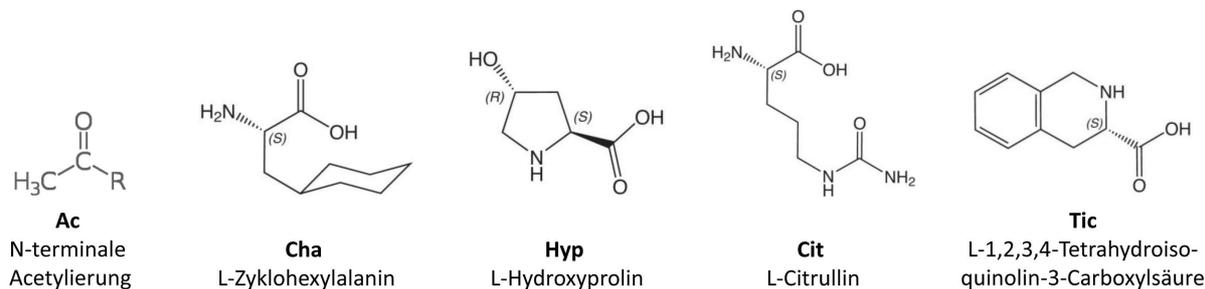


Abb. 51: Struktur der nicht-natürlichen Aminosäuren und der N-terminalen Acetylierung.

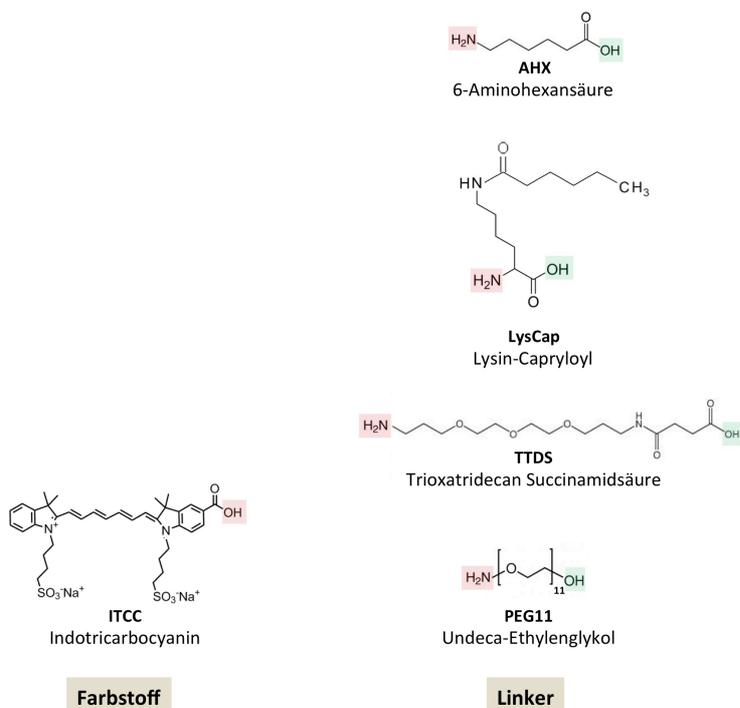
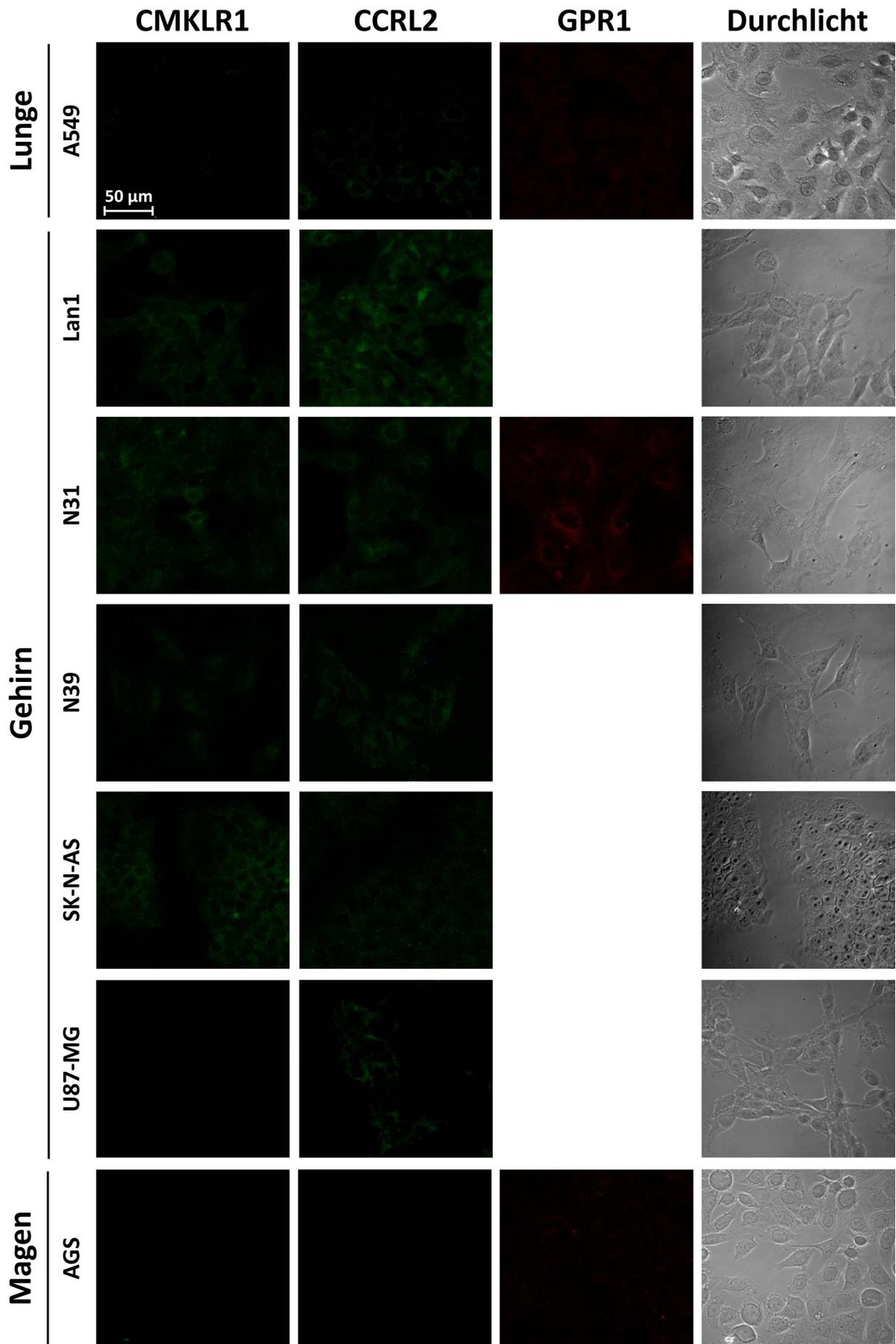
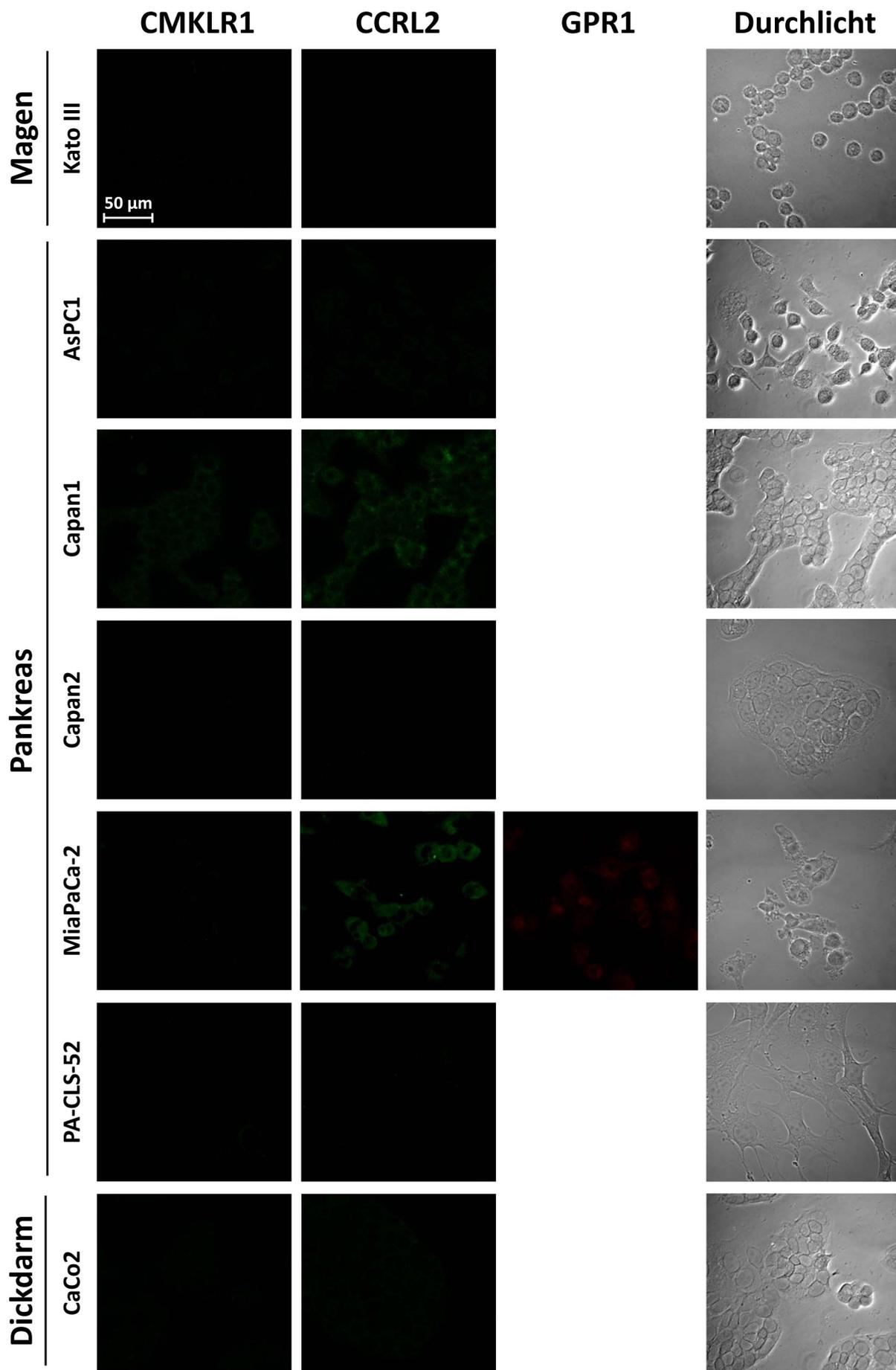
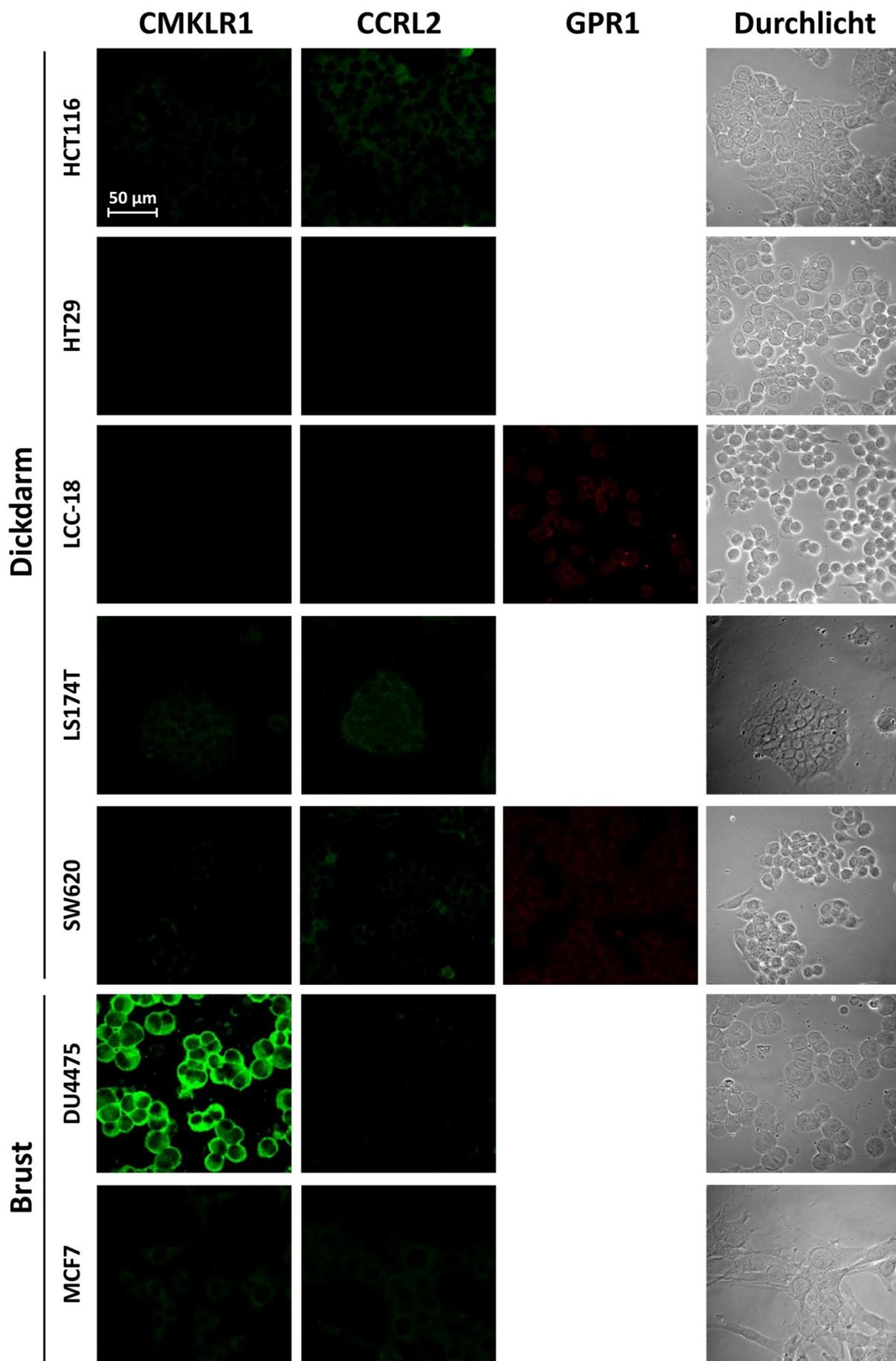
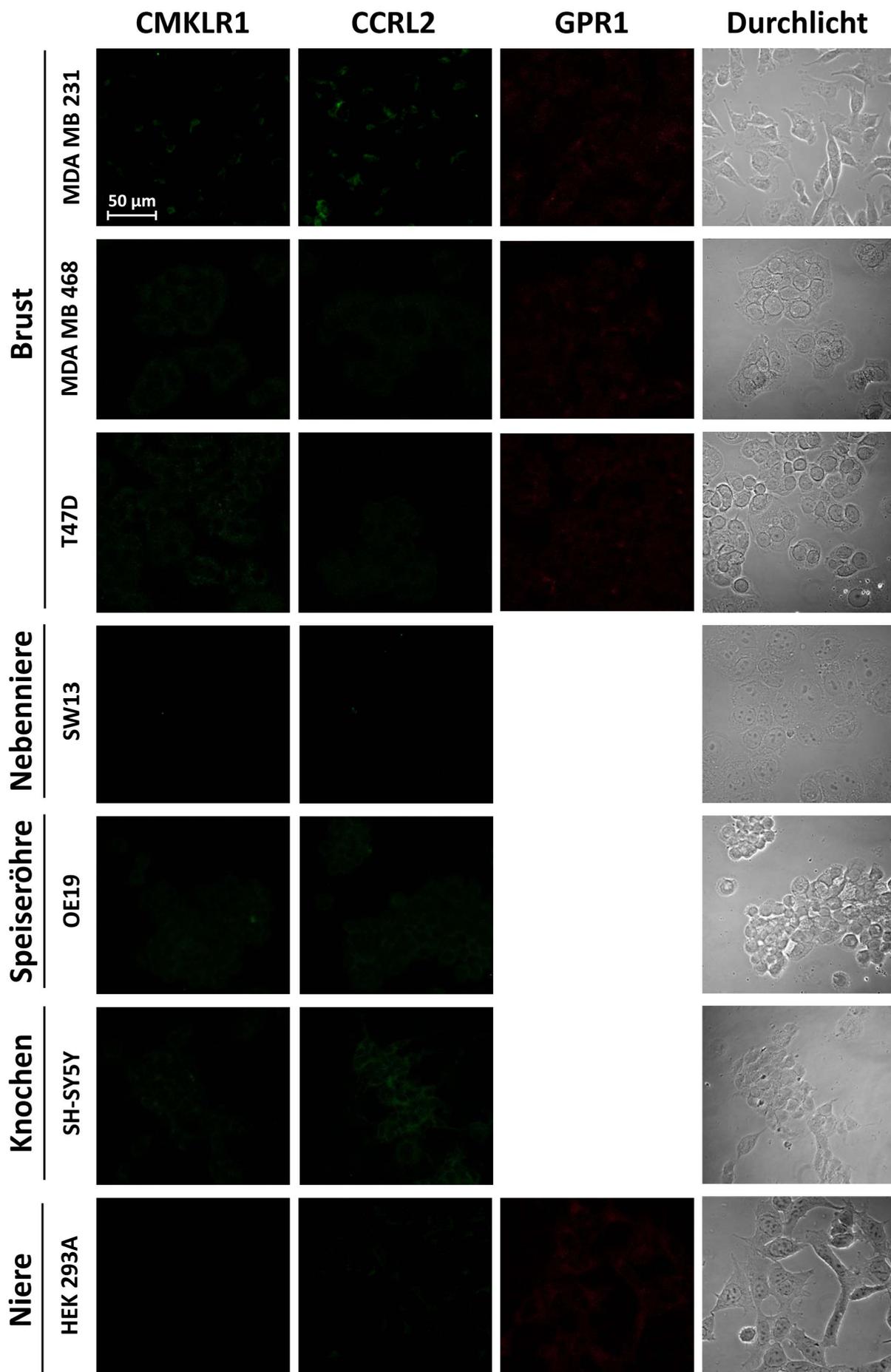


Abb. 52: Struktur des Nahinfrarotfarbstoffes ITCC und der verwendeten Linker. Die funktionellen Gruppen zur Verknüpfung von Farbstoff und Linker (rot) sowie Linker und Peptid (grün) sind farblich hervorgehoben. Die Carboxygruppe von ITCC (rot) reagiert über eine Kondensationsreaktion unter Abspaltung von Wasser mit den Aminogruppen (rot) der Linker zu einer Amidbindung. Die Carboxygruppe (grün) der Linker reagierten mit der Aminogruppe des jeweiligen Peptides zu einer Amidbindung.









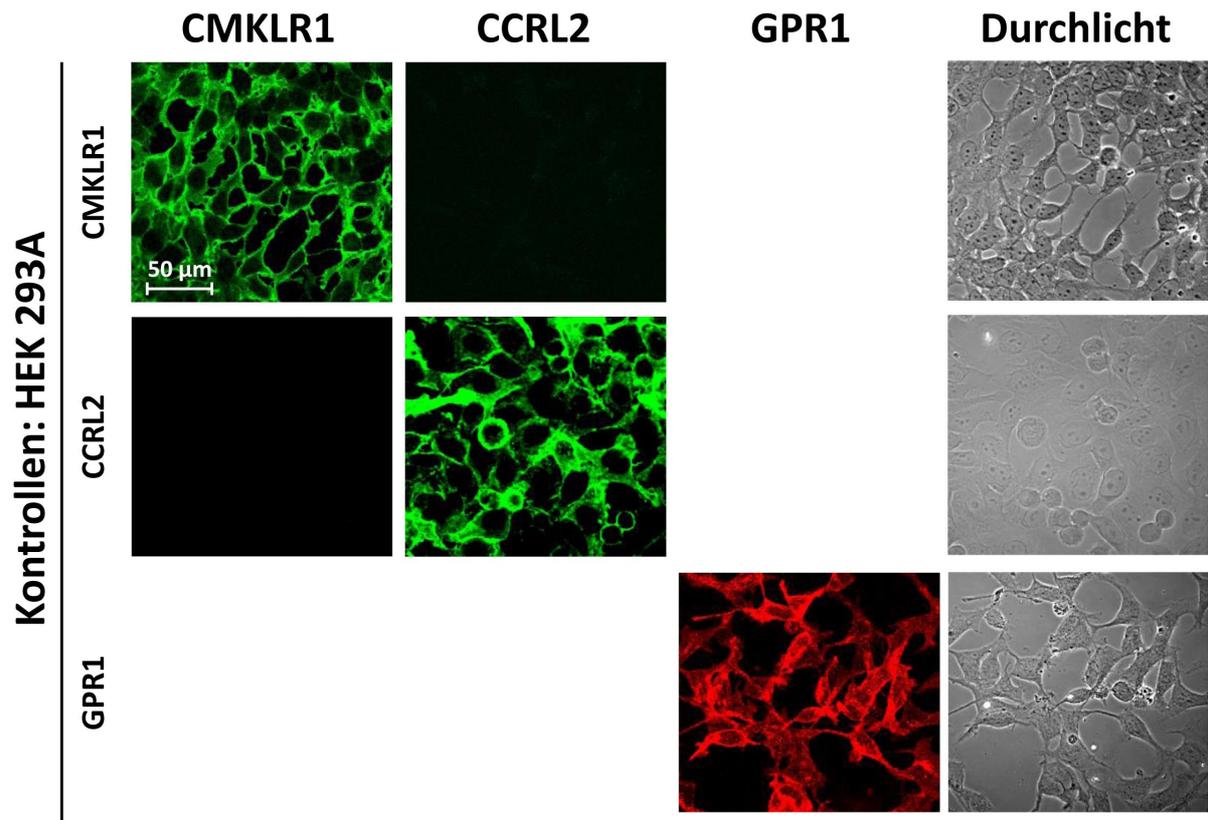
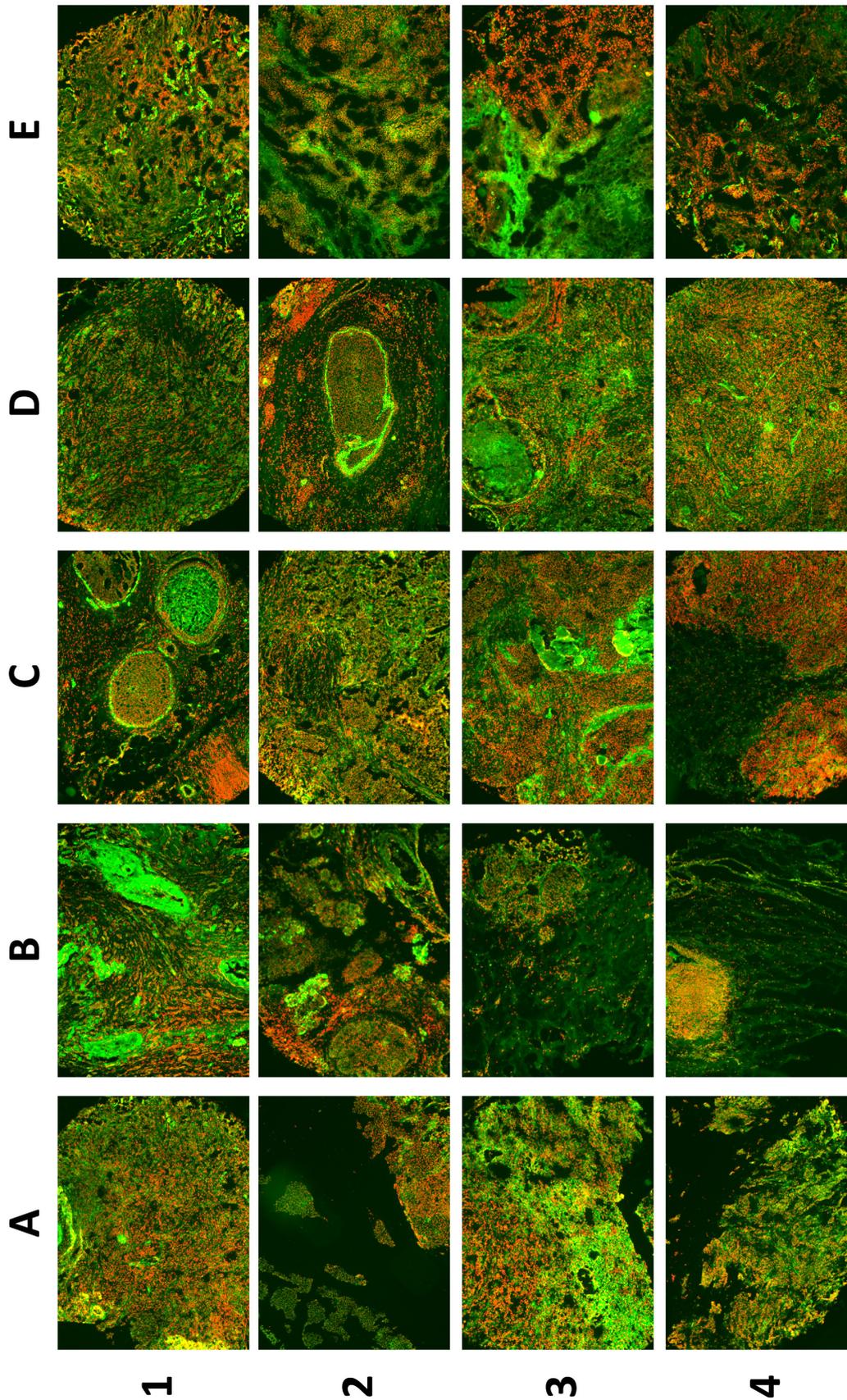


Abb. 53: Expression von CMKLR1, GPR1 und CCRL2 in humanen Tumorzelllinien. Immunfluoreszenz an Tumorzelllinien. Exemplarisches Beispiel. n=3. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet: anti-CMKLR1 (1:100; Cayman; aus Kaninchen), anti-CCRL2 (1:500; Sigma; aus Kaninchen), anti-GPR1 (1:250; Sigma; aus Maus). Als Sekundäntikörper dienten *goat* anti-Kaninchen-Cy2 (1:1000) sowie *goat* anti-Maus-Cy3 (1:1000).



**Abb. 54: Expression von CMKLR1 in humanem Mammakarzinomgewebe und gesundem Brustkontrollgewebe, 1. Teil (Spalten 1-4).** *Tissue Array* (Gefriergewebe) der Firma BioChain. Insgesamt wurden 37 Mammakarzinomgewebe und drei gesunde Brustkontrollgewebe (E6-E8) gefärbt und mit einer 5-fachen Vergrößerung dargestellt. Primärer Antikörper: anti-CMKLR1 (1:65; #21-86; aus Kaninchen). Sekundärantikörper: *goat* anti-Kaninchen-Cy2 (1:100). Die Zellkerne wurden mittels SytoxOrange (1  $\mu$ M) angefärbt.

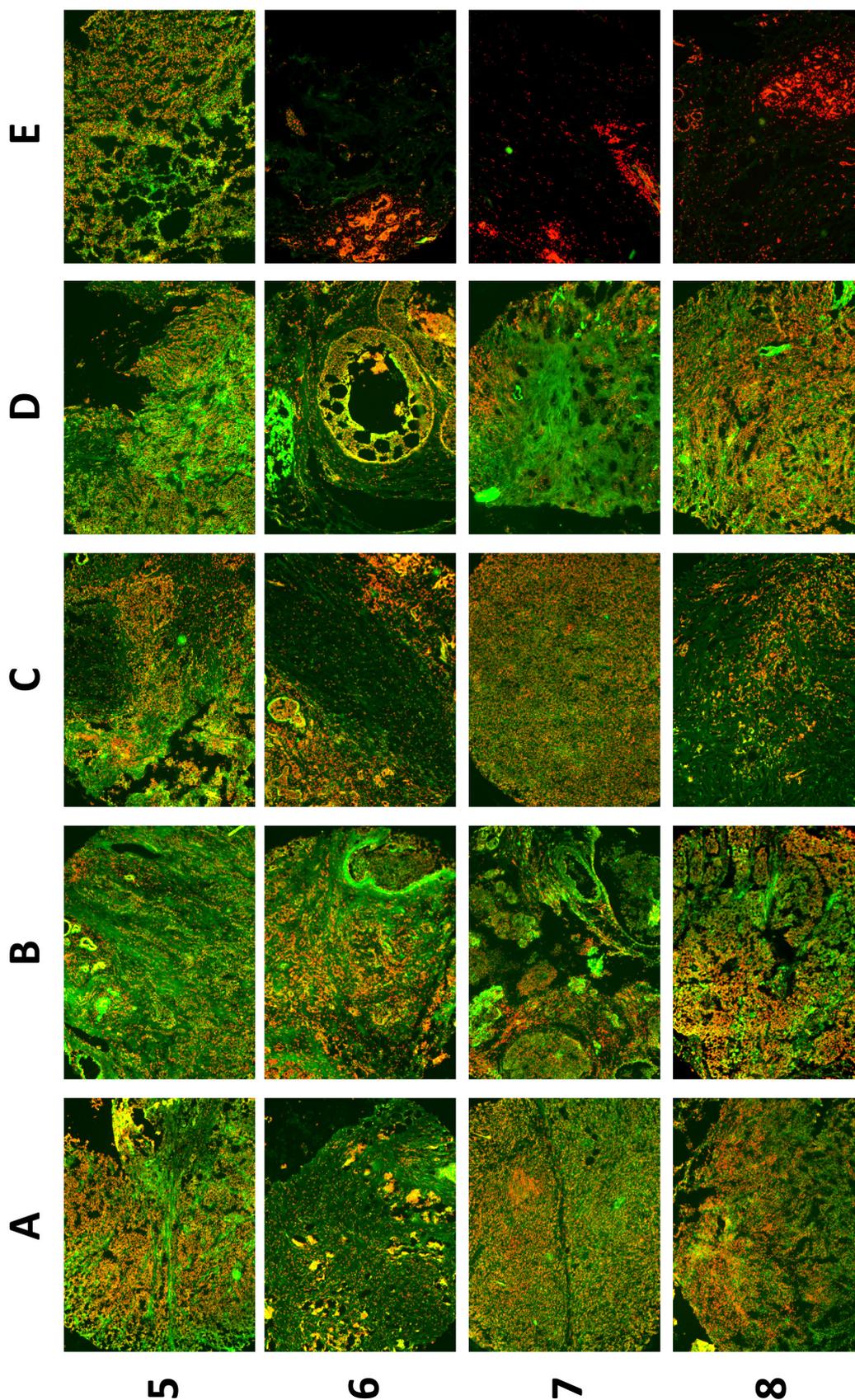


Abb. 55: Expression von CMKLR1 im humanen Mammakarzinomgewebe und gesundem Brustkontrollgewebe, 1. Teil (Spalten 5-8). *Tissue Array* (Gefriergewebe) der Firma BioChain. Insgesamt wurden 37 Mammakarzinomgewebe und drei gesunde Brustkontrollgewebe (E6-E8) gefärbt und mit einer 5-fachen Vergrößerung dargestellt. Primärer Antikörper: anti-CMKLR1 (1:65; #21-86; aus Kaninchen). Sekundärantikörper: *goat* anti-Kaninchen-Cy2 (1:100). Die Zellkerne wurden mittels SytoxOrange (1  $\mu$ M) angefärbt.

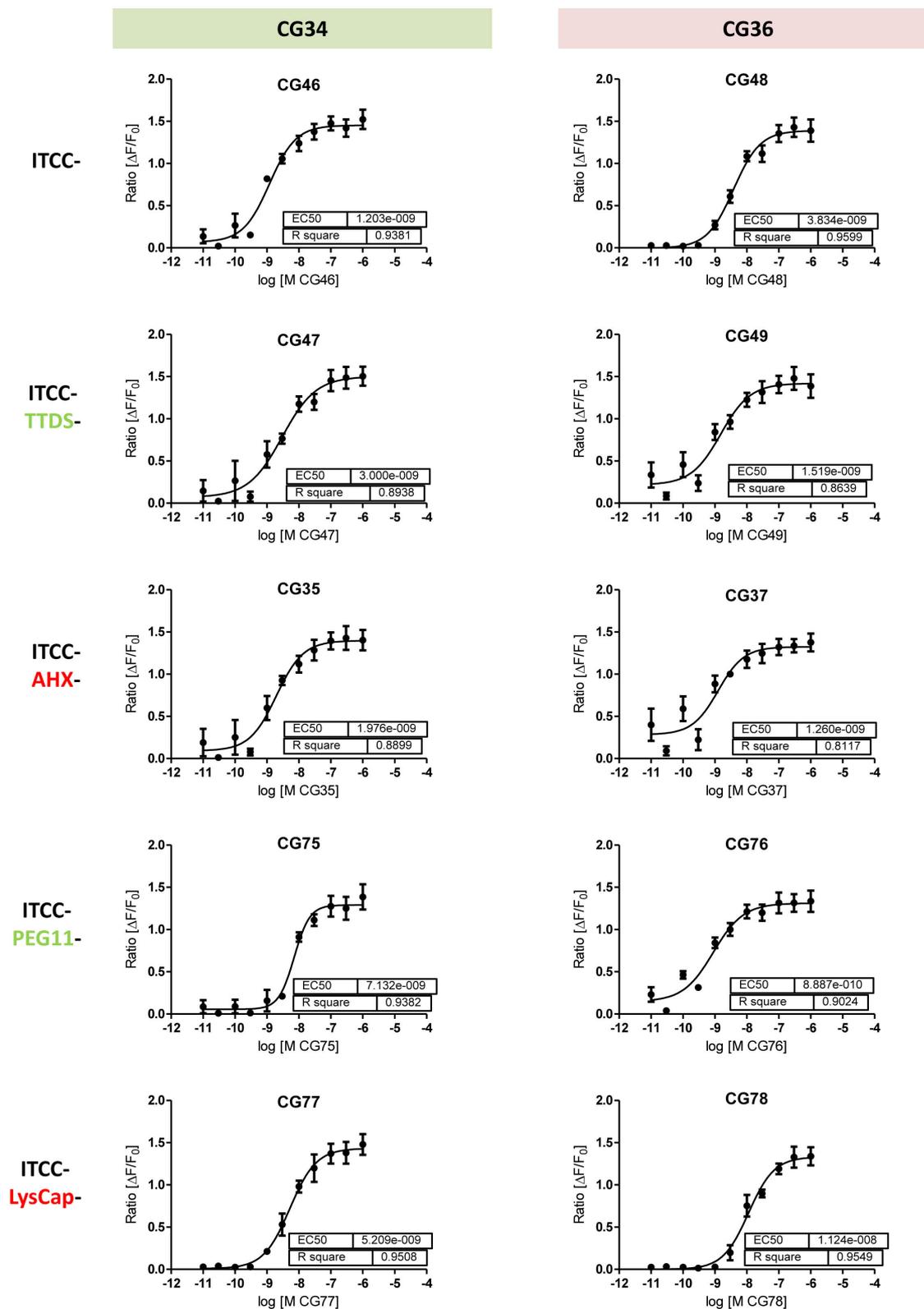
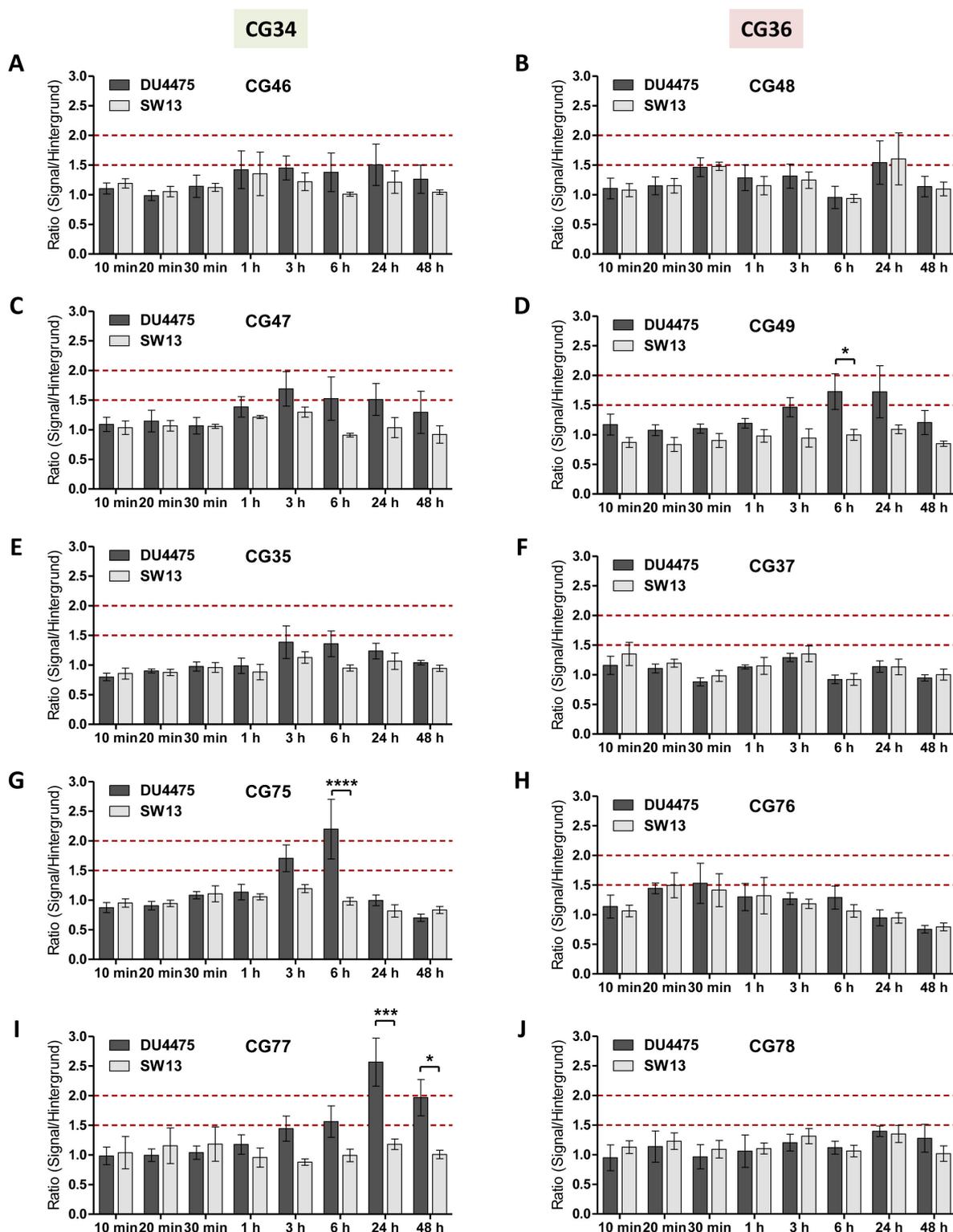
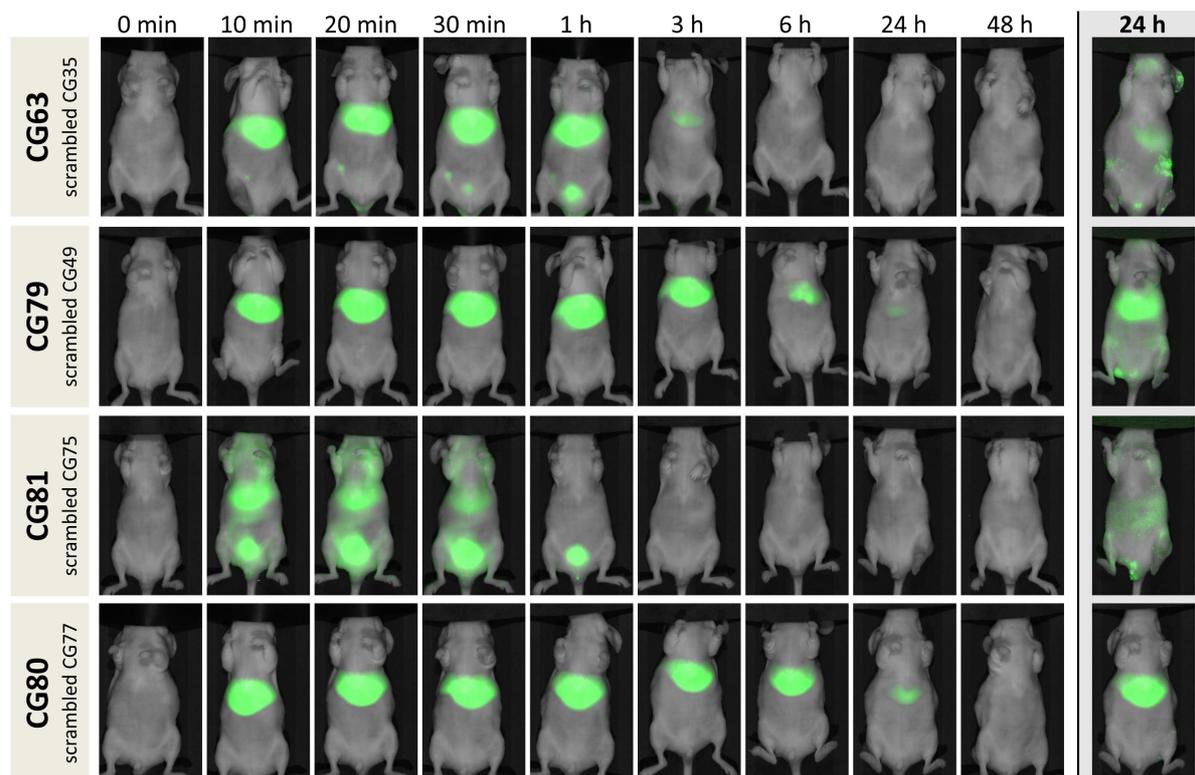


Abb. 56: Funktionelle Analyse der Peptide mittels  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung in HEK 293A CMKLR1 Gu16-Zellen. grün: hydrophile Peptide/Linker; rot: hydrophobe Peptide/Linker. Alle dargestellten Werte sind Mittelwerte von Duplikatmessungen aus drei unabhängigen Experimenten.  $\mu \pm SEM$ .



**Abb. 57: Quantitative Analyse der Anreicherung von Fluorophor-markierten Chemerin-Sonden in DU4475- und SW13-Tumoren.** Dargestellt sind die Signal-zu-Hintergrund-Ratios. Vor der Injektion erfolgte die initiale Messung (0 min). Nach der Injektion von 1 nmol Konjugat (i.v.) wurden nach folgenden Zeitpunkten die Akkumulation der Sonden detektiert: 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h sowie 48 h. Nach der Messung kann mittels Pearl Software die Anreicherung (Fluoreszenz) der Sonden im Tier berechnet werden. DU4475: CMKLR1-positiver Tumor. SW13: CMKLR1-negativer Tumor. 2-way-ANOVA (*repeated-measures*; Bonferroni post-hoc Test). n=4 ;  $\mu \pm$  SEM.



**Abb. 58: Anreicherung der vier *scrambled* Sonden in der Leber.** Als Fluoreszenzfarbstoff diente ITCC (Indotricarbocyanin). Zur Kopplung von ITCC an die Sonden wurden verschiedene Linker (AHX: CG63, CG79, PEG11: CG81, LysCap: CG80) verwendet. Die *scrambled*-Sonden stellen Negativkontrolle zu den spezifischen Chemerin-Sonden dar. Vor der Injektion erfolgte die initiale Messung (0 min). Nach der Injektion von 1 nmol Konjugat (i.v.) wurden nach folgenden Zeitpunkten die Akkumulation der Sonden detektiert: 10 min; 20 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 24 h sowie 48 h. Um den zeitlichen Verlauf der Biodistribution zu verdeutlichen, wurden die Bilder jeweils mit konstanter Intensität (gleicher Verstärkungsgrad; *Gain*) dargestellt. Nach 24 h wurde das Signal maximiert, um den Verbleib der Konjugate zu visualisieren. Auf die quantitative Auswertung hat die Verstellung des *Gains* keinen Einfluss.

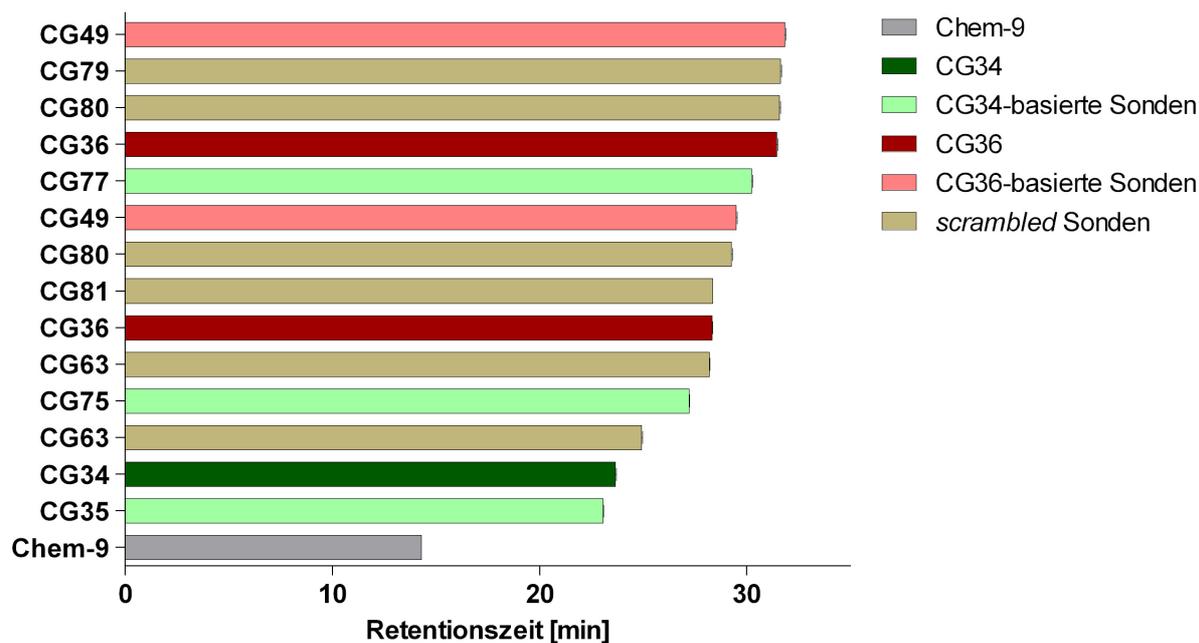


Abb. 59: Gegenüberstellung der Retentionszeiten ausgewählter Peptide. HPLC mit einer ZORBAX 300Extend-C18-Säule (Agilent). Acetonitril Gradiente von 10 % bis 65 % Acetonitril mit 0,1 % TFA über 40 min, Durchfluss: 1 mL/min. Detektion der Peptide über die Fluoreszenz bei 280 nm (Anregung) und 340 nm (Emission). n=1-3 ;  $\mu \pm$  SD. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Lars Niederstadt.

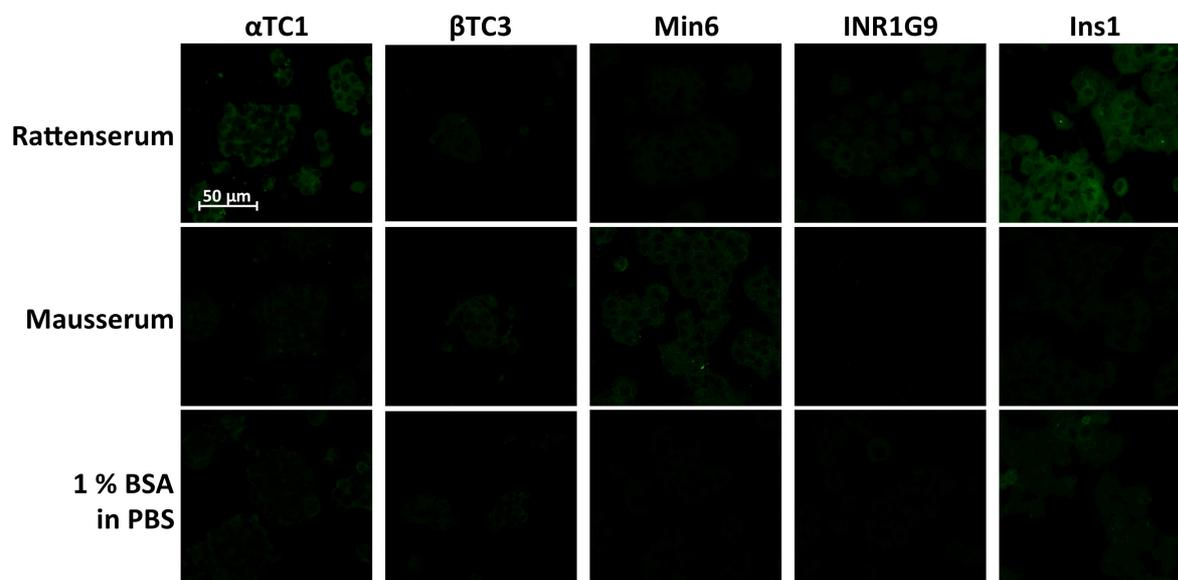


Abb. 60: Isotypkontrollen zur Immunfluoreszenz an pankreatischen Nagerzelllinien. Exemplarisches Beispiel. n=2. Als Negativkontrolle dienen 1 % BSA in PBS sowie Ratten- bzw. Mausserum in den äquivalenten Konzentrationen zu den entsprechenden Primärantikörpern (Rattenserum: 1:100; Mausserum: 1:4000). Als Sekundärantikörper dienten *goat* anti-Ratte-Cy2 (1:200) sowie *goat* anti-Maus-Cy2 (1:400).



## SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als angegeben verwendet habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

Ich erkläre außerdem, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt habe.

Berlin, den 14.04.2016

---

Sandy Hallmann