

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss des Antitumorlipids Inositol-C2-PAF auf die
Mammakarzinomzelllinie MCF-7 unter migrations- und
proliferationsfördernden Bedingungen

-

The effect of the anti-tumor lipid Inositol-C2-PAF on the mammary
carcinoma cell line MCF-7 under migration and proliferation
stimulating conditions

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Carsten Andreas Pelz

aus Münster

Datum der Promotion: 30.11.2023

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Pelz C, Häckel S, Semini G, Schrötter S, Bintig W, Stricker S, Mrawietz G, Klein A, Lucka L, Shmanai V, Eickholt B, Hildmann A, Danker K. Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells. Cellular oncology. 25. Juli 2018. (1)

Inhaltsverzeichnis

VORWORT	I
INHALTSVERZEICHNIS	II
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	XIII
ABSTRACT	XV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Einführung	1
1.2 Krebserkrankungen	1
1.3 Mammakarzinom	2
1.3.1 Epidemiologie.....	2
1.3.2 Histologischer Aufbau der Mamma.....	3
1.3.3 Einteilung, Metastasierung und gängige Therapien	3
1.4 Tumorprogression und Signaltransduktion	5
1.4.1 Epithelial-mesenchymale Transition	5
1.4.2 Tumor-assoziierte Makrophagen.....	7
1.4.3 IL-6 und CCL2.....	7
1.4.4 STAT3-Signalweg.....	9
1.4.5 IGF-1	12
1.4.6 PI3K/AKT-Signalweg.....	13
1.5 Antitumorlipide.....	20
1.5.1 Einteilung, Eigenschaften und wichtige Verbindungen	20
1.5.1.1 Einteilung und Historie	20
1.5.1.2 Wirkungen von ATLs in verschiedenen Zellsystemen	22
1.5.1.3 Gut untersuchte Antitumorlipide	28
1.5.2 Inositol-C2-PAF	29
1.5.2.1 Aufbau und Historie	29
1.5.2.2 Eigenschaften und Funktionen.....	32
1.6 Ziel dieser Arbeit	34
2 MATERIAL UND METHODEN	37
2.1 Material.....	37

2.1.1	MCF-7-Zellen.....	37
2.1.2	Geräte.....	38
2.1.2.1	Geräte für zellbiologische Methoden	38
2.1.2.2	Geräte für biochemische Methoden	38
2.1.3	Computer-Programme	39
2.1.4	Verbrauchsmaterial	40
2.1.4.1	Material für zellbiologische Methoden	40
2.1.4.2	Material für biochemische Methoden.....	40
2.1.5	Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	41
2.1.5.1	Chemikalien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden	41
2.1.5.2	Chemikalien, Puffer und Lösungen für biochemische Methoden.....	42
2.1.6	Medien, Lösungen, Gele und Puffer	43
2.1.7	Antikörper und Farbstoffe und ihre Anwendungen	44
2.1.7.1	Primärantikörper	44
2.1.7.2	Sekundärantikörper	46
2.1.7.3	Fluoreszenz-Farbstoffe.....	47
2.1.8	Stimulanzen	47
2.2	Methoden	48
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	48
2.2.1.1	Kultivierung von MCF-7-Zellen	48
2.2.1.2	Kryokonservierung und Inkulturnahme von Zellen	48
2.2.1.3	Zellzahlbestimmung.....	48
2.2.1.4	Zellviabilitätsmessung Inositol-C2-PAF behandelter Zellen mittels Trypanblau-Färbung	49
2.2.1.5	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse.....	49
2.2.1.6	Bestimmung der Proliferationsrate mithilfe Fluoreszenz-markierter Zellkerne	50
2.2.1.7	Wundheilungsassay (<i>Scratchassay</i>).....	51
2.2.1.8	Haptotaktischer Migrationsassay	51
2.2.2	Biochemische Methoden.....	52
2.2.2.1	Probengewinnung und Probenvorbereitung für Western Blot-Analyse und kapillare isoelektrische Fokussierung	52
2.2.2.2	Western Blot-Analyse	53
2.2.2.3	Kapillare isoelektrische Fokussierung	54
2.2.3	Statistische Auswertung	55
3	ERGEBNISSE.....	57
3.1	Bestimmung der Arbeitskonzentration von Inositol-C2-PAF bei MCF-7-Zellen	57
3.2	Inhibition der Migration von MCF-7-Zellen durch Inositol-C2-PAF	60
3.3	Inhibition der Proliferation von MCF-7-Zellen durch Inositol-C2-PAF	66
3.4	Aktivitätsbestimmung von STAT3 und AKT sowie dessen Isoformen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF	69
3.4.1	Einleitung.....	69
3.4.2	Aktivitätsbestimmung von STAT3.....	69
3.4.3	Aktivitätsbestimmung von AKT.....	72
3.4.4	Aktivitätsbestimmung der AKT-Isoformen.....	75
3.5	Aktivitätsbestimmung von Metaboliten <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von AKT unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF	78

4	DISKUSSION	81
4.1	Bestimmung der Arbeitskonzentration von Inositol-C2-PAF bei MCF-7-Zellen	81
4.1.1	Arbeitskonzentration und Konzentrationsbestimmungen von ATLS in der Literatur ..	81
4.1.2	Bestimmung der in dieser Arbeit verwendeten Arbeitskonzentration von Inositol-C2-PAF	82
4.2	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Migration von MCF-7-Zellen	82
4.2.1	Einfluss von ATLS auf die Zellmigration in der Literatur sowie Bestimmung der Arbeitskonzentration der Stimulanzen	82
4.2.2	Geringe Hemmung der Migration von MCF-7-Zellen durch Inositol-C2-PAF	85
4.3	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Proliferationsbereitschaft von MCF-7-Zellen	87
4.3.1	Einfluss von ATLS auf die Zellproliferation in der Literatur	87
4.3.2	Starke Hemmung der Proliferation von MCF-7-Zellen durch Inositol-C2-PAF	88
4.4	PI3K/AKT- und STAT3-Signalweg – Einfluss der Mediatoren IL-6, CCL2 und IGF-1 sowie Inositol-C2-PAF und möglicher <i>Crosstalk</i> der Signalwege	89
4.4.1	Einfluss der Stimulanzen CCL2, IL-6 und IGF-1 sowie der ATLS auf den STAT3- und den PI3K/AKT-Signalweg in der Literatur	89
4.4.2	Geringe Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 durch Inositol-C2-PAF	91
4.4.3	Starke Hemmung der Phosphorylierung von AKT durch Inositol-C2-PAF	92
4.4.4	Inhibition der Aktivierung verschiedener AKT-Isoformen durch Inositol-C2-PAF	93
4.4.5	Möglicher <i>Crosstalk</i> zwischen dem IGF-1-induzierten PI3K/AKT-Signalweg und dem STAT3-Signalweg	94
4.5	Möglicher Wirkmechanismus von Inositol-C2-PAF	96
4.5.1	Einfluss von ATLS auf den PI3K/AKT-Signalweg <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von AKT in der Literatur	96
4.5.2	Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den PI3K/AKT-Signalweg <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von AKT	97
4.5.3	Darstellung eines möglichen Wirkmechanismus von Inositol-C2-PAF auf den PI3K/AKT- und den STAT3-Signalweg	99
4.6	Neueinteilung der Antitumorlipide	101
4.6.1	Bisherige Einteilung der Antitumorlipide und deren Problematik in der Literatur	101
4.6.2	Vorschlag einer Neueinteilung der Antitumorlipide	103
4.7	Ausblick	105
4.8	Einschränkung und Schwächen der eigenen Arbeit sowie Fehlerdiskussion	107
	LITERATURVERZEICHNIS	111
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	122
	ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	124
	LEBENS LAUF	126

PUBLIKATIONSLISTE	128
DANKSAGUNG	129
BESCHEINIGUNG DES AKKREDITIERTEN STATISTIKERS.....	130

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf des STAT3-Signalwegs	11
Abbildung 2: Schematischer Ablauf des PI3K/AKT-Signalwegs.....	19
Abbildung 3: Strukturformeln relevanter Vertreter der ATLS und deren Vorläufer	21
Abbildung 4: Strukturformeln relevanter Vertreter der glykosidierten Phospholipide	31
Abbildung 5: Überlebensrate von MCF-7-Zellen bei steigender Inositol-C2-PAF-Konzentration	59
Abbildung 6: Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Morphologie von MCF-7-Zellen	60
Abbildung 7: Migration von MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF in einem Wundheilungsassay	64
Abbildung 8: Migration von MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF in einem haptotaktischen Migrationsassay und Expression des EMT-Markers E-Cadherin.....	65
Abbildung 9: Proliferation von MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF in einem Proliferationsassay durch Anwendung indirekter Immunfluoreszenz	68
Abbildung 10: Bestimmung der Proteinmenge von pSTAT3 ^{Y705} bei MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF via Western Blot und indirekter Immunfluoreszenz	72
Abbildung 11: Bestimmung der Proteinmenge von pAKT ^{S473} bei MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF via Western Blot und indirekter Immunfluoreszenz	75
Abbildung 12: Kapillare isoelektrische Fokussierung zur quantitativen Bestimmung von pAKT ^{S473} und der Bestimmung der Aktivierung der AKT-Isoformen bei MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF	77
Abbildung 13: Aktivierungsstatus von Molekülen <i>upstream</i> und <i>downstream</i> von AKT.....	80
Abbildung 14: Vorgeschlagener Wirkmechanismus von Inositol-C2-PAF	100
Abbildung 15: Vorschlag für eine neue Einteilung der Antitumorlipide - funktionelle Alkyl-Lipide (fALs)	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte für zellbiologische Methoden	38
Tabelle 2: Geräte für biochemische Methoden	38
Tabelle 3: Computer-Programme	39
Tabelle 4: Material für zellbiologische Methoden	40
Tabelle 5: Material für biochemische Methoden.....	40
Tabelle 6: Chemikalien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden.....	41
Tabelle 7: Chemikalien, Puffer und Lösungen für biochemische Methoden	42
Tabelle 8: Medien, Lösungen, Gele und Puffer.....	43
Tabelle 9: Primärantikörper	44
Tabelle 10: Blockierlösungen.....	45
Tabelle 11: Primärantikörper – Anwendung.....	45
Tabelle 12: Sekundärantikörper.....	46
Tabelle 13: Sekundärantikörper – Anwendung	47
Tabelle 14: Fluoreszenz-Farbstoffe und deren Anwendung.....	47
Tabelle 15: Stimulanzien	47

Abkürzungsverzeichnis

A

AEL	Antitumoretherlipid; Alkyletherlipid
AKT	Proteinkinase B
ALP	Alkyllysophospholipid
APC	Alkylphosphocholin
APL	Alkylphospholipid
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATL	Antitumorlipid

B

BAD	<i>Bcl-2-antagonist-of-cell-death</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BET	brusterhaltende Therapie
BRCA	<i>breast cancer</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)

C

CCD	<i>charge-coupled device</i>
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cycline dependent kinase</i>
CHOP/GADD153	<i>C/EBP homologous protein/growth arrest and DNA damage 153</i>
cIEF	<i>capillary isoelectric focusing</i> (kapillare isoelektrische Fokussierung)
C-Terminus	Carboxy-Terminus

D

DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTC	<i>disseminated tumor cell</i>
DTT	1,4-Dithiothreit

E

E2F	E2-Faktor
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	endoplasmatisches Reticulum; Estrogenrezeptor
ErPC	Erucylphosphocholin
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
F	
FADD	<i>Fas-associating death domain-containing protein</i>
fAL	funktionelles Alkyl-Lipid
FAK	fokale Adhäsionskinase
F-Aktin	filamentöses Aktin
FasL	Fas-Ligand
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
G	
GAEL	<i>glycosylated antitumor ether lipids</i>
GAM	<i>goat anti-mouse</i>
GAR	<i>goat anti-rabbit</i>
GEM	<i>GSL-enriched microdomain</i>
G-fAL	<i>glycerol containing functional alkyl lipid</i>
GH	<i>growth hormone</i>
Glc-PAF	1-O-Octadecyl-2-O- α -D-Glucopyranosyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin
Glc-PC	2-Glucophosphatidylcholin
GLN	1-O-Hexadecyl-2-O-Methyl-3-O-(2'-Amino-2'-Deoxy- β -D-Glucopyranosyl)-sn-Glycerol
gp130	Glykoprotein 130
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase-3
GSL	Glykosphingolipid
H	
HER-2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor-2/neu</i>
I	
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IF	Immunfluoreszenz
IGF-1	<i>insulin like growth factor-1</i>
IGF-1R	IGF-1-Rezeptor
IGFBP	IGF-Bindeprotein

I κ B α	<i>inhibitor of κ B α</i>
IKK α	<i>inhibitor of κ B kinase α</i>
IL	Interleukin
J	
JAK	Janus-Kinase
JNK	<i>c-Jun NH2-terminal kinase</i>
L	
LN	Lipid-Nanopartikel
LPC	Lysophosphatidylcholin
LST8	<i>lethal with sec thirteen 8</i>
M	
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCF-7/ADM	Adriamycin resistente MCF-7-Zellen
MCF-7 ^{IL-6}	MCF-7-Zellen, die konstitutiv IL-6 exprimieren
MDM2	<i>mouse double minute 2 homologue</i>
MDR	<i>multi-drug-resistance</i>
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MSGb5	Monosialyl-Globopentaosylceramid
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mammalian target of rapamycin complex</i>
MYC	<i>myelocytomatosis</i>
N	
NF- κ B	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
nG-fAL	<i>non-glycerol containing functional alkyl lipid</i>
nPCc	<i>non-phosphocholine containing</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i> (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom)
nRTK	nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase
P	
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
pAKT ^{S473}	an Serin473 phosphoryliertes AKT
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCc	<i>phosphocholine containing</i>
PD-1	<i>programmed death-1</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>

PD-L1	<i>programmed death ligand 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
pl	isoelektrischer Punkt
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKB	Proteinkinase B
pmTOR ^{S2448}	an Serin2448 phosphoryliertes mTOR
pPDK1 ^{S241}	an Serin241 phosphoryliertes PDK1
pPTEN ^{S380/T382/T383}	an Serin380, Threonin382 und Threonin383 phosphoryliertes PTEN
PR	Progesteronrezeptor
PRAS40	<i>proline-rich AKT substrate 40 kilodalton</i>
pRB ^{S795}	an Serin795 phosphoryliertes RB-Protein
pRB ^{S807/S811}	an Serin807 und Serin811 phosphoryliertes RB-Protein
pSTAT3 ^{Y705}	an Tyrosin705 phosphoryliertes STAT3
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
R	
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma kinase</i>
Raptor	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RB	Retinoblastom
Rel	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homologue</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S	
S6K1	S6 Kinase 1
SAM	<i>sheep anti-mouse</i>
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Src, (auch c-Src)	<i>cellular sarcoma</i>
SHP	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>
SK3	<i>small-conductance calcium-activated potassium channel 3</i>
sn	<i>stereospecifically numbered</i>
sn-2-s(a)c	<i>sn-2-sugar(alcohol)-containing</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>

T

TAM	Tumor-assoziiertes Makrophage
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TDLU	<i>terminal duct lobular unit</i> (Terminalductus-Lobulus-Einheit)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β 1	<i>transforming growth factor β1</i>
TME	<i>tumor microenvironment</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC2	<i>tuberous sclerosis complex 2</i>

V

VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
--------	---

W

WB	Western Blot
----	--------------

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist der häufigste Grund für alle krebsbedingten Todesfälle bei Frauen in Deutschland und auf der Welt. Der Großteil der mit dem Mammakarzinom assoziierten Todesfälle wird dabei durch Metastasen verursacht, deren Bildungen durch unkontrollierte Proliferation, Angiogenese und die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) begünstigt werden. Zwei Signalwege, deren Aktivierung bei der Metastasierung bei Mammakarzinomzellen eine bedeutsame Rolle spielen, sind der IL-6/STAT3- und der IGF-1/PI3K/AKT-Signalweg.

Die Antitumorlipide, deren bekanntester Vertreter Edelfosin ist, entfalten ihre Wirkung entgegen etablierter Chemotherapeutika nicht durch einen Angriff direkt auf die DNA oder den Spindelapparat, sondern nach Inkorporation in die Zellmembran. Auch die Gruppe der glykosidierten Phospholipide, zu der das hier betrachtete Inositol-C2-PAF zählt, gehören zu den Antitumorlipiden. Inositol-C2-PAF konnte seine anti-proliferatorischen und anti-migratorischen Effekte schon bei verschiedenen Zelltypen (zum Beispiel hämato-/onkologischen Tumorzelllinien und immortalisierten Keratinozyten) zeigen.

Um das bisherige Wissen der Wirkung von Inositol-C2-PAF um eine solide Tumorform, das Mammakarzinom, zu erweitern, wurde ein 2D-Tumormodell für die schwach invasive Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 mit dem Ziel der Stimulation von Proliferation und Migration mit IL-6 (und CCL2) sowie IGF-1 etabliert; mit der Absicht, die Wirkung von Inositol-C2-PAF durch verschiedene Assays sowohl auf zellulärer Ebene, wie Wundheilungsassays, haptotaktischen Migrationsassays und Proliferationsassays, als auch auf molekularer Ebene (IL-6/STAT3- und IGF-1/PI3K/AKT-Signalweg) mittels Western Blot-Analyse, indirekter Immunfluoreszenz-Analyse und kapillarer isoelektrischer Fokussierung (cIEF, *capillary isoelectric focusing*) nachzuweisen.

Es wurde gezeigt, dass die inhibitorische Wirkung von Inositol-C2-PAF auf die Proliferation stärker war als auf die Migration. Ebenso war der hemmende Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs stärker als auf die des STAT3-Signalwegs. Bei einer genaueren Untersuchung der AKT-Isoformen wurde nachgewiesen, dass die inhibitorische Wirkung von Inositol-C2-PAF die Phosphorylierung von mehreren AKT-Isoformen (zumindest die von AKT1 und AKT2) beeinflusst. Die eingehendere Betrachtung des PI3K/AKT-Signalwegs konnte die Wirkung von Inositol-C2-PAF über die Hemmung anderer relevanter Signalmoleküle wie mTORC1 und RB weiter untermauern.

Die effektive Wirkung von Inositol-C2-PAF auf den PI3K/AKT-Signalweg spricht für die weitere Erforschung von Inositol-C2-PAF im Hinblick auf eine wirkungsstarke und möglicherweise nebenwirkungsärmere Therapie beim Mammakarzinom.

Aufgrund einer in der Literatur vorgefundenen uneinheitlichen Klassifikation der Antitumorlipide

wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Neueinteilung der in dieser Gruppe enthaltenen Wirkstoffe vorgeschlagen, die sich am Glycerol-Grundgerüst dieser Moleküle orientiert.

Abstract

The mammary carcinoma is the most frequent reason for cancer-related deaths in women in Germany and in the world. The majority of breast cancer associated deaths are attributed to metastases, which result from uncontrolled proliferation, angiogenesis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). The activation of two signal transduction pathways, the IL-6/STAT3 and the IGF-1/PI3K/AKT pathway, plays a significant role in forming these metastases of mammary carcinoma cells.

Inositol-C2-PAF, a member of the glycosidated phospholipids which belong to the group of anti-tumor lipids, has been studied for its anti-proliferative and anti-migratory effects in different cell types including haemato-oncological tumor cells and immortalized keratinocytes. The anti-tumor lipids, whose well-known chemical lead is Edelfosine, are a group of compounds which are incorporated into the membrane. From here, they exert their effects, quite contrary to established chemotherapeutics which interfere with the DNA or the mitotic spindle apparatus.

This thesis focuses on the effect of Inositol-C2-PAF in a solid tumor, the mammary carcinoma. For this purpose, a 2D tumor model for the low invasive mammary carcinoma cell line MCF-7 was established. MCF-7 cells were incubated with IL-6 (and CCL2) and IGF-1 to stimulate both proliferation and migration. This allowed studying the effect of Inositol-C2-PAF on the cellular level using various assays like wound healing assays, haptotactic migration assays and proliferation assays, and on the molecular level with a focus on the IL-6/STAT3 and IGF-1/PI3K/AKT pathways, using Western Blot analysis, indirect immunofluorescence analysis and capillary isoelectric focusing (cIEF).

The results demonstrated, that the inhibitory effect of Inositol-C2-PAF on proliferation was more effective than on migration. Additionally, the inhibitory effect of Inositol-C2-PAF on the activated PI3K/AKT-pathway was greater than on the STAT3-pathway. Using the cIEF, it could be demonstrated that the inhibitory effect of Inositol-C2-PAF affected the phosphorylation of different AKT-isoforms (at least AKT1 and AKT2). The more detailed look on other parts of the PI3K/AKT-pathway upstream and downstream from AKT could also prove the effect of Inositol-C2-PAF through inhibition of the activation of other relevant signal transducers like mTORC1 and RB.

The potent effect of Inositol-C2-PAF on the tumor relevant PI3K/AKT-pathway requires further investigation of Inositol-C2-PAF as a potential therapeutic candidate for the mammary carcinoma. Lastly, due to an inconsistent categorization of the antitumour lipids in literature, a reclassification was suggested, that is leant on the glycerol-backbone of these molecules.

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die vorliegende Arbeit zielt darauf ab, die Wirkungsweise und den Wirkungseffekt von dem Antitumorlipid und potentiellen Medikament Inositol-C2-PAF (2) auf Brustkrebszellen zu untersuchen. Hierzu wurde die niedrigmaligne MCF-7-Brustkrebszellreihe (3) mit verschiedenen Stimulanzen, dem Interleukin-6 (IL-6) (4), dem CC-Chemokinligand 2 (CCL2) (5) und dem *insulin like growth factor-1* (IGF-1) (6) versetzt, um in diesen Zellen einen aggressiveren und schnell wachsenden Status hervorzurufen und so die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf zellulärer und molekularer Ebene mit verschiedenen Methoden zu charakterisieren.

Im Rahmen dieser Einleitung folgt auf eine kurze Vorstellung von Krebserkrankungen im Allgemeinen und Brustkrebs im Speziellen eine Darstellung der relevanten zellulären Faktoren einer Metastasierung. Hiernach werden die oben genannten Stimulanzen sowie deren beiden molekularen Hauptsignalwege eingeführt. Den Abschluss der Einleitung bildet der Überblick über die Gruppe der Antitumorlipide und deren in dieser Arbeit verwendetes Mitglied Inositol-C2-PAF.

1.2 Krebserkrankungen

Im Jahr 2020 sind insgesamt 985.572 Menschen in Deutschland verstorben, davon 338.001 (34,3 %) an Erkrankungen des Kreislaufsystems und 231.271 (23,5 %) an bösartigen Neubildungen. Damit sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Ursache aller Todesfälle in Deutschland (7). Auch weltweit ist Krebs eine der Haupttodesursachen, sowohl in ökonomisch hoch entwickelten als auch weniger entwickelten Ländern. Insbesondere in den weniger entwickelten Ländern steigt derzeit das Krebsrisiko durch die Übernahme von bestimmten Lebensstilen und Verhaltensweisen wie Rauchen, ungünstige Ernährung, physische Inaktivität und auch Änderungen des Reproduktionsverhaltens (niedrigere Geburtenzahl und höheres Alter bei erster Geburt) an. Ca. 14,1 Millionen neue Krebsdiagnosen und 8,2 Millionen Todesfälle infolge von Krebserkrankungen traten weltweit im Jahre 2012 auf. Lungenkrebs und Brustkrebs (Mammakarzinom) waren dabei die am häufigsten diagnostizierten Krebsarten sowie die häufigsten Ursachen für krebsbedingte Todesfälle insgesamt unter Männern beziehungsweise Frauen (8).

1.3 Mammakarzinom

1.3.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom stellte mit 8,0 % (18.591 Fälle) den dritthäufigsten Grund für krebsbedingte Todesfälle einzelner Organe in Deutschland im Jahr 2020 dar. Das Lungen- und Bronchialkarzinom stand dabei mit 19,4 % an erster und das Pankreaskarzinom und das Kolonkarzinom mit 8,2 % und 6,8 % an zweiter und vierter Stelle. Unter Frauen war das Mammakarzinom mit 17,5 % (18.425 Fälle) sogar die häufigste Ursache für Todesfälle unter den Krebserkrankungen. Mit < 1 % (166 Fälle) führten Brustkrebserkrankungen nur zu einem sehr geringen Anteil zu Todesfällen bei Männern, während Lungen- und Bronchialkarzinome mit 22,0 % den größten Anteil hatten (7).

Auch weltweit ist das Mammakarzinom die am häufigsten diagnostizierte Krebsform und die führende Ursache von durch Krebs bedingten Tod unter Frauen, mit etwa 1,7 Millionen Diagnosen und 521.900 Todesfällen im Jahr 2012 (8).

Der Großteil der mit dem Mammakarzinom assoziierten Todesfälle ist dabei durch Metastasen zu beklagen (5).

Geographisch gesehen sind die Zahlen dabei besonders hoch in Nordamerika, Australien/Neuseeland und Nord- und Westeuropa und eher niedrig in großen Teilen von Afrika und Asien. Diese Unterschiede bezüglich der Inzidenzen spiegeln die Unterschiede dieser Regionen wider, die in Früherkennung und Risikofaktoren herrschen. Risikofaktoren umfassen hierbei insbesondere reproduktive und hormonale Faktoren wie eine lange Menstruationshistorie, Nutzung von oralen Kontrazeptiva und postmenopausaler Hormontherapie und Kinderlosigkeit. Aber auch die potentiell modifizierbaren Faktoren Übergewicht, physische Inaktivität und Alkoholkonsum sind hier zu nennen (8). Größter Risikofaktor für die Entstehung des Mammakarzinoms ist jedoch das Alter. Das mittlere Erkrankungsalter liegt hier bei etwa 63 Jahren (9). Früherkennungsmaßnahmen wie die Mammographie und verbesserte Behandlungsmöglichkeiten sind Gründe, weswegen es seit 1990 in den ökonomisch stärkeren Ländern zu einer Stabilisierung oder Verminderung an Todesfällen durch das Mammakarzinom gekommen ist. Eine Diagnose im frühen Stadium, in dem Behandlungen effektiver sind, sowie die verbesserten Behandlungsmöglichkeiten selbst machen eine Heilung wahrscheinlicher (8). Insgesamt spielt das Mammakarzinom somit in der Todesursachenstatistik sowohl in der Gesamtheit als auch insbesondere bei Frauen eine immens wichtige Rolle, womit neue effektive Behandlungsmethoden einen stetig hohen Stellenwert besitzen.

1.3.2 Histologischer Aufbau der Mamma

Die Mamma (Brust) setzt sich aus der Brustdrüse und bindegewebigem Stroma zusammen, in dem auch Fettgewebe enthalten ist. 10 - 20 Lobi (Einzeldrüsen beziehungsweise Drüsenlappen) sind in der Brustdrüse angeordnet, wobei jeder Lobus mit eigenem Ausführungsgang auf der Brustwarze mündet. Ein Lobus besteht aus reich verzweigten Gängen, welche als Ductus lactiferi (Milchgänge) bezeichnet werden. Die Terminalductus sind die kleinsten und letzten Abzweigungen der Milchgänge vor den Endstücken, die sich als enge Tubuli oder kleine Epithelknospen präsentieren und zumeist kein erkennbares Lumen mehr haben. Alle Endstücke, die von einem Terminalductus drainiert werden, werden als Lobulus (Drüsenläppchen) umfasst. Ein Lobulus und sein Terminalductus bilden gemeinsam die Terminalductus-Lobulus-Einheit (TDLU, *terminal duct lobular unit*), die Funktionseinheit der Brustdrüse. Im Terminalductus liegen Stammzellen, die für die große Zellhyperplasie verantwortlich sind, wenn sich die Brustdrüse zur laktierenden Drüse umbaut. Zudem ist die TDLU von besonderer Bedeutung, da sich von ihr die meisten benignen und malignen epithelialen Tumore der Mamma entwickeln. Die Epithelien der Lobi und das darum liegende Mantelgewebe besitzen Rezeptoren für Estrogene, Progesteron und auch Prolaktin. Die Estrogene sind physiologisch für die Proliferation der Zellen des Gangsystems verantwortlich, Progesteron und Prolaktin für die Proliferation und Differenzierung von Zellen der Endstücke beziehungsweise Prolaktin zusätzlich für die Synthese und Sekretion der Milch (Laktation) (10).

1.3.3 Einteilung, Metastasierung und gängige Therapien

Das Mammakarzinom präsentiert sich in einer Vielzahl von histologischen, phänotypischen und in ihrer Malignität unterschiedlichen Typen. Grundsätzlich jedoch werden präinvasive (in situ) und invasive Karzinome unterschieden. Die maligne Entartung der Epithelzellen geschieht dabei entweder in den Milchgängen selbst (duktales Karzinom) oder in den Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom). 80 % der Mammakarzinome sind vom invasiv duktalem Typ. Die Karzinome bilden sich meist einseitig und sind zumeist im oberen äußeren Quadranten der Brust lokalisiert (9).

Eine Metastasierung ist schon früh und bei kleinen Tumoren über Blut- und insbesondere Lymphgefäße möglich. Die ersten Ziele der Metastasierung sind über die Lymphbahnen die sogenannten Wächterlymphknoten (Sentinel-Lymphknoten) in der Achselhöhle. Diese können gegebenenfalls entnommen und feingeweblich untersucht werden, um eine lymphogene Metastasierung auszuschließen. Liegt jedoch eine regionäre Metastasierung in die Lymphknoten bereits vor, ist auch eine hämatogene Metastasierung oftmals schon erfolgt. Diese bleibt häufig

unbemerkt und zeigt sich erst nach Jahren. Eine Organmetastasierung manifestiert sich in absteigender Reihenfolge zumeist in Knochen (50-65%), Lunge (17%), Gehirn (16%) und Leber (7%), wobei Chemokine eine Rolle in der Organspezifität der Metastasenbildung zu spielen scheinen (5,9).

Ist ein genetischer Hintergrund bekannt, handelt es sich in der Hälfte der Fälle um Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA (*breast cancer*)-1 und BRCA-2 (Chromosom 17 beziehungsweise 13) (9).

Die Therapiemöglichkeiten basieren grundsätzlich auf drei Säulen, die bei gesicherter Diagnose eines Mammakarzinoms zur Verfügung stehen. Zum einen die operative Therapie mit der Entfernung des Primärtumors entweder durch brusterhaltende Therapie (BET), die als die Standardmethode der operativen Therapie des Mammakarzinoms gilt, oder durch die komplette Mastektomie mit der möglichen darauffolgenden hetero- oder autologen Brustrekonstruktion sowie der Lymphonodektomie der axillären Lymphknoten. Zweitens die neoadjuvante/präoperative Systemtherapie, die je nach Beschaffenheit und Rezeptorstatus des Mammakarzinoms aus endokriner Therapie, Chemotherapie oder Antikörpertherapie besteht. Die dritte Säule beschreibt die Möglichkeiten einer adjuvanten postoperativen Radio- oder Systemtherapie (beispielsweise folgt auf eine BET immer eine Nachbestrahlung zur Senkung der Lokalrezidivrate und Verbesserung des Gesamtüberlebens) (9).

Prognosefaktoren, die auch Einfluss auf die Therapie des Mammakarzinoms haben, sind insbesondere der positive oder negative Hormonrezeptorstatus (Estrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR)) und *human epidermal growth factor receptor-2/neu* (HER-2/neu)-Status (9). Wie oben bereits angegeben, sind Estrogen und Progesteron Förderer der Proliferation der Epithelzellen der Brustdrüse (10) und HER-2/neu kann als Mitglied der *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-Superfamilie mit anderen Mitgliedern dieser Familie dimerisieren um so eine Signaltransduktion zu initiieren, die verstärkende Effekte auf Zellproliferation, Resistenz vor Apoptose und bestimmten Medikamenten, Migration und Invasion hat (11,12). Zu diesen Signalkaskaden zählen der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Weg und der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (PKB, AKT)/*mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Weg (13). Daher haben sich Therapien etabliert, die auf die oben genannten Rezeptoren Einfluss haben. Es kommen bei positivem Hormonrezeptorstatus endokrine Therapeutika wie das Antiestrogen Tamoxifen zur Anwendung. Einen positiven Hormonrezeptorstatus haben etwa 50 - 60 % der Mammakarzinome bei Manifestation vor der Menopause und 70 - 80 % der Mammakarzinome bei Manifestation nach der Menopause. Bei positivem HER-2/neu-Status, den etwa 15 - 20 % der Mammakarzinome besitzen, wird der monoklonale Antikörper Trastuzumab eingesetzt (9).

Die chemotherapeutische Therapie umfasst Anthrazykline wie Doxorubicin und Epirubicin,

Taxane wie Paclitaxel und Docetaxel, sowie das Alkylans Cyclophosphamid oder den Antimetaboliten 5-Fluorouracil (Pyrimidinanalogon) (9).

Besonders die chemotherapeutische Therapie hat ihre Schwächen und potentiell schädliche Nebeneffekte. Dazu gehört die Ausbildung von Resistenzen der Tumorzellen gegen bestimmte Therapeutika, die sogar bis zu einer sogenannten *multi-drug-resistance* (MDR) führen kann. Außerdem besteht das immer wiederkehrende Problem, dass die Chemotherapeutika nicht nur das Tumorgewebe angreifen, sondern auch alle sich schnell teilenden Zellen gesunder Organe. Dazu gehören das Knochenmark, der Gastro-Intestinaltrakt oder Haarfollikel. Einzelne Chemotherapeutika zeigen in ihrem Nebenwirkungsprofil auch die selektive Schädigung anderer Organe wie Herz, Leber oder Niere. Um diese Nachteile zu überwinden besteht der kontinuierliche Versuch der Forschung, neue Methoden oder Therapeutika zu entwickeln, die metabolisch stabil sind, die nach oraler Gabe gut resorbiert werden und die nur eine geringe Toxizität zum Beispiel für Knochenmarkszellen oder gastro-intestinale Zellen bei der Gabe ihrer effektiven Dosis auf Tumorzellen haben. Zu diesen aktuell neu erforschten Therapeutika gehören die sogenannten Antitumorlipide (ATLs), die weiter unten beschrieben werden und von denen das in dieser Arbeit genutzte Inositol-C2-PAF ein neuerer und vielversprechender Vertreter ist (2).

Wenn es früh entdeckt wird, gilt das Mammakarzinom grundsätzlich als heilbar. Es zeigt sich für alle Mammakarzinompatientinnen zusammengenommen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 76,9 % und eine 10-Jahres-Überlebensrate von 60,7 % (9). Ein metastasiertes Mammakarzinom gilt jedoch auch heutzutage noch als unheilbar und hat nur noch eine 5-Jahres-Überlebensrate von 27 % (5,9). Eine systemische Therapie ist dann rein palliativ, zum Erhalt der Lebensqualität und zur Linderung von tumorbedingten lokalisationspezifischen Symptomen (9).

1.4 Tumorprogression und Signaltransduktion

1.4.1 Epithelial-mesenchymale Transition

Mehr als die Effekte durch den lokalen Tumor der Mamma ist die Metastasierung der Tumorzellen beziehungsweise ihr Wachstum an sekundären Orten die schwerwiegendste Ursache für die Mortalität bei Mammakarzinomen (3). Wie der Prozess der Metastasierung funktioniert, wie ein Tumor lokal infiltriert und systemisch disseminiert, ist schon lange ein wichtiges Forschungsfeld. Tumorzellen können über drei Wege disseminieren: das Blutsystem, das Lymphsystem und über Körperhöhlen hinweg (14). Eine unkontrollierte Proliferation und Angiogenese gehören dabei zu den Hauptprozessen, die eine Metastasierung ermöglichen. Jedoch sind zusätzliche

Mechanismen vonnöten, um eine Metastase erfolgreich in einem neuen Gewebe zu etablieren (15). Hierzu gehört die sogenannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT), ein evolutionär konservierter Prozess, der in der Embryogenese seine physiologische Bedeutung findet, der aber auch bei der Metastasierung eine wichtige Rolle spielt (5,15,16). Bei der EMT handelt es sich um einen komplexen Prozess, bei dem die gesamte Tumorumgebung (TME, *tumor microenvironment*), also die Gesamtheit der Tumorzellen selbst, die mesenchymalen Zellen sowie die große Bandbreite von tumorinfiltrierenden Zellen, eine tragende Rolle spielt (17). Während der EMT erlangen vereinzelte nicht-invasive epitheliale Tumorzellen in einem soliden Tumor die Fähigkeit, die Basalmembran zu infiltrieren und in Blut- oder Lymphgefäße einzudringen, was durch Angiogenese via Induktion von *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A) und *Remodeling* oder Destruktion der Basalmembran vereinfacht wird (5,15). Über die Kreislaufzirkulation können diese Zellen an einer sekundären Stelle durch Adhäsion an das vaskuläre Endothel, gefolgt von Matrixdegradation durch die verstärkte Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP), in „fremdes“ Gewebe eindringen und so Metastasen setzen (5,15). Ein Teil der Zellen verbleibt dabei im Gefäßsystem als sogenannte *circulating tumor cells* (CTCs). Eine weitere Zell-Fraktion bleibt am sekundären Ort indolent als *disseminated tumor cells* (DTCs) (15).

Das Hauptmerkmal der EMT ist der Verlust beziehungsweise die Herunterregulation des Adhäsionsmoleküls epitheliales Cadherin (E-Cadherin) (15). E-Cadherin ist ein transmembranäres Glykoprotein, das über Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett eine homophile Calcium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion vermittelt und eine wichtige Rolle in der Kontrolle, Bildung und Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität spielt (18,19). Eine Vielzahl von extrazellulären Faktoren kann eine EMT induzieren, dazu gehören Wachstumsfaktoren und inflammatorische Zytokine, aber auch Hypoxie oder bestimmte Zell-Matrix-Interaktionen können Induktoren sein (20).

Ein Prozess, der gegensätzlich zur EMT verläuft, die sogenannte mesenchymal-epitheliale Transition (MET), steht derzeit unter intensiver wissenschaftlicher Beobachtung und es wird vermutet, dass dieser Vorgang dazu beiträgt, dass DTCs kolonisieren und Makrometastasen bilden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es am Ort der Metastasierung zu einer Reexpression von E-Cadherin der Tumorzellen kommt, was durch die Tumorumgebung am sekundären Ort beeinflusst wird (15).

Zellen, die eine EMT vollzogen haben, zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie und widerstehen externen Einflüssen insgesamt besser. Dies ist vereinbar mit der Beobachtung, dass diese Zellen weniger stark proliferieren und vermehrt zur Migration befähigt sind. Sobald die Zellen wiederum eine MET durchgemacht haben, proliferieren sie wieder stärker, sodass die Hypothese besteht, dass sie einem chemotherapeutischen Einfluss wieder besser

zugänglich sein sollten (15).

1.4.2 Tumor-assoziierte Makrophagen

Eine weitere wichtige Rolle beim Prozess der Metastasierung spielen sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) (5). Metastatische Brustkrebszellen beispielsweise produzieren das Chemokin CCL2 und können so inflammatorische Monozyten rekrutieren, die den *C-C chemokine receptor type 2* (CCR2), einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR, *G protein-coupled receptor*), exprimieren und im Tumorgebiet zu TAMs differenzieren (5,17). TAMs induzieren Tumorwachstum und Angiogenese und fördern sowohl die Migration als auch die Invasion von Mammakarzinomzellen. Sie begünstigen auch die Intravasation der Tumorzellen und somit die Ausbreitung des Tumors zu sekundären Orten wie Knochen oder Lunge. Hierfür sezernieren TAMs unter anderem Wachstumsfaktoren wie den *epidermal growth factor* (EGF) und VEGF-A, die Chemokine CCL2 und C-X-C-Motiv Ligand 8 (CXCL8), auch als IL-8 bezeichnet (5), das Zytokin IL-6 und Enzyme, die die Extrazellulärmatrix (EZM) degradieren, wie Kathepsine, MMPs und Serinproteasen, was eine Lockerung des den Tumor umgebenden Gewebes bewirkt und eine lokale Invasion oder den Eintritt in die Blut- oder Lymphzirkulation erlaubt beziehungsweise erleichtert (4).

1.4.3 IL-6 und CCL2

Wie oben beschrieben, sind die sich im Tumorgebiet von Monozyten zu TAMs entwickelnden Zellen in der Lage durch Sekretion verschiedener Faktoren die Gegebenheiten im TME zu verändern (4,5). Hierzu gehören auch CCL2 (5), auch *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) genannt, und IL-6 (4).

CCL2, ein 76 Aminosäuren langes Polypeptid, ist ein Mitglied der C-C-Subfamilie der Chemokin-Superfamilie (21). Es ist zentraler Bestandteil in Prozessen der Inflammation und Chemotaxis und der Zellmigration (22), aber auch der EMT-Progression (23). Chemokine können sowohl von verschiedenen Immunzellen als auch von Gewebszellen wie Endothelzellen und Epithelzellen sowie Fibroblasten auf entzündliche Reize hin wie von IL-1 oder Tumornekrosefaktor α (TNF- α) gebildet werden, sodass bestimmte Immunzellen in ein entzündetes Gewebe rekrutiert werden können (24). Jedoch können auch Tumorzellen wie metastatische Brustkrebszellen Immunzellen wie Monozyten rekrutieren, sodass diese am Tumorort zu TAMs differenzieren und darüber zur Produktion von CCL2 oder IL-6 angeregt werden (4,5).

IL-6, ein aus 184 Aminosäuren bestehendes Protein (25), gilt als pleiotropes Zytokin und spielt

grundsätzlich eine wichtige Rolle in inflammatorischen und Immunprozessen. Dazu gehört insbesondere die Induktion der hepatischen Akute-Phase-Reaktion (26) beziehungsweise der entsprechenden Proteine wie dem C-reaktiven Protein (CRP) (27). Dabei gilt IL-6 neben TNF- α und IL-1 als wichtigstes Zytokin der frühen Abwehr und Entzündung und wird zum größten Teil von mononukleären Phagozyten (Monozyten und Makrophagen) gebildet. Darüber hinaus sind auch Endothelzellen und Fibroblasten zur Synthese und Sekretion von IL-6 befähigt (24).

Neuere Studien zeigen, dass eine erhöhte Konzentration von IL-6 im Serum beim Vergleich von Brustkrebspatientinnen mit gesunden Spenderinnen besteht. Diese geht einher mit einer erhöhten Anzahl von Metastasen und einer insgesamt schlechteren Prognose der Patientinnen. Auch im Brusttumorgewebe selbst wurde bereits im Vergleich zu gesundem Gewebe eine erhöhte IL-6-Expression festgestellt. Eine erhöhte IL-6-Expression korreliert dabei zusätzlich mit einem höheren Tumorstadium (27). Auch die CCL2-Expression scheint studiengemäß eine Assoziation mit einem fortgeschrittenen Krankheitsverlauf und der Progression von Brustkrebs aufzuweisen (28). Zudem konnte gezeigt werden, dass CCL2 und IL-6 wiederum neben der auch bereits beschriebenen Wirkung auf Zellen des TME einen direkten Effekt auf Mammakarzinomzellen haben können und somit zusätzlich einen malignen Phänotyp durch Verstärkung der migratorischen und invasiven Eigenschaften der Krebszellen fördern (27,28).

Die in dieser Arbeit verwendete weniger stark invasive Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (3) exprimiert zwar nicht IL-6 (16) und CCL2 (29) selbst, aber die für beide Mediatoren notwendigen Rezeptoren (16,30). Die im Vergleich stärker invasive Zelllinie MDA-MB-231 beispielsweise kann hingegen sowohl IL-6 (16) als auch CCL2 (29) exprimieren und besitzt auch die Rezeptoren für beide Moleküle (16,31).

Sullivan et al. (2009) konnten in einem 3D-Modell mit MCF-7-Zellen und einer Stimulation über 24 h mit 50 ng/ml IL-6 zeigen, dass IL-6 effektiv einen EMT-Phänotyp in MCF-Zellen hervorrufen kann. Eine verminderte Expression von E-Cadherin ging einher mit einer charakteristischen erhöhten Invasivität *in vitro* sowie einem erhöhten Tumorzell-Proliferationsindex (27).

Chen et al. (2015) zeigten, dass die Zugabe von CCL2 zu IL-6 behandelten Zellen die Anzahl von Zellen, die eine EMT durchlaufen, erhöhte und zu einer erhöhten Zellmigration und Zellinvasion führte, was eine enge Korrelation beziehungsweise einen synergistischen Effekt zwischen CCL2 und IL-6 vermuten lässt. In ihrer Studie, in der Zellen eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) über 24 h mit 50 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml CCL2 stimuliert wurden, konnte gezeigt werden, dass die IL-6-vermittelte Aktivierung des *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 3-Signalwegs (Abb. 1) durch Phosphorylierung mittels CCL2 noch synergistisch gesteigert werden konnte. Dabei induzierten CCL2 und IL-6 sich sogar gegenseitig in einer Verstärkungsschleife (*feed forward loop*) und förderten dadurch eine erhöhte STAT3-Aktivität (17). STAT3 ist in mehr als 50 % der Brustkrebstumore und Brustkrebszelllinien

konstitutiv aktiv (16). Darüber hinaus konnte eine Blockierung von STAT3 eine starke Verminderung der IL-6- und CCL2-Expression hervorrufen, was somit eine Regulation der zwei Faktoren über den STAT3-Signalweg vermuten lässt (17).

In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnten durch Stimulation mit CCL2 in ansteigenden Konzentrationen zwischen 0,1 und 100 ng/ml signifikante chemotaktische Effekte gefunden werden. Auch in weiteren humanen Brustkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass CCL2 eine migrationsfördernde Reaktion auslösen konnte. Daher wurde eine potentielle Rolle im Prozess der Tumorzellinvasion und Metastasierung vermutet (30). Diese These unterstützt ein Mausmodell mit humanen Mammakarzinomzellen, in dem ein neutralisierender Antikörper gegen CCL2 zu einer erhöhten Überlebensrate der Mäuse und einer Inhibition des Wachstums von Lungenmikrometastasen führte (32).

Ein Behandlungsregime, das additiv zur heutigen Brustkrebstherapie eingesetzt wird und gegen die Wirkungen von IL-6 und CCL2 gerichtet ist, könnte somit einen neuen rationalen Therapieansatz repräsentieren. Eine direkte Inhibition der beiden Moleküle erscheint aufgrund ihrer zahlreichen physiologischen Wirkungen im Gesunden nicht sinnvoll. Es wäre eine solche Wirkung eines Inhibitors erwünscht, der *downstream* in der Signalkaskade in der Krebszelle möglichst spezifisch an den pathologischen molekularen Prozessen ansetzt.

1.4.4 STAT3-Signalweg

STATs sind Teile einer Proteinfamilie von hoher Homologie mit sieben Mitgliedern: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5 α , STAT5 β und STAT6 (33).

Von STAT3 gibt es vier Isoformen, von denen STAT3 α die Hauptform ist, die an einer Reihe zellulärer Prozesse wie Angiogenese, Apoptose, Zellzyklusprogression und Migration beteiligt ist (33,34). Die unbekannteren Isoformen STAT3 β , STAT3 γ und STAT3 δ sind weniger gut untersucht. Für STAT3 γ und STAT3 δ konnte gezeigt werden, dass sie für die Differenzierung der neutrophilen Granulozyten von Bedeutung sind (33).

Die Aktivierung von STAT3 erfolgt, wie erwähnt, durch IL-6, das an seinen Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) auf der Zelloberfläche bindet, wodurch das membranständige Glykoprotein gp130 rekrutiert wird (Abb. 1) (4). Dies führt zur Homodimerisierung von gp130 (35) und somit zur Aktivierung der assoziierten Janus-Kinase (JAK) (4), die an eine intrazelluläre Domäne des gp130 bindet und zunächst für Phosphorylierungen an mehreren Tyrosinresten im gp130 sorgt (36). Als Resultat kommt es zu einer Bindung von STAT3 an gp130 über seine *Src homology domain 2* (SH2-Domäne) an die phosphorylierten Tyrosine, sodass JAK jetzt STAT3 durch ihre nun räumliche Nähe zueinander an Tyr705 entscheidend phosphorylieren kann (36,37). JAK kann

STAT3 zudem an Ser727 phosphorylieren, was eine fördernde Wirkung auf die STAT3-Aktivität hat (36), aber nur in der STAT3 α -Isoform relevant ist (33). An Tyr705 phosphoryliertes STAT3 dimerisiert und wandert in den Zellkern (4), wo es als Transkriptionsfaktor an korrespondierende Promoter zahlreicher Zielgene bindet, deren Protein-Produkte neben den physiologischen Funktionen des Körpers auch in der Tumorentwicklung von Bedeutung und mit Zellproliferation, Überleben der Zellen (*Survival*), Angiogenese und Migration assoziiert sind (36,37). Unter der Kontrolle von STAT3 stehen beispielsweise der Hypoxie-induzierte Faktor 1A (HIF-1A), welcher eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt (4), Cyclin D1, ein wichtiger Faktor des Zellzyklus (38) (siehe unten) und *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) (35), welches als anti-apoptotisches Protein die äußere Membran der Mitochondrien stabilisiert und die Cytochrom c-Freisetzung und damit die Caspase 9-Aktivierung zur Einleitung der Apoptose verhindert (24). Ein weiteres Gen, das durch das STAT3-Dimer transkribiert wird, ist das vom *transforming growth factor β 1* (TGF- β 1). TGF- β 1 ist ein Wachstumsfaktor, der die Proliferation und Metastasierung von Tumorzellen fördert und eine EMT induzieren kann (4).

Physiologisch wird STAT3 unter anderem durch *Feedback*-Mechanismen reguliert, zum Beispiel durch Mitglieder der *suppressor of cytokine signaling proteins* (SOCS)-Familie, die nach Hochregulation von STAT3 direkt an JAKs binden oder mit STAT3 um die Bindungsstelle konkurrieren. Andere Möglichkeiten sind direkte Inhibitoren der Aktivität von STAT3 auf DNA-Ebene durch Mitglieder der *protein inhibitor of activated STAT* (PIAS)-Familie und Phosphatasen wie *Src homology region 2 domain-containing phosphatase* (SHP)-1 und SHP-2, die durch Dephosphorylierung aktiviertes STAT3 inaktivieren (33,39).

Auch in Brustkrebszellen wie MCF-7-Zellen konnte eine Induktion der EMT durch den IL-6/STAT3-Signalweg bereits nachgewiesen werden. Kondaveeti et al. (2015) konnten zeigen, dass an Tyr705 phosphoryliertes STAT3 nur in solchen MCF-7-Zellen detektierbar war, die eine EMT durchgemacht haben und dass eine Suppression der STAT3-Signalkaskade die EMT-assoziierten Veränderungen der Expression bestimmter relevanter Proteine zurückführte (40). Darüber hinaus konnten Lee et al. (2010) mittels Western Blot-Analyse nachweisen, dass STAT3 in unbehandelten MCF-7-Zellen nur minimal an Tyr705 phosphoryliert und damit aktiv war (41). Viele Primärtumoren exprimieren ein konstitutiv aktiviertes STAT3 und bei 30 - 60 % der primären Brustkrebstumoren ist STAT3 im Gegensatz zu den oben genannten MCF-7-Zellen dauerhaft an Tyr705 phosphoryliert (37,41), was freilich auch durch das Überangebot von Zytokinen wie IL-6 und anderen Wachstumsfaktoren im TME (siehe oben) bedingt sein kann (35). Diese persistierende STAT3-Aktivierung ist häufig mit einem schlechten Outcome und Tumorinvasion und Metastasierung beziehungsweise EMT assoziiert (35).

Eine Blockierung des IL-6/STAT3-Signalweges könnte somit eine vielversprechende Möglichkeit sein, eine Metastasierung des Mammakarzinoms zu vermindern oder gar zu verhindern (4).

Obwohl es viele Ansätze mit unterschiedlichen STAT3-Inhibitoren gibt, ist die klinische Applikation von diesen jedoch noch schwierig, da zum Beispiel mit der Schwierigkeit der Einbringung des Inhibitors in die Zelle, fehlender Bindungsspezifität und zu schnellem Abbau des Inhibitors Probleme bestehen, die vor einer wirksamen Nutzung des jeweiligen Stoffes gelöst werden müssen (33).

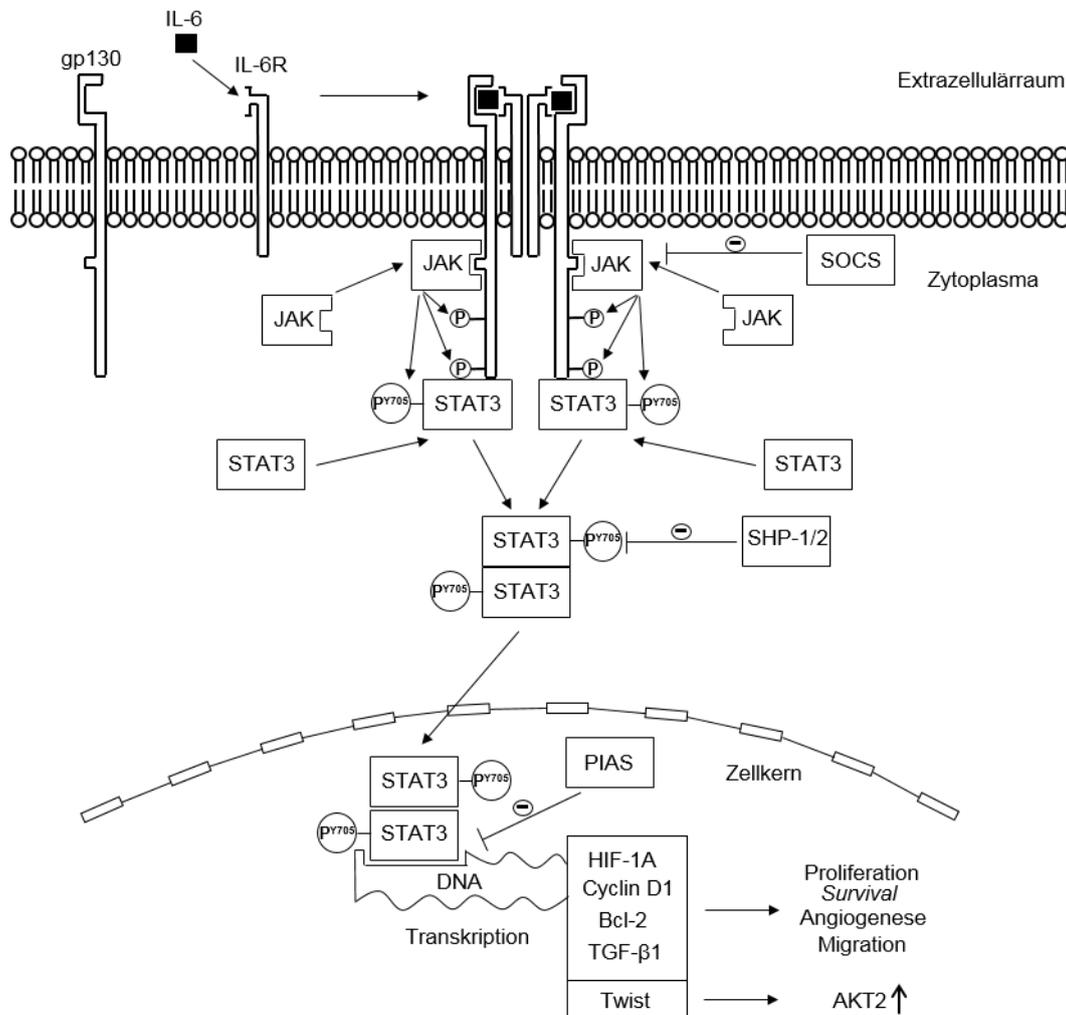


Abbildung 1: Schematischer Ablauf des STAT3-Signalwegs

Bei der Aktivierung des STAT3-Signalwegs bindet IL-6 zunächst an seinen Rezeptor IL-6R auf der Zelloberfläche. Dadurch kommt es zur Rekrutierung und Dimerisierung von gp130 (4,35). Es folgt darauf die Aktivierung und Bindung der JAK an gp130, welche für verschiedene Tyrosin-Phosphorylierungen an gp130 sorgt (4,36). STAT3 kann nun an diese Phosphorylierungen binden und wird nun selbst durch die JAK an Tyr705 phosphoryliert (36). Nachfolgend dimerisiert STAT3 und wandert in den Zellkern (4) um als Transkriptionsfaktor an Promoter zahlreicher Zielgene (36) wie HIF-1A (4), Cyclin D1 (38), Bcl-2 (35) und TGF-1 β (4) zu binden, die mit Proliferation, Survival, Angiogenese (36) und Migration (37) der Zelle assoziiert sind. STAT3 reguliert auch die Expression des Transkriptionsfaktors Twist hoch, der sich häufig auch bei Brustkrebstumoren überexprimiert zeigt und bei dessen Erhöhung auch eine erhöhte Fähigkeit der Tumorzellen zur Metastasierung durch EMT zu beobachten ist (42). In dieser Hinsicht ist dabei die transkriptionelle Induktion von AKT2 durch Twist festzustellen (43). Reguliert wird der IL-6-Signalweg über STAT3 über verschiedene Hemmechanismen. Mitglieder der SOCS-Familie binden direkt an die JAK oder konkurrieren mit STAT3 um deren Bindungsstelle. Direkte Inhibitoren der Aktivität von STAT3 auf DNA-Ebene sind die Angehörigen der PIAS-Familie (33). Zudem können die Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 durch Dephosphorylierung das aktivierte STAT3 inaktivieren (33,39).

Die Darstellung der Abbildung ist angelehnt an Abbildungen von Johnson et al. (2018) (36) und Wang und Sun (2014)

(44).

AKT: Proteinkinase B; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; DNA: deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure); gp130: Glykoprotein 130; HIF-1A: Hypoxie-induzierter Faktor 1A; IL-6: Interleukin-6; IL-6R: Interleukin-6 Rezeptor; JAK: Janus Kinase; PIAS: protein inhibitor of activated STAT; SHP: Src homology region 2 domain-containing phosphatase; SOCS: suppressor of cytokine signaling proteins; STAT3: signal transducer and activator of transcription; TGF- β 1: transforming growth factor β 1.

1.4.5 IGF-1

Neben den oben genannten CCL2 und IL-6 spielt auch der Wachstumsfaktor IGF-1 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Mammakarzinoms, seiner Progression und Metastasierung (6).

IGF-1 ist ein Insulin-ähnliches einkettiges Polypeptid, bestehend aus 70 Aminosäuren, das vornehmlich durch den Einfluss von Somatotropin (GH, *growth hormone*) in der Leber, jedoch auch im Knochen und anderen Geweben wie der Mamma gebildet wird (6,24). Es wirkt hauptsächlich parakrin, kann aber auch endokrin klassisch als Hormon wirken (24).

Physiologisch hat IGF-1 eine wachstumsfördernde Wirkung. So steigert es die DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese und fördert somit die Zellteilung und damit beispielsweise das Längenwachstum des Knochens (24). Auch in der Mamma hat es diese Wirkung, wird insbesondere von den Stromazellen gebildet und gilt als Mediator in der Entwicklung und Ausknospung von Drüsen und Drüsengängen. Die Konzentration des IGF-1 im Blut variiert stark in Abhängigkeit des Alters. Während sie von der Kindheit bis zur Pubertät ansteigt, fällt die Konzentration aufgrund niedrigerer GH-Level im Alter stetig ab (6).

Zum IGF-1-System gehören neben IGF-1 selbst zudem noch die sogenannten IGF-Bindeproteine (IGFBP) und der IGF-1-Rezeptor (IGF-1R). Das zirkulierende IGF-1 ist an die IGFBPs gebunden. Nur 1 % des IGF-1 liegt ungebunden und somit aktiv vor. Der IGF-1R ist ein transmembraner Tyrosinkinaserzeptor, über den zwei Signalkaskaden getriggert werden: der PI3K/AKT-Signalweg (Abb. 2) und der *rapidly accelerated fibrosarcoma kinase* (RAF)/MAPK-Signalweg (6). Bindet IGF-1 an seinen Rezeptor IGF-1R, werden sowohl der PI3K/AKT-Signalweg, als auch der RAF/MAPK-Signalweg aktiviert, was nicht nur zu erhöhter physiologischer Proliferation von gesunden Zellen, sondern auch von Brustkrebszellen führt (6). Der die Wirkung von IGF-1 vermittelnde IGF-1R ist in bis zu 50% der Mammakarzinomen überexprimiert und Frauen mit einem erhöhten Rezeptorstatus von IGF-1R haben ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken (6,45). Auch die in dieser Arbeit genutzten MCF-7-Zellen exprimieren hohe Level des IGF-1R (46).

Die S6 Kinase 1 (S6K1) ist ein *downstream* Effektor von PI3K/AKT/mTOR (Abb. 2) und induziert die Phosphorylierung von ER α , das, in dieser Form, als Transkriptionsfaktor dient und die Transkription von IGF-1, dem IGF-1R und anderen Gene, die das Brustkrebswachstum stimulieren, hochreguliert. Damit handelt es sich um einen positiven *Feedback*-Mechanismus,

durch den die Proliferation der Brustkrebszellen zusätzlich verstärkt wird (6).

IGF-1 fördert die Bildung und die Metastasierung des Mammakarzinoms durch die parakrinen Interaktionen zwischen den IGF-1-bildenden Stromazellen und den Krebszellen im TME. IGF-1, das in die Blutbahn gelangt und systemisch wirkt, trägt ebenfalls zur Krankheitsprogression und Metastasierung bei. So konnten Korrelationen zwischen erhöhtem Plasma-IGF-1 und Brustkrebsrisiko beziehungsweise einer erhöhten Mortalität bei Frauen mit diagnostiziertem Brustkrebsleiden festgestellt werden (6).

IGF-1 aktiviert zum einen MMPs, die als Endopeptidasen für die Spaltung und das *Remodeling* der EZM verantwortlich sind und zum anderen TGF- β 1, welches über eine Signalkaskade zur Anreicherung von β -Catenin im Zellkern führt, welches die Transkription EMT-relevanter Gene fördert (6,47). Liao et al. (2014) konnten zeigen, dass IGF-1 in MCF-7-Zellen direkt EMT in diesen Zellen auslösen kann. Dabei spielt laut dieser Studie insbesondere die durch IGF-1 und PI3K/AKT vermittelte Hochregulation von Mucin 1 (MUC1), einem transmembranen Glykoprotein, eine wichtige Rolle, das unter anderem ebenso wie TGF- β 1 die Anreicherung von β -Catenin im Zellkern bewirkt (48). Damit ist IGF-1 für die Entwicklung einer EMT und für die Metastasierung des Mammakarzinoms mitverantwortlich (6).

Eine Therapie, die somit auf IGF-1 oder dessen *downstream*-Signalkaskade abzielt, stellt einen vielversprechenden Ansatz dar. Da es sich jedoch bei IGF-1 um einen Wachstumsfaktor handelt, der für die Regelung der systemischen Homöostase in Schlüsselgeweben wie Muskeln und Herz essentiell ist, erscheint es auch hier, genauso wie bei CCL2 und IL-6 beschrieben, nicht sinnvoll, Tumorentwicklung oder -progression zu vermindern oder zu verhindern, indem man eine Therapie entwickelt, die direkt auf die Hemmung von IGF-1 abzielt. Ein Inhibitor, der *downstream* in der Signalkaskade in der Tumorzelle an den pathologischen molekularen Punkten ansetzt, stellt jedoch durchaus eine sinnvolle Alternative dar (46).

1.4.6 PI3K/AKT-Signalweg

Der PI3K/AKT-Signalweg hat einen Einfluss auf verschiedenste zellphysiologische Funktionen und der zentrale Effektor AKT zeigt durch die Phosphorylierung zahlreicher Substrate seinen Einfluss auf den Zellzyklus, *Survival* der Zelle, Zellmetabolismus und Zellmigration (Abb. 2) (49).

Die PI3Ks sind eine Proteinfamilie von Lipidkinasen, die aufgrund ihrer Struktur und Funktion in 3 Klassen unterteilt werden (Klasse I (A und B), II und III). In Klasse IA sind die Gene *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha* (PIK3CA), *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta* (PIK3CB) und *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta* (PIK3CD)

zusammengefasst, die für die Isoenzyme p110 α , p110 β und p110 δ kodieren (50).

Der PI3K/AKT-Signalweg wird aktiviert, indem Wachstumsfaktoren wie IGF-1 an ihren jeweiligen Rezeptor an der Zelloberfläche binden und somit die Signalkaskade über Aktivierung der PI3K intrazellulär in Gang setzt (50). Dabei rekrutiert die aktivierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) die regulatorische Untereinheit der PI3K und setzt somit die katalytische Untereinheit der PI3K frei (51).

Nach Aktivierung durch die RTK über IGF-1 (6) phosphorylieren die intrazellulären Klasse I PI3Ks nun präferentiell das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃). Dies hat eine Rekrutierung von inaktivem AKT über seine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) an PIP₃ in der Plasmamembran zur Folge, wo es nun aktiviert werden kann. Gegenspieler dieser Reaktion ist die Phosphatase PTEN, die PIP₃ dephosphoryliert, wodurch wieder PIP₂ wieder entsteht (52). Ist die Menge an PTEN vermindert oder fehlt PTEN ganz, sorgt die erhöhte Verfügbarkeit von PIP₃ für eine verstärkte Aktivierung der Signaltransduktionskaskade (52,53).

Von der Serin/Threonin-Kinase AKT (52) (PKB) existieren die drei Isoformen AKT1, AKT2 und AKT3 (54), die durch 3 verschiedene Gene kodiert werden (49). Da sie eine starke Homologie zu den Proteinkinasen A, G und C aufweisen, gehören sie zur AGC-Kinase-Familie (54).

Während AKT1 ubiquitär vorkommt, wird AKT2 in Insulin-responsiven Geweben exprimiert. AKT3 findet man vornehmlich in Gehirn und Hoden (55). Anhand von *Knockout*-Versuchen bei Mäusen konnten genauere Funktionen für AKT-Isoformen identifiziert werden: Mäuse mit *Knockout* von AKT1 wiesen eine erhöhte Neugeborenensterblichkeitsrate und Wachstumsretardierung aufgrund von Defekten in der plazentären Entwicklungsphase auf. Eine gewebetypische Deletion von AKT1 zeigte dessen wichtige Rolle in Zellwachstum und Zellgröße. Dahingegen wiesen Mäuse mit einem *Knockout* von AKT2 eine Insulinresistenz und einen Diabetes mellitus Typ II auf. Durch das Ausschalten von AKT3 konnte nachgewiesen werden, dass diese Isoform eine essentielle Rolle in der postnatalen Gehirnentwicklung spielt (49).

Das Protein AKT enthält 3 funktionell relevante Domänen: die PH-Domäne, ein hochkonservierter Bereich mit einer Größe von 100 - 120 Aminosäuren (56) am Amino-Terminus (N-Terminus) von AKT, über die AKT an PIP₃ binden kann; die katalytische Domäne, die hinter einer Glycin-reichen Region auf die PH-Domäne folgt und in der eine relevante Phosphorylierungsstelle (Thr308) für die Aktivierung von AKT liegt; das sogenannte hydrophobe Motiv (HM), das am Carboxy-Terminus (C-Terminus) gelegen ist und die zweite relevante Phosphorylierungsstelle (Ser473) enthält (55).

Die Aktivierung von AKT erfolgt durch Phosphorylierung der zwei genannten Aminosäuren, Thr308 im aktiven Zentrum und Ser473 am C-Terminus. Während die Phosphorylierung an Thr308 für die Aktivierung von AKT erforderlich ist, führt die Phosphorylierung an Ser473 zu einer

Aktivierungsverstärkung und zur Stabilisierung des Aktivierungsstatus der Kinase. Für die Phosphorylierung an Thr308 sorgt die *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1), während die Phosphorylierung von Ser473 durch den *mammalian target of rapamycin complex* (mTORC) 2 erfolgt (52). Beide Enzyme besitzen wie AKT eine PH-Domäne und können über PIP3 an die Membran binden (49,57). Neben der Phosphorylierung sind weitere posttranslationale Modifikationen von AKT bekannt, die aber vermutlich eher für die Feinsteuerung der Aktivierung, die zelluläre Lokalisation oder die Substratspezifität verantwortlich sind (52).

Aktiviertes AKT kann nachfolgend direkt zahlreiche Zielmoleküle wie andere Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren, Regulatoren kleiner G-Proteine oder Zellzyklusregulatoren phosphorylieren und darüber Proliferation, Wachstum, Metabolismus, *Survival* und Migration der Zelle beeinflussen (49,52).

Einen Einfluss auf das *Survival* der Zelle hat AKT, indem es direkt das pro-apoptotische Protein *Bcl-2-antagonist-of-cell-death* (BAD) phosphoryliert und inaktiviert, welches aktiviert einen pro-apoptotischen Effekt durch Bindung und Inaktivierung von Mitgliedern der Bcl-2-Familie ausübt, die einen *Survival*-Effekt haben (24,54). So kann die Cytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien und nachgeschaltet die Aktivierung von Caspase-9 als Apoptoseinduktor der Caspase-Kaskade vermindert werden (24). AKT kann die Caspase-9 auch direkt inhibieren (58).

Ein weiteres Substrat von AKT, das mit der Regulation von Zellzyklus und Proliferation in Zusammenhang steht, ist das *mouse double minute 2 homologue* (MDM2, beim Menschen HDM2 genannt, *human double minute 2 homologue*). Hierbei handelt es sich um eine E3-Ubiquitin-Ligase, die durch Phosphorylierung von AKT in den Nukleus der Zelle transloziert wird und für den Abbau von p53 sorgt (54). p53 gilt als „Wächter des Genoms“ und kann bei größeren Schäden der DNA verhindern, dass sich eine Zelle teilen kann. Als Folge wird deren Apoptose eingeleitet. So wird verhindert, dass sich veränderte Zellen weiter vermehren. Dieses erzielt p53 durch zwei Hauptwirkungen, erstens den Zellzyklusarrest am G₁/S-Übergang und am G₂/M-Übergang und zweitens durch Einleitung der Apoptose. Der G₁-Block beispielsweise wird durch eine vermehrte Expression von p21 durch p53 verursacht, was dazu führt, dass p21 den Zellzyklus durch Hemmung des Cyclin-D/*cycline dependent kinase*(CDK)4/6-Kinasekomplexes am Voranschreiten hindert (24). Das Substrat dieses Kinasekomplexes ist das Retinoblastom (RB)-Protein, ein zentraler Regulator des Zellzyklus, der durch den Kinasekomplex phosphoryliert wird und dann den Transkriptionsfaktor E2-Faktor (E2F) nicht mehr inaktivieren kann (24,59). Somit wird die S-Phase eingeleitet und es kommt zur Transkription von Zielgenen, die für die Überschreitung des Restriktionspunkts, für die DNA-Replikation und für das Zellwachstum über Erhöhung der Expression des Transkriptionsfaktors *myelocytomatosis* (MYC) relevant sind (24). AKT kann in dieser Kaskade an einer weiteren Stelle eingreifen. Es kann p21 phosphorylieren

und somit für dessen Retention im Zytoplasma sorgen. Dadurch steht p21 nicht mehr für die Zellzyklus-Progression zur Verfügung (60), da es den Cyclin-D/CDK4/6-Kinasekomplex nicht mehr hemmen kann. Die Apoptose wird durch p53 durch dessen Steigerung der Genexpression von *Bcl-2-associated X protein* (Bax) gefördert, das die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien verstärkt, was die Caspase-Kaskade, die zur Apoptose führt, einleitet (24).

Weitere Substrate von AKT sind die *forkhead box O* (FOXO)-Transkriptionsfaktoren. Deren Phosphorylierung führt zur Inaktivierung (55) und somit zur Herunterregulation von Zielgenen, die in die Induktion von Apoptose, Zellzyklus-Arrest und Wachstumshemmung eingebunden sind (52).

AKT phosphoryliert und inaktiviert außerdem die multifunktionale Serin/Threonin-Proteinkinase Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3), die als erstes Substrat von AKT identifiziert werden konnte (52). Die GSK-3 weist Eigenschaften eines Tumorsuppressors auf und ist für die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors MYC und *induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1* (MCL-1) (61), das als Mitglied der Bcl-2-Familie seine anti-apoptotischen Effekte über Hemmung des mitochondrialen Weges der Caspase-Kaskade zeigt, verantwortlich (54).

Darüber hinaus fördert AKT die Angiogenese, die für die Tumormetastasierung von hoher Relevanz ist (15,54). Hierfür aktiviert AKT die *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS), die Stickstoffmonoxid freisetzt, was zur Stimulation von Vasodilatation, vaskulärem *Remodeling* und Angiogenese führt (54).

AKT kann auch den Stoffwechsel beeinflussen. Dies geschieht durch seine Insulin-abhängige Aktivierung, was die Translokation von Glukosetransporter Typ 4 (GLUT4) in die Zellmembran und somit die Glukoseaufnahme in Insulin-empfindliche Gewebe zur Folge hat. Zusätzlich kann es für die Aktivierung der Glykolyse sorgen, was als wichtiges Ereignis im Tumorstoffwechsel diskutiert wird, da in Tumorzellen vermehrte Glykolyse abläuft. Außerdem inhibiert AKT die Glukoneogenese und die Fettsäureoxidation in Hepatozyten (54).

AKT kann ferner die *inhibitor of κ B kinase α* (IKK α) phosphorylieren und aktivieren (49). IKK α phosphoryliert daraufhin den *inhibitor of κ B α* (I κ B α) und sorgt somit für dessen Ubiquitinierung und Degradation. Dies setzt den *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) von der Bindung durch I κ B α frei (26). NF- κ B kann so als aktiver Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Aktivierung zahlreicher Gene nehmen (54) und vor allem die Transkription einer Reihe von pro-inflammatorischen Proteinen wie IL-2 in Lymphozyten (24). NF- κ B ist jedoch auch ein Transkriptionsfaktor, der in vielen verschiedenen Tumortypen aktiviert ist und zum Beispiel durch seine pro-inflammatorische Wirkungsweise und die Protektion der transformierten Tumorzellen vor Apoptose in die Lungenmetastasierung beim Mammakarzinom involviert ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die TGF- β 1-induzierte Aktivierung von NF- κ B eine EMT einleiten konnte. Hingegen schützte die Inhibition vermehrter NF- κ B-Aktivität vor der Annahme eines

mesenchymalen Phänotyps und der Bildung von Lungenmetastasen (5). Grundsätzlich ist NF- κ B im Säugetier als Dimer aus einer Reihe von fünf möglichen Untereinheiten aufgebaut: p50/p105 (NF- κ B1), p52/p100 (NF- κ B2), c-Rel (*v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homologue*), RelB und p65 (RelA) (26,62). Jedoch ist es typischerweise als Dimer aus p50 und p65 aufgebaut (26) und p65 gilt als repräsentative Untereinheit der NF- κ B-Aktivität (62). Ob eine Aktivierung von AKT allerdings in jedem Fall zu einer Erhöhung der Aktivität von NF- κ B führt, ist noch zu debattieren, da auch Studien wie die von García et al. (2009) existieren, die beschreiben, dass eine Inhibition der PI3K zu einer Förderung der Aktivität von NF- κ B führt (63).

Neben mTORC2 *upstream* von AKT, welches für dessen Phosphorylierung an Ser473 verantwortlich ist (52), existiert noch ein weiterer Proteinkomplex, mTORC1, der aber in der Signalkaskade *downstream* von AKT steht und durch dieses aktiviert wird. mTORC1 spielt eine evolutionär konservierte Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums und gilt als wichtigster Effektor von Zellproliferation (Translationsinitiation und Ribosomenbildung), aber auch von Tumortransformation (49,55). Der Unterschied zwischen den beiden Komplexen besteht durch den Aufbau aus verschiedenen Komponenten. Die Hauptkomponenten von mTORC1 sind mTOR, *lethal with sec thirteen 8* (LST8) und *regulatory associated protein of mTOR* (Raptor). mTORC2 enthält auch mTOR und LST8, aber beinhaltet statt Raptor *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor) und zusätzlich *stress-activated protein kinase interacting protein 1* (Sin1). Rapamycin (Sirolimus) gilt als starker Inhibitor des mTORC1, jedoch nur eine Langzeitbehandlung zeigte auch eine Inhibition von mTORC2 (64). Die Aktivierung von mTORC1 erfolgt über zwei Mechanismen. Zum einen kann AKT direkt den *tuberous sclerosis complex 2* (TSC2) phosphorylieren und damit inaktivieren. Dies hat zur Folge, dass TSC2 nun nicht mehr *ras-homologue-enriched-in-brain* (Rheb) inaktiviert, welches wiederum nun mTOR aktivieren kann. Zum anderen phosphoryliert AKT *proline-rich AKT substrate 40 kilodalton* (PRAS40), welches normalerweise mit mTORC1 assoziiert ist und es unabhängig von TSC2 inhibiert. Diese Phosphorylierung von PRAS40 durch AKT schafft aber eine Bindungsstelle für das Protein 14-3-3. 14-3-3 kann daraufhin PRAS40 von mTORC1 entfernen und so dessen Aktivität freisetzen (55). Das aktivierte/freigesetzte mTORC1 sorgt für die Phosphorylierung insbesondere von zwei Proteinen: einerseits dem *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1* (4E-BP1), was zu dessen Inhibition führt und eine Aktivierung von *eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E) herbeiführt, was die Translation zahlreicher mRNAs einleitet, die zum Beispiel für die oben genannten Cyclin D1 und MYC kodieren; andererseits der S6K1 (54,55), die das ribosomale Protein S6 der 40 S-Untereinheit, sowie den *eukaryotic translation initiation factor 4B* (eIF4B) und die *elongation factor 2 kinase* (eEF2k) phosphoryliert, die in ihrer Funktion ebenfalls die Translation zahlreicher mRNAs initiieren und weiter fördern (65).

Der PI3K/AKT-Signalweg ist einer der häufigsten Signalwege, die bei Tumorzellen vermehrt aktiviert sein können. Dies kann durch Amplifikation oder vermehrte Aktivierung von RTKs, durch Mutation der katalytischen oder regulatorischen Untereinheit von der PI3K, durch Funktionsverlust des Regulators *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) oder durch Amplifikation oder Mutation von AKT geschehen (66). Es zeigte sich, dass transgene Mäuse mit konstitutiv aktivem AKT eine verstärkte Tumorbildung zeigen, wie von Prostatatumoren oder auch multifokalen Mammakarzinomen (56). In den in dieser Arbeit genutzten im Vergleich nur gering invasiven und aggressiven Mammakarzinomzellen MCF-7 (3) ist konstitutiv phosphoryliertes und damit aktives AKT aber nur sehr gering vorhanden (48,67).

Das PIK3CA-Gen ist das am häufigsten mutierte Gen in ER-positivem Brustkrebs und tritt insgesamt in etwa 35 % der Hormonrezeptor-positiven, 20 - 25 % der HER-2/neu-positiven und auch in einem geringeren Anteil der *triple*-negativen Mammakarzinome auf (50).

Aufgrund der oben genannten *downstream*-Effekte von AKT und seiner zentralen Rolle in der Förderung von Tumorzellproliferation und *Survival*, erscheint AKT als naheliegendes therapeutisches Ziel für eine Tumorthherapie (56). Wegen seiner aber auch existenten facettenreichen physiologischen Funktionen und aufgrund seiner Ähnlichkeit zu anderen Kinasen der AGC-Familie, was bei Hemmung von AKT zu relevanten Nebenwirkungen wie Hyperglykämie führen kann, ist eine selektive auf den Tumor bezogene Therapie mit AKT-Inhibitoren schwierig (49,56). Perifosin, ein ATL (siehe unten) (2), ist ein Beispiel für einen AKT-Inhibitor in klinischen Studien, der vermutlich durch die Verhinderung der Assoziation von AKT über seine PH-Domäne an PIP3 an der Zellmembran wirkt (49). Direkte Inhibitoren von mTORC1 wie Rapamycin (Sirolimus), dem nachfolgend entwickelten Temsirolimus (angewandt beim Nierenzellkarzinom) und Everolimus sind bereits vorhanden. Sie zeigen jedoch einen negativen *Feedback*-Mechanismus, sodass es zu einer paradoxen Aktivierung von AKT kommt. Dies dämpft ihre Effektivität als *single agent*-Therapeutikum deutlich ab (50). Auch Inhibitoren der PI3K-Familie sind bereits beschrieben, aber da sie diese nur sehr unspezifisch hemmen und als toxisch gelten, müssen zunächst Inhibitoren entwickelt werden, die beispielsweise genau das Isoenzym p110 α der Klasse IA hemmen (49), das beim Brustkrebs häufig verändert vorliegt (50).

Am wünschenswertesten wäre somit entweder eine therapeutische Wirkung auf den PI3K/AKT-Signalweg mit möglichst spezifischen *single agents*, die direkt auf die Tumorzelle wirken und nur wenig bis gar keinen Einfluss auf den sonstigen Metabolismus anderer Zellen haben. Sinnvoll erscheint auch eine Therapie mit mehreren verschiedenen Ansätzen im Signalweg, die sich, wenn machbar, ergänzen und in der die Einzeldosen der unterschiedlichen Medikamente so gering sein kann, dass eigene unerwünschte Nebeneffekte minimal bleiben (49).

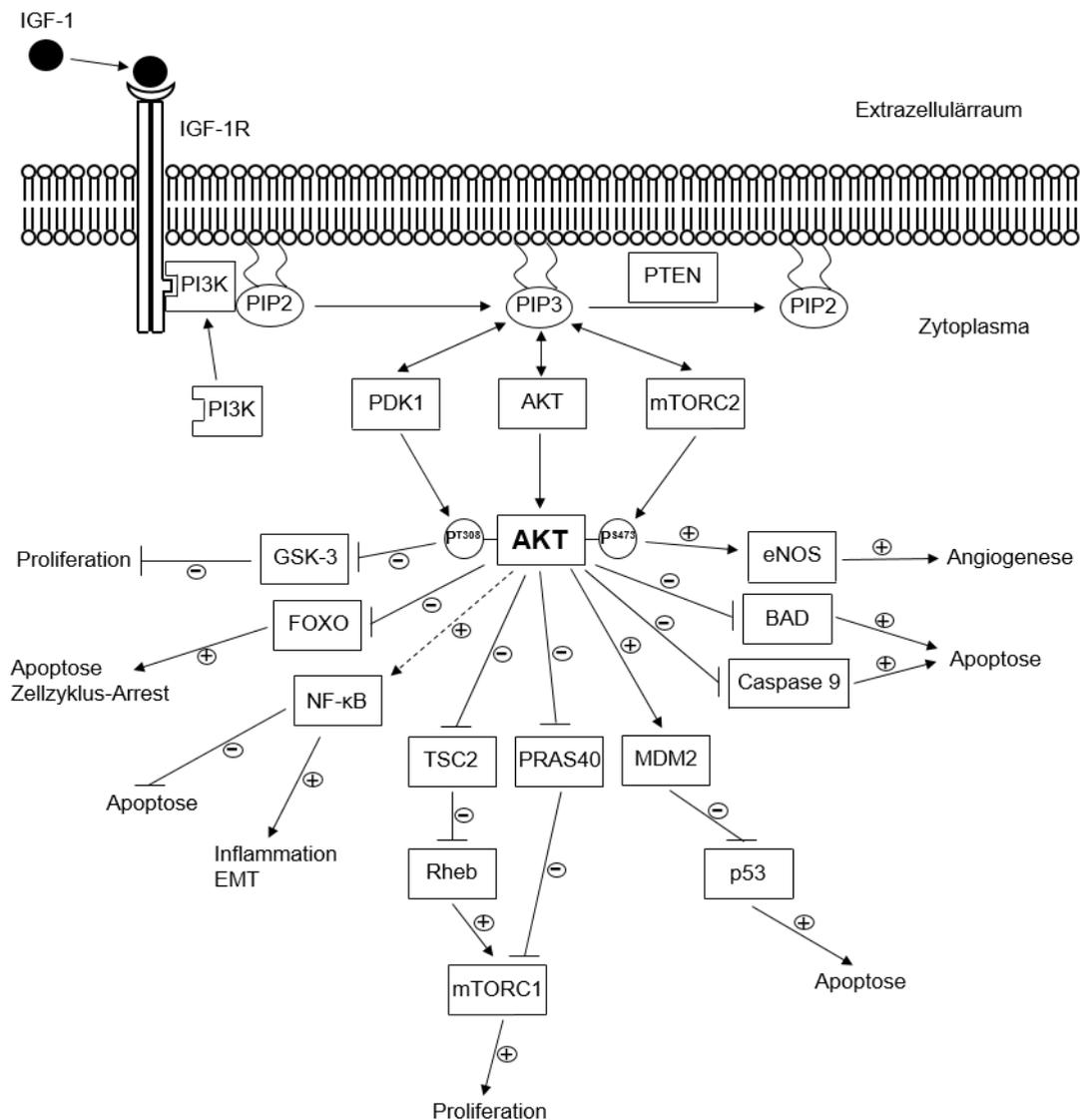


Abbildung 2: Schematischer Ablauf des PI3K/AKT-Signalwegs

Der abgebildete Signalweg beginnt, indem IGF-1 extrazellulär an die RTK IGF-1R bindet (50). Mit seiner regulatorischen Untereinheit bindet daraufhin intrazellulär die PI3K an die RTK, wodurch die katalytische Untereinheit der PI3K freigesetzt wird (51), wonach diese nun das membranständige PIP2 zu PIP3 phosphoryliert. Der Gegenspieler dieser Reaktion, PTEN, kann PIP3 wiederum zu PIP2 dephosphorylieren. Die Serin/Threonin-Kinase AKT kann nun über seine PH-Domäne an PIP3 rekrutiert werden, wo es nun aktiviert werden kann (52). Die Enzyme PDK1 und mTORC2 verfügen beide ebenfalls über eine PH-Domäne, mit der sie ebenso wie AKT an PIP3 binden können (49,57). Die PDK1 sorgt für die, für die Aktivität erforderliche, Phosphorylierung an Thr308, während die mTORC2 AKT an Ser473 phosphoryliert, was für die Aktivierungsverstärkung von AKT notwendig ist. Das nun aktivierte AKT kann zahlreiche Proteine unterschiedlicher Klasse phosphorylieren, was die verschiedensten Auswirkungen auf zelluläre Prozesse hat (52). Die Aktivierung der eNOS führt zu einer Stimulation der Angiogenese (54). Durch Inhibition der proapoptotischen BAD und Caspase 9 kann AKT das survival der Zelle fördern (54,58). MDM2 wird durch AKT aktiviert und sorgt somit vermehrt für den Abbau von p53 (54) und vermindert damit die Apoptosebereitschaft von Zellen (24). AKT fördert über zwei Wege die Aktivierung von mTORC1, dem wichtigsten Effektor von Proliferation und Tumortransformation. Einerseits kann AKT direkt TSC2 inaktivieren, welches somit vermindert Rheb inaktiviert, das wiederum eine fördernde Wirkung auf die Aktivität von mTORC1 hat. Andererseits inhibiert AKT PRAS40, das normalerweise selbst einen hemmenden Einfluss auf mTORC1 hat (55). Eine noch zu debattierende positive Wirkung auf die Aktivierung NF-κB hat AKT ebenfalls (26), was einerseits zu einer vermehrten Tendenz zur Inflammation (24) und EMT der Zelle, aber auch zu einer verminderten Apoptose der Zelle führt (5). Die Phosphorylierung und damit Inaktivierung der FOXO-Transkriptionsfaktoren (55) sorgt für eine verminderte Bereitschaft der Zelle zur Apoptose und Zellzyklus-Arrest. Zuletzt inaktiviert AKT außerdem die GSK-3 (52), welche u. a. den Transkriptionsfaktor MYC inaktiviert (61), was zu einer vermehrten Proliferation der Zelle führen kann (24). Die Darstellung der Abbildung ist orientiert an Abbildungen von Fan und Weiss (2011) (68) und Manning und Toker

(2017) (52).

AKT: Proteinkinase B; BAD: Bcl-2-antagonist-of-cell-death; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; FOXO: forkhead box O; GSK-3: Glykogensynthase-Kinase 3; IGF-1: insulin like growth factor-1; IGF-1R: IGF-1-Rezeptor; MDM2: mouse double minute 2 homologue; mTORC: mammalian target of rapamycin complex; NF- κ B: nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells; PDK1: phosphoinositide-dependent kinase-1; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; PIP3: Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat; PRAS40: proline-rich AKT substrate 40 kilodalton; PTEN: phosphatase and tensin homologue; Rheb: ras-homologue-enriched-in-brain; TSC2: tuberous sclerosis complex 2

1.5 Antitumorlipide

1.5.1 Einteilung, Eigenschaften und wichtige Verbindungen

1.5.1.1 Einteilung und Historie

Die synthetischen ATLS werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: Alkyllysophospholipide (ALPs), deren Prototyp Edelfosin ist und Alkylphosphocholine (APCs), deren Hauptvertreter das Miltefosin darstellt. Die ersten ATLS wurden als Analoga der 2-Lysophosphatidylcholine (LPC) (Abb. 3) als Immunmodulatoren synthetisiert. Jedoch hatten diese Analoga aufgrund ihrer schnellen Metabolisierung durch Acyltransferasen und Lysophospholipasen, ähnlich wie die natürlich vorkommenden LPCs, nur eine kurze Halbwertszeit. Daher wurden strukturelle Veränderungen an den Verbindungen vorgenommen, sodass diese in der Folge nicht mehr so schnell metabolisiert werden konnten (69). Der plättchenaktivierende Faktor (PAF) (Abb. 3) ist ein bioaktives Lipid, welches an der Aggregation von Thrombozyten beteiligt ist, aber auch eine Rolle bei der Anaphylaxie und in diversen Inflammationsprozessen spielt (70). Sein Grundgerüst war die Leitstruktur für die Synthese dieser neuen Wirkstoffgruppe (71). Einige dieser neuen Verbindungen zeigten neben ihren immunmodulatorischen Eigenschaften auch antiproliferative Wirkung, sodass sie auch als mögliche anti-Tumor-Therapeutika weiter untersucht wurden. Zu den ersten Vertretern von den ATLS gehört das oben genannte Edelfosin, welches ein Glycerin-Grundgerüst hat (69), das mit einer 18-C-langen Alkylkette an der *stereospecifically numbered* (sn)-1 Position und einer Methoxy-Gruppe an der sn-2 Position verethert ist. Die Hydroxylgruppe an der sn-3 Position ist mit einem hydrophilen Phosphocholinrest verestert (72). Die Synthese von Edelfosin wurde von Guenter Kny erstmals im Jahr 1969 beschrieben (69) (Abb. 3).

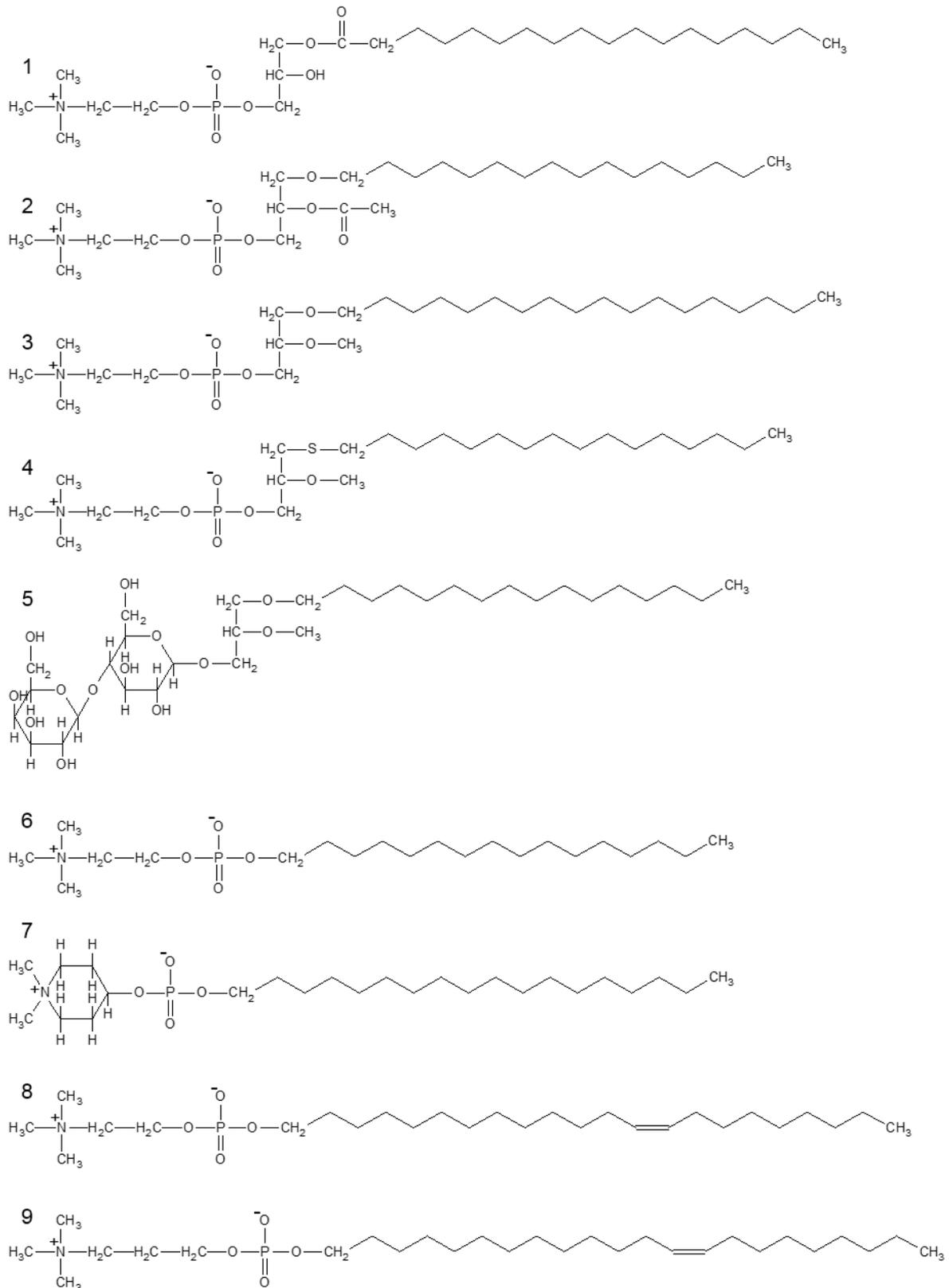


Abbildung 3: Strukturformeln relevanter Vertreter der ATLS und deren Vorläufer

1: Lysophosphatidylcholin (LPC), 2: Plättchenaktivierender Faktor (PAF), 3: Edelfosin, 4: Ilmofosin, 5: Ohmline, 6: Miltefosin, 7: Perifosin, 8: Erucylphosphocholin (ErPC), 9: Erufosin

Darstellung der Strukturformeln angelehnt an Jaffrès et al.(2016) (73), van Blitterswijk und Verheij (2012) (72), Verheij et al. (2014) (74) und Chantôme et al. (2013) (75)

1.5.1.2 Wirkungen von ATLs in verschiedenen Zellsystemen

Einbau in die Zellmembran und der Einfluss auf *Lipid Rafts*

Es zeigte sich, dass ATLs nicht wie verschiedene Chemotherapeutika mit der DNA oder dem Spindelapparat der Zelle interagieren, sondern dass sie, aufgrund ihrer amphiphilen Struktur, über ihre lange apolare Kohlenwasserstoffkette in die Zellmembran inkorporiert werden (73,76,77). Dort können sie eingebettete Proteine beeinflussen (73) und bei hohen Konzentrationen über eine detergensartige Wirkung eine Zellyse hervorrufen (76).

Edelfosin gilt als erstes bekanntes ATL, bei dem seine Interaktion mit den sogenannten *Lipid Rafts* in der Zellmembran gezeigt werden konnte (73). *Lipid Rafts* sind heterogene und hochdynamische kleine Membrandomänen, die stark angereichert sind mit Cholesterol und Sphingolipiden wie das Sphingomyelin. Die Menge an Cholesterol ist hier etwa doppelt so hoch wie in der umgebenden Lipiddoppelschicht und wirkt dabei wie eine Art Kleber, der das *Lipid Raft* zusammenhält. Kleine *Lipid Rafts* können sich durch Zusammenlagerung ihrer Komponenten zu größeren *Raft*-Plattformen weiterbilden, in denen sich Signalproteine ansammeln können (78), aber in ihrer Fähigkeit, frei zu diffundieren, eingeschränkt sind (79). Dies führt zu einer erleichterten Interaktion zwischen Proteinen und somit auch zu einer verbesserten Signaltransduktion (78).

Einfluss auf die Apoptose

Generell wird Apoptose in einer Zelle durch externe oder interne Signale einer Zelle eingeleitet, die zu den beiden möglichen Abläufen des extrinsischen oder intrinsischen Apoptoseweges führen. Diese beiden großen Wege sind dabei abhängig von den Caspasen. Die meisten apoptotischen Signalwege laufen bei der Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 zusammen, welche die für die Reparatur geschädigter DNA relevanten Proteine sowie zytoskelettale Proteine spalten und damit die Apoptose der Zelle einleiten. Die Caspase 3 aktiviert dabei die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1), die die Fragmentierung nukleärer DNA fördert (74).

Der extrinsische Weg wird von außerhalb der Zelle aktiviert, indem spezifische Todesliganden wie TNF- α , *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) oder Fas-Ligand (FasL) an Todesrezeptoren wie den Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ 1 (TNFR1), die Todesrezeptoren (*death receptor*, DR) 4 und 5 und den Fas/*cluster of differentiation* (CD)95-Rezeptor binden, um den sogenannten *death-inducing signaling complex* (DISC) zu bilden, welcher die sequentielle Aktivierung von Caspasen wie den oben genannten Effektor-Caspasen initiiert (74).

Der intrinsische mitochondriale Weg wird durch die Aktivierung von *Bcl-2 homology 3 interacting-domain death agonist* (BID), einem pro-apoptotischen Protein der Bcl-2 Familie, und seiner Translokation zu den Mitochondrien eingeleitet, was die Oligomerisierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und *Bcl-2 homologous antagonist killer* (BAK) induziert. Dies führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium ins Zytosol, das dann mit dem *apoptotic activating factor-1* (Apaf-1), Adenosintriphosphat (ATP) und pro-Caspase 9 das sogenannte Apoptosom bildet. Dieses aktiviert Caspase 9 und die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 (74).

Fas/CD95 gilt als der Prototyp und als das Hauptmitglied der Todesrezeptor-Familie. Sobald sein Ligand FasL an ihn bindet, kommt es zur Rezeptor-Oligomerisierung, zur Aggregation und zur Rekrutierung des Adapterproteins *Fas-associating death domain-containing protein* (FADD) an die zytoplasmatische Todesdomäne (*death domain*, DD) des Rezeptors. Es folgt die Bindung von pro-Caspase 8 an FADD über ihre Todeseffektordomäne (DED, *death effector domain*), was zur Aktivierung der Caspase 8 führt. Damit ist der DISC gebildet, der aus dem Fas/CD95, FADD und Caspase 8 besteht und die Aktivierung der Effektor-Caspasen wie oben beschrieben induziert (78).

Edelfosin akkumuliert wie erwähnt in *Lipid Rafts* und kann zur Translokation und *Clustering* von Fas/CD95 in den *Lipid Rafts* beitragen. Hinzu kommt die Rekrutierung von FADD und pro-Caspase 8 in die *Lipid Rafts*. Dies erlaubt die Bildung des DISC, der nun die Aktivierung des Todesrezeptor-vermittelten Apoptoseweges ermöglicht (73). Es konnte gezeigt werden, dass dies dabei unabhängig von der Bindung des FasL abläuft. Der Fas/CD95-Signalweg kann also von extrazellulär über den FasL oder von intrazellulär durch Edelfosin aktiviert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese von intrazellulär wirkende Aktivität von Edelfosin den Vorteil geringerer Nebenwirkungen hat, da es vornehmlich in Tumorzellen aufgenommen wird (siehe unten) und nicht wie agonistische Antikörper des Fas/CD95 entsprechend von extrazellulär auch an „gesunden“ Zellen wirkt (78).

Edelfosin kann auch direkt mit den Mitochondrien interagieren und über die Erhöhung der mitochondrialen Membranpermeabilität zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führen, was zur Freisetzung von Cytochrom c und der Aktivierung von Caspase 9 führen kann und die Apoptose auslöst. Außerdem zeigte sich in Studien, dass Edelfosin eine Umverteilung von *Lipid Rafts* von der Plasmamembran zum Mitochondrium bewirkt, was eine funktionelle *Lipid Raft*-vermittelte Verbindung zwischen Plasmamembran und Mitochondrium vermuten lässt (77).

Ferner gelang es darzustellen, dass Edelfosin Apoptose in soliden Tumorzellen nach einer Stressantwort des endoplasmatischen Reticulums (ER) induzieren konnte. Das ER ist eine multifunktionale Organelle der Zelle, die unter anderem für Protein- und Lipidbiosynthese und post-translationale Proteinmodifikationen verantwortlich ist, aber auch als Calcium-Speicher

fungiert und sich in der Einflussnahme auf die Apoptoseregulation verantwortlich zeichnet. Grundsätzlich existieren drei Hauptwege der ER-Stress induzierten Apoptose: erstens die Hochregulation des Transkriptionsfaktors *C/EBP homologous protein/growth arrest and DNA damage 153* (CHOP/GADD153) (77), der unter anderem, wenn überexprimiert, zu einer Verminderung des anti-apoptotischen Bcl-2 Proteins und einer Translokation des pro-apoptotischen Bax Proteins vom Zytosol zum Mitochondrium führt (80); zweitens die Aktivierung der *c-Jun NH2-terminal kinase* (JNK) (77), welche durch Phosphorylierungen der Transkriptionsfaktoren p53 und MYC aber auch von anderen nicht-Transkriptionsfaktoren wie Bcl-2 das Apoptose/*Survival*-Verhältnis in Richtung Apoptose verschiebt (81); drittens die Aktivierung der Caspase 4 und somit der Caspase-Kaskade in menschlichen Zellen. Bei Behandlung von soliden Tumorzellen mit Edelfosin kommt es zur Akkumulierung von Edelfosin auch im ER, was zur Inhibition der Proteinsynthese, der Hochregulation von CHOP/GADD153, der Aktivierung von Bax, Caspase 4 und *stress-activated protein kinase* (SAPK)/JNK führt und damit zu einem ER-Stress induzierten-Zelltod (77).

Jedoch scheint der Apoptoseweg über die Mitochondrien letztlich immer für die Wirkung von Edelfosin erforderlich zu sein, da berichtet werden konnte, dass die Überexpression des anti-apoptotischen Bcl-2 die Edelfosin-induzierte Apoptose völlig blockieren konnte (77).

Einfluss auf den Phospholipid-Stoffwechsel

Edelfosin hemmt die Phosphatidylcholin-Synthese durch Inhibition des Schlüsselenzyms des Synthesewegs, der CTP:Phosphocholin-Cytidyltransferase (CCT) (73). Die Biosynthese und das kontinuierliche *Turnover* von Phospholipiden sind sehr wichtig für die Membranintegrität und damit für die Viabilität der Zelle (74). Besonders die konstitutive Synthese von Phosphatidylcholin, das mehr als 50 % der Zellmembranlipide ausmacht und mehr als 30 % des gesamten Lipidanteils in der Zelle, ist besonders bedeutsam bei der Zellproliferation beziehungsweise Zellteilung, bei der die Zelle ihre Phospholipidmasse verdoppeln muss (74,77).

Einfluss auf die Zellmigration

Zu den sich in *Lipid Rafts* befindlichen Proteinen gehören auch Ionenkanäle, insbesondere der *small-conductance calcium-activated potassium channel 3* (SK3)-Kalium-Kanal, der durch seine hohe Calcium-Sensitivität eine große Rolle in den Calcium-abhängigen Signaltransduktionswegen der Zelle spielt (73). Der SK3-Kanal kontrolliert den Calcium-Einstrom in die Zelle und die Tumorzellmigration durch die Interaktion mit dem spannungsabhängigen Calcium-Kanal Orai1. Dabei assoziiert der SK3-Kanal nach Aktivierung von AKT mit Orai1 innerhalb der *Lipid Rafts* und bildet den SK3/Orai1-Komplex (82). Es konnte demonstriert werden, dass Edelfosin über den SK3-Kalium-Kanal Krebszellmigration und Metastasierung in

Melanomzellen (MDA-MB-435, in der entsprechenden Veröffentlichung von Potier et al. (2011) als Mammakarzinomzellen deklariert, nach neueren Erkenntnissen jedoch Zellen eines Melanoms (83)) reduzieren konnte, die Migration von nicht-kanzerösen normalen Brustepithelzellen (MCF-10A), die den SK3 nicht exprimieren, jedoch nicht (84). Ferner konnte Ohmling, eine dem Edelfosin ähnliche Verbindung mit einem Glycerin-Grundgerüst, jedoch mit einer kürzeren 16-C Kette und einem Lactose-Molekül anstelle des Phosphocholins an der sn3-Position, durch Hemmung der AKT-Phosphorylierung und Dissoziation des SK3/Orai1-Komplexes im *Lipid Raft* die Migrationsfähigkeit von Kolonkarzinomzellen vermindern (82,85). Die Studie von Slaton et al. (1994) stützt die Hypothese, dass Edelfosin die Invasion und Migration von Tumorzellen vermindern kann. Hier konnte gezeigt werden, dass Edelfosin die gerichtete Migration von humanen Urothelkarzinomzellen über eine Membran mit Mikroporen vermindern konnte (86).

Im Gegensatz dazu steht die Studie von Steelant et al. (2001). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Edelfosin die Funktionen des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin in MCF-7-Zellen hemmt und damit eine Aussaat und Metastasierung der Zellen erleichtern müsste (87). Ähnliches wurde von van Slambrouck und Steelant (2007) publiziert, deren Studie zeigte, dass Edelfosin bei MCF-7-Zellen für eine vermehrte Ansammlung von Monosialyl-Globopentaosylceramid (MSGb5) in der Zellmembran sorgte. MSGb5 gehört zu den Glykosphingolipiden (GSL), die als tumorassoziierte Antigene identifiziert und häufig in malignen Zellen gefunden werden. Diese GSLs können sich in Zellmembranen mit Membranproteinen und anderen Signalgebern zusammenlagern und *GSL-enriched microdomains* (GEMs) bilden, deren Signaltransduktion die Tumorzellinvasion fördert. Van Slambrouck und Steelant (2007) konnten nachweisen, dass es bei Behandlung von MCF-7-Zellen mit Edelfosin zur Aktivierung der MSGb5-assoziierten fokalen Adhäsionskinase (FAK) und *c-Src* (*cellular sarcoma*, auch nur Src genannt) in GEMs führt, was letztlich zu einer Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) und zur vermehrten Expression von MMPs sorgte und die invasiven Eigenschaften der MCF-7-Zellen somit erhöhte (88).

Eine einheitliche aussagekräftige Studienlage zur Auswirkung von Edelfosin entweder pro oder kontra Migration beziehungsweise Invasion von Krebszellen besteht damit derzeit noch nicht.

Einfluss auf die Signalwege PI3K/AKT, MAPK/ERK und SAPK/JNK

Für Edelfosin, Perifosin und Miltefosin konnte nachgewiesen werden, dass sie in den Karzinomzelllinien A431 und HeLa den PI3K/AKT-Signalweg unterdrücken können (89). Auch hier könnten die *Lipid Rafts* eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs spielen, indem sie prinzipiell die AKT-Rekrutierung an der Plasmamembran und dessen Aktivierung erleichtern. Studien zeigten nun, dass Edelfosin die PI3K/AKT-Signaltransduktion von den *Lipid Rafts* entkoppelt, wodurch die regelhafte Aktivierung des Signalwegs verhindert werden

konnte. Es konnte außerdem berichtet werden, dass Edelfosin in T-Zell-Leukämie-Zelllinien durch die Inhibition der PI3K/AKT-Signaltransduktion zu einer Translokation von Fas/CD95-Rezeptoren in *Lipid Rafts* und damit zur Induktion des von ihnen vermittelten apoptotischen Signals führte (78). Auch Studien mit Perifosin zeigten eine verminderte Lokalisierung von AKT an der Plasmamembran unter dessen Anwesenheit, allerdings konnte eine direkte Inhibition der Aktivität der PI3K, PDK1 oder AKT durch Perifosin nicht nachgewiesen werden. Daher erschien es den Autoren schlüssig, dass ATLs die Aktivierung von AKT möglicherweise durch Störung der Interaktion von AKT mit den *Lipid Rafts* beziehungsweise mit seiner Andockungsmöglichkeit PIP3 über die PH-Domäne verhindern (77,78).

Darüber hinaus verhindern ATLs die Aktivierung des *Survival*-fördernden MAPK/ERK-Signalwegs und fördern die Aktivierung des pro-apoptotischen SAPK/JNK-Signalwegs (89).

Für die pro-apoptotische Wirkung sorgt die SAPK/JNK durch Phosphorylierungen unter anderem der Transkriptionsfaktoren p53 und MYC, aber auch von anderen nicht-Transkriptionsfaktoren wie Bcl-2 (81). Normalerweise wird dieser Signalweg dabei durch Stress-Signale wie inflammatorische Zytokine, Umgebungsfaktoren, Chemotherapeutika oder ionisierende Strahlung aktiviert (72). Ruiter et al. (2003) wiesen in Zellen einer epidermoiden Karzinomzelllinie (A431) die Aktivierung des SAPK/JNK-Signalwegs in einem Immunkomplex-Kinase-Assay durch Edelfosin gegenüber unbehandelten Zellen nach (89).

Der MAPK/ERK Signalweg wird physiologisch durch Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel IGF-1, induziert (46). Die resultierenden Phosphorylierungsprozesse und damit die Aktivierung von ERK enden in der Aktivierung zahlreicher Substrate, die für die Stimulation der Zellproliferation beziehungsweise des *Survivals* der Zelle sorgen. Die Substrate von ERK inkludieren die zytoplasmatischen Proteine S6K und GSK-3. Im Nukleus werden die *carbamoyl phosphate synthetase II* (CPS II), die für DNA-Baustein-Synthese zuständig ist, und die *p90ribosomal S6 kinase* (p90RSK), die die Zellzyklusprogression vorantreibt, aktiviert (90). Edelfosin kann in diesem Signalweg die Translokation von *rapidly accelerated fibrosarcoma 1* (Raf-1) zur Membran und damit dessen Interaktion mit *rat sarcoma* (Ras) verhindern und somit die Aktivierung von ERK stören (76).

Das untermauert die Hypothese, dass ATLs auch Apoptose induzieren, indem sie für eine Verschiebung der Balance hin zu pro-apoptotischer Signaltransduktion (SAPK/JNK) und weg von anti-apoptotischer Signaltransduktion (PI3K/AKT beziehungsweise MAPK/ERK) sorgen (89).

Selektivität gegenüber Tumorzellen und anderen schnell proliferierenden Zellen

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Edelfosin sehr selektiv Tumorzellen beeinflusst ohne von normalen ruhenden Zellen aufgenommen zu werden (78). Dies gilt für ein weites Feld an Tumorentitäten, wie das Multiple Myelom, das Mantelzelllymphom, die chronisch lymphatische

Leukämie, das Ewing-Sarkom, das Pankreaskarzinom und die Gliome (73). Warum Edelfosin besonders von Tumorzellen aufgenommen wird, aber weniger von nicht-transformierten Zellen, ist noch weitgehend ungeklärt. Da die *Lipid Rafts* relevant für dessen Aufnahme in die Zelle sind, wird ein Protein in den *Lipid Rafts* vermutet, das für die selektive Aufnahme von Edelfosin verantwortlich ist (78). Snyder und Wood (1968, 1969) berichteten, dass in Tumorzellen ein 1-O-Alkyl-Spaltungsenzym vermindert vorhanden ist, welches ATLS in nicht-Tumorzellen metabolisieren kann (86,91,92). Jedoch handelt es sich hierbei um ein Alkylether-Spaltungsenzym, eine „Etherase“, wie Snyder und Wood (1969) es nennen (92). Somit bleibt unklar, wie auch die anderen ATLS, die im Gegensatz zum Beispiel zu Edelfosin keine Etherbindungen enthalten, in Tumorzellen ihre Wirkung entfalten können, in nicht-Tumorzellen aber nicht. Nicht alle Tumorzellen sind vergleichbar sensitiv in Bezug auf die Toxizität der ATLS. Die ermittelten mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) variieren zwischen 0,2 μ M und 20 μ M, abhängig von der Zelllinie und dem ATL. Woher diese starken Unterschiede stammen, ist noch nicht ganz klar, aber vermutlich hängen sie auch von der Art der Aufnahme in die Tumorzelle ab. In leukämischen Zellen erfolgt die Aufnahme präferentiell über die *Lipid Rafts* mit nachfolgender Endozytose, während die meisten Karzinomzellen ATLS in erster Linie über transmembranöse Phospholipid-Flippase-Komplexe aufnehmen. Neben der Auswirkung auf Tumorzellen können ATLS aber auch auf schnell proliferierende Gewebe wie die gastrointestinale Mukosa wirken. Dies erklärt die typischen in klinischen Phase I und II Studien bei ATL-Gabe ermittelten Nebenwirkungen durch gastrointestinale Toxizität mit Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö (74).

Ergänzende Wirkungen mit Radio- und Chemotherapie

ATLS und klassische konventionelle Therapien wirken an verschiedenen Punkten in der Tumorzelle. Während die klassischen Chemotherapeutika an der DNA, dem Zytoskelett oder dem Spindelapparat wirksam sind, interferieren die ATLS mit zahlreichen Signaltransduktionsketten, die die Zellmembran involvieren. Somit können sich diese Wirkungen an unterschiedlichen Orten ergänzen (51,93). Viele verschiedene Berichte konnten zeigen, dass es zu einer Verstärkung der zytotoxischen Eigenschaften von Edelfosin kam, wenn es mit anderen Chemotherapeutika wie Vincristin oder Gemcitabin bei bestimmten Tumorerkrankungen kombiniert wurde (73). Zusätzlich konnten Studien belegen, dass ATLS in präklinischen Modellen den zytotoxischen Effekt von Strahlentherapie erhöhen. ATLS stellen somit eine potentielle wichtige Ergänzung in der Kombinationstherapie mit Chemo- und/oder Strahlentherapie dar (74).

1.5.1.3 Gut untersuchte Antitumorlipide

Edelfosin

Das bereits genannte und vor etwa 50 Jahren erstmals beschriebene und gut erforschte Edelfosin (Abb. 3), ist der Hauptvertreter der ALPs (69). Die antitumorigene Wirkung von Edelfosin wurde schon in einer Reihe von klinischen Studien, wie beim NSCLC, untersucht. Es konnte jedoch bislang keine Verbesserung über die konventionelle Therapie hinaus ermittelt werden, weswegen es als Krebsmedikament nicht weiterverfolgt wurde (94). Dies liegt vermutlich auch an den in den klinischen Studien gezeigten Nebenwirkungen wie der Dosis-abhängigen hämolytischen Toxizität nach intravenöser Gabe, einer schlechten oralen Bioverfügbarkeit und der gastrointestinalen Toxizität bei oraler Gabe (95).

Miltefosin

Der schnelle Metabolismus des Edelfosins galt als sein wesentlicher limitierender Faktor. So wurde in den späten 80ern eine neue Substanz, das Miltefosin (Abb. 3), synthetisiert, eine Verbindung, der das Glycerin-Gerüst fehlt und die eine 16-C lange Alkylkette konjugiert mit dem Phosphocholinkopf enthält, was zur Bildung einer neuen Familie von ATLs führte, den APCs (72–74). Miltefosin wies gute gegen Tumore gerichtete Eigenschaften in vitro auf und zeigte in einigen Tumormodellen eine verbesserte Stabilität. Es konnte aufgrund seines hämolytischen Effekts jedoch nicht intravenös appliziert werden, sondern nur oral oder topisch gegeben werden. Seine gastrointestinale Toxizität und seine fehlende Wirkung am Patienten beispielsweise bei fortgeschrittenen Sarkomen, metastasierenden Kolonkarzinomen oder Plattenepithelkarzinomen verhinderte die weitere Anwendung als orales Tumorthapeutikum in klinischen Studien (72,94). Als topisches palliatives Medikament für kutane Metastasen beim Mammakarzinom und als orales Medikament für die Behandlung der viszeralen Leishmaniose zeigten sich jedoch sehr gute Ergebnisse. Daher ist es für diese Indikationen in der Klinik zugelassen (73).

Perifosin

In den 90er Jahren wurde das dem Miltefosin sehr ähnliche Perifosin (Abb. 3) mit der Absicht synthetisiert, die therapeutische anti-Tumor-Potenz weiter zu verstärken und Nebenwirkungen zu vermindern (73,94). Dies sollte durch den Ersatz des Cholin-Restes von Miltefosin durch eine heterozyklische Piperidin-Gruppe erreicht werden. Ferner trägt es mit 18-C eine etwas längere Kohlenstoffkette als Miltefosin. Es wird vermutet, dass die Hauptwirkung von Perifosin ist, über die PH-Domäne von AKT dessen Translokation zur Plasmamembran und somit die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs zu verhindern. Es wurde bereits in zahlreichen klinischen Studien

getestet, wobei die orale Gabe von Perifosin hierbei von den Patienten gut vertragen wurde. Gastrointestinale Toxizität und Fatigue waren hierbei die häufigsten Nebenwirkungen. Perifosin konnte jedoch in diesen Studien keine ausreichend signifikante Wirkung gegen eine Anzahl von unterschiedlichen Tumorentitäten erzielen. Durch sein positives Sicherheits- und Toleranzprofil zusammen mit der verstärkenden Wirkung in Kombination mit anderen Therapeutika und Strahlentherapie in vitro sowie präklinischen Ergebnissen erscheinen weitere klinische Studien dennoch gerechtfertigt (73). Es gilt als das bisher am besten untersuchte und erfolgreichste ATL in der Kombinationstherapie (72).

Erucylphosphocholin und Erufosin

Zu den neuesten Derivaten der synthetischen ATLs gehören das Erucylphosphocholin (ErPC) und das Erufosin (Abb. 3), die als Verbindungen nur kleine Veränderungen zu der Struktur von Miltefosin aufweisen und damit zur Gruppe der APC gehören. Statt der 16-C Kette des Miltefosins besitzen die beiden Verbindungen eine 22-C Kette sowie eine ω -9-cis-Doppelbindung. Erufosin unterscheidet sich von ErPC durch eine zusätzliche Methylen-Gruppe am polaren Phosphocholinkopf. Durch ihren verstärkten hydrophoben Charakter besitzen beide Verbindungen eine verminderte hämolytische Aktivität. Somit können diese neuen Verbindungen intravenös appliziert werden und damit die gleiche Wirkung wie bei oraler Gabe nur bei bis zu fünfmal geringerer Dosis entfalten (73). Hierdurch ergeben sich verminderte gastrointestinale Nebenwirkungen und eine geringere Knochenmarkstoxizität (73,94). Beide Verbindungen können die Blut-Hirn-Schranke überwinden und im Gehirn akkumulieren. Das macht sie zu vielversprechenden Therapeutika bei der Behandlung von Hirntumoren (73).

Die Möglichkeit der oralen Gabe von Edelfosin und anderen ATLs und ihr auch hydrophiler Charakter haben im Gegensatz zur gerade dargestellten vorteilhaften intravenösen Gabe bei ErPC und Erufosin aber natürlich auch Vorzüge. Die orale Behandlung ist sicherer, effizienter und klinisch einfacher durchzuführen, ohne dass der Patient zur parenteralen Behandlung wie bei anderen Chemotherapeutika im Krankenhaus oder ambulant erscheinen muss (73).

1.5.2 Inositol-C2-PAF

1.5.2.1 Aufbau und Historie

Im Hinblick darauf, weitere Verbindungen der Familie der ATLs zu finden, die eine hohe antiproliferative Wirkung bei geringen Nebenwirkungen besitzen, wurden weitere neue Substanzen synthetisiert (96), die Monosaccharide oder Monosaccharid-ähnliche Verbindungen

an der sn-2 Position des Glycerol-Gerüsts von Phospholipiden enthalten und als sogenannte glykosidierte Phospholipide bezeichnet wurden. Der leitende Gedanke war, dass eine erhöhte Wasserlöslichkeit durch Verbesserung der hydrophilen Eigenschaften der Stoffe erreicht wird, ohne ihre Lipophilie, hervorgerufen durch die Fettsäure in dem Molekül, und damit ihre Fähigkeit, sich in Membranen einzubauen, zu verlieren (2).

Hierbei wurde zunächst α -D-Glucose bei Phosphatidylcholin und bei PAF eingeführt, was zu den Verbindungen 2-Glucophosphatidylcholin (Glc-PC) und 1-O-Octadecyl-2-O- α -D-Glucopyranosyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin (Glc-PAF) führte (Abb. 4). Beide Analoga hatten anti-proliferative Wirkungen bei den beiden immortalisierten Zelllinien HaCaT (Keratinozyten) und Jurkat (T-Zell-Leukämie-Zellen). Daraufhin wurde eine Reihe von weiteren glykosidierten Phospholipiden, angelehnt an die Struktur von Glc-PAF, synthetisiert. Dazu gehören zum Beispiel das in seiner Alkylkette gekürzte C-16-Glc-PAF, die an der sn-2 Position veränderten Glucosimid-PAF und Glucosamin-PAF, sowie das Glc-C2-PAF mit einer Ether-C2-Verbindung zwischen Glucose und Glycerol-Gerüst (2) (Abb. 4).

Bei dem in dieser Arbeit vorgestellten Inositol-C2-PAF (Abb. 4), das anstelle von α -D-Glucose, wie beim Glc-PAF, an der sn-2 Position des Glycerol-Gerüsts von PAF C2-Inositol beinhaltet, handelt es sich um zwei Diastereomere, die im Verhältnis von 1:1 vorliegen (96). Inositol ist, trotz seines der Glukose gleichenden Strukturformel $C_6H_{12}O_6$, kein Kohlenhydrat, sondern ein Zuckeralkohol (24). Strukturell wird Inositol-C2-PAF als 1-O-Octadecyl-2-O-(2-(1-myo-Inosityl)-Ethyl)-sn-Glycero-3-(R/S)-Phosphatidylcholin beziehungsweise 1-O-Octadecyl-2-O-(2-(3-myo-Inosityl)-Ethyl)-sn-Glycero-3-(R/S)-Phosphatidylcholin bezeichnet. Es enthält an der sn-1 Position des Glycerol-Gerüsts eine Ether-verbundene 18-C lange Kohlenstoffkette, an der sn-2 Position einen Ether-verbundenen C2-Inositol-Rest und Phosphatidylcholin an der sn-3 Position. Synthetisiert wird es aus (S)-Glycerol-1-Octadecylether, welches sich aus einem fünfstufigen Weg aus L-Ascorbinsäure ableiten lässt (96).

In bisherigen Untersuchungen hat sich herausgestellt, dass es sich bei Inositol-C2-PAF und Glc-PAF um die bisher effektivsten glykosidierten Phospholipide handelt (2). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF eine höhere Potenz in der Inhibition der Zellproliferation bei Keratinozyten (HaCaT) hat als sein Glucose enthaltendes Analogon Glc-PAF oder Miltefosin. Außerdem wirkt es weniger zytotoxisch als Glc-PAF, während es eine vergleichbare Zytotoxizität wie Miltefosin und Glc-PC aufweist. Seine verbesserte Wirkweise in Relation zu den anderen Glucose enthaltenden Phospholipiden könnte auf seine erhöhte metabolische Stabilität zurückzuführen sein, die durch die Ether-Bindung des C2-Inositols mit dem Glycerol-Gerüst bedingt sein könnte. Die Acetal-Verbindungen anderer Glucose enthaltender Phospholipide können zwischen der Glucose und dem Glycerol von endogenen Glucosidasen gespalten und

abgebaut werden (96).

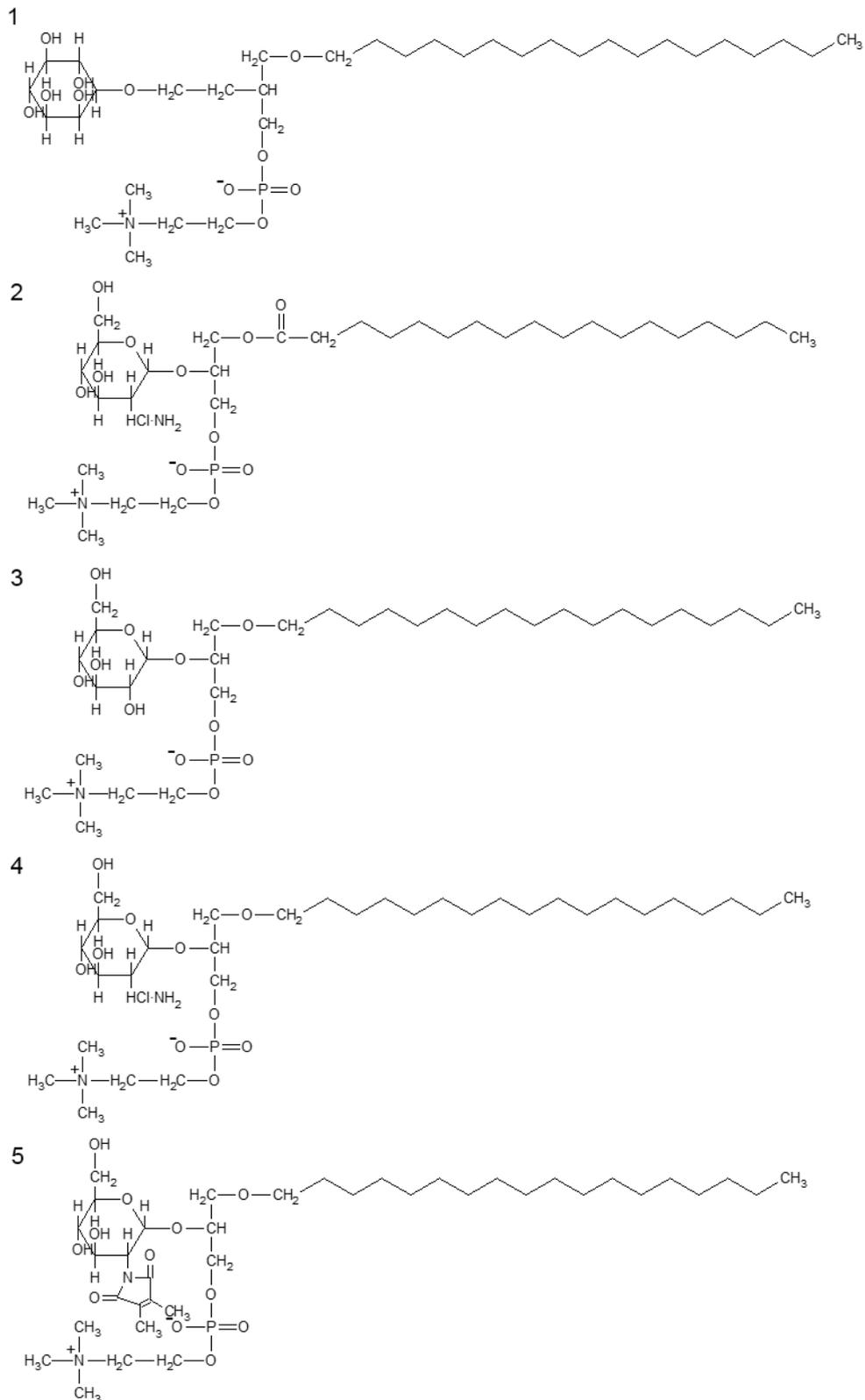


Abbildung 4: Strukturformeln relevanter Vertreter der glykosidierten Phospholipide

1: Inositol-C2-PAF, 2: Glc-PC, 3: Glc-PAF, 4: Glucosamin-PAF, 5: Glucosimid-PAF
 Glc-PAF: 1-O-Octadecyl-2-O- α -D-Glucopyranosyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylcholin,
 Glc-PC: 2-Glucophosphatidylcholin, PAF: Plättchenaktivierender Faktor

Darstellung der Strukturformeln angelehnt an Bartolmäs et al. (2005) (71), Danker et al. (2010) (76) und Semini et al. (2011) (97).

1.5.2.2 Eigenschaften und Funktionen

Einfluss auf die Apoptose

Aufgrund seiner Struktur besteht wie bei anderen ATLS auch bei Inositol-C2-PAF die Hypothese, dass es in die Zellmembran eingebaut wird und von dort seine Wirkung entfaltet (96). Eine detergensartige Wirkung ähnlich wie bei Edelfosin bei hohen Konzentrationen, die zur Zellyse führt, besteht auch bei den glykosidierten Phospholipiden (76). Es konnte bislang aber nicht gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF oder Glc-PAF eine *Lipid Raft*-abhängige Apoptose wie Edelfosin einleiten. Inositol-C2-PAF und Glc-PAF aktivierten die Apoptose in Jurkat- und BJAB-Zellen durch die Bildung eines atypischen DISC via Induktion von FADD und Caspase-8. Dies geschah unter Umgehung des Todesrezeptors Fas/CD95 im Gegensatz zum oben beschriebenen Edelfosin (2). In FADD- und Caspase-8-negativen Zellen, die mit Inositol-C2-PAF inkubiert wurden, konnte die Einleitung einer Apoptose mit dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, gefolgt von der Freisetzung von Cytochrom c, die Aktivierung der Caspasen und die Fragmentierung der DNA zwar gehemmt werden. Jedoch konnte ein Fehlen von FADD und Caspase-8 der Zellen diese nicht vollständig vor der durch Inositol-C2-PAF induzierten Apoptose schützen. Daher scheinen andere Proteine in diesem Prozess zusätzlich eine Rolle zu spielen (98). Insgesamt zeigt dies auch zumindest eine gewisse Diskrepanz in der Wirkungsweise von glykosidierten Phospholipiden und anderen ATLS, die noch weiter zu untersuchen ist (2).

Auch die vermehrte Expression von Bcl-2 am ER oder an den Mitochondrien konnte die durch Inositol-C2-PAF induzierte Apoptose mit Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, der Cytochrom c-Freisetzung, Caspase-Aktivierung und DNA-Fragmentierung inhibieren. Dies zeigt die Bedeutung von ER und Mitochondrien bei der durch Inositol-C2-PAF ausgelösten Apoptose-Signaltransduktion, was mit den oben genannten Eigenschaften anderer ATLS in Einklang steht (2).

Einfluss auf die Zellmigration

Die nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (nRTK) FAK und c-Src sind akzeptierte Schlüsselspieler der Zellmigration (99). Kommt es zur Stimulation von Integrinen, Adhäsionsrezeptoren, die für die Verbindung der Zelle mit der EZM sorgen und darüber Aktinfilamente der Zelle über Adapter-Proteine mit Adhäsionsproteinen der EZM verbinden, wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt (10), in der es zunächst zur Autophosphorylierung von FAK und in der Folge auch von c-Src

kommt. Eine Deregulation und verstärkte Aktivierung von FAK und c-Src, wie es bei Krebszellen vorkommt, kann zu abnormal erhöhter Aktivierung von Mitgliedern der Familie der *ras homologue* (Rho)-Guanosintriphosphat (GTP)asen führen, die wohlbekannte Regulatoren der Zellmigration sind und bei Tumorzellinvasion und Metastasierung eine Rolle spielen (99).

Obwohl alle glykosidierten Phospholipide die Zellbindung von Integrin $\beta 1$ an seine Liganden Kollagen IV, Laminin-111 und Fibronectin erhöhen, werden die nachfolgenden Integrin-Signalkaskaden über FAK/c-Src trotzdem abgeschwächt (76). Die Transfektion von konstitutiv-aktiven Varianten von FAK und c-Src konnte den inhibitorischen Effekt von Inositol-C2-PAF auf die Migration außerdem zumindest teilweise umgehen (100). Eine Studie zur haptotaktischen Migration von Keratinozyten über einen Kollagen IV-Gradienten zeigte, dass Inositol-C2-PAF und Glc-PAF die Zellmigration stark reduzieren konnte. Ähnliche Ergebnisse konnten in vitro mit Wundheilungsassays erzielt werden. Die Phosphorylierung von Tyr397 von FAK und Tyr418 von c-Src an den fokalen Kontakten wird dabei durch Inositol-C2-PAF inhibiert (2).

Einfluss auf Differenzierung und Genexpression

Inositol-C2-PAF hat darüber hinaus einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von Keratinozyten (HaCaT). Dies konnte durch erhöhte Expression des terminalen Differenzierungsmarkers Involukrin und durch erhöhte Aktivität der Transglutaminase, einem Marker später Differenzierungsstadien, unter Einfluss von Inositol-C2-PAF gegenüber unbehandelten Zellen gezeigt werden (2).

Außerdem wurde der Einfluss von Inositol-C2-PAF, Edelfosin und Glc-PAF auf die Genexpression bei HaCaT Zellen verglichen (97). Es konnte nachgewiesen werden, dass Inositol-C2-PAF nach 24 h die Transkription 592 verschiedener Gene signifikant veränderte. Edelfosin beeinflusste 250 und Glc-PAF nur 132 Gene. Dabei wurde insgesamt die Transkription der meisten Gene hochreguliert. Zu den hochregulierten Genen durch Inositol-C2-PAF gehören solche, die die Lipidbiosynthese und den Metabolismus betreffen. Die anti-inflammatorische Aktivität von Inositol-C2-PAF konnte dabei unter anderem durch die Herunterregulierung der Gene mehrerer Mitglieder der Familie der *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II-Moleküle gezeigt werden (2), welche normalerweise an der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen exprimiert werden und bei der Antigen-Präsentation die zentrale Rolle spielen. Unter Inflammationsbedingungen oder nach Inkubation mit pro-inflammatorischen Zytokinen exprimieren auch Keratinozyten MHC Klasse II-Proteine. Diese vermehrte Expression auf Keratinozyten ist Kennzeichen von Erkrankungen wie Psoriasis, allergischer Kontaktdermatitis und atopischer Dermatitis (101). Ferner regulierte Inositol-C2-PAF auch die Expression der Gene von MMPs (MMP1, MMP7, MMP10 und MMP12) herunter. Die Inhibition von MMP1 kann sogar zur kompletten Bewegungsunfähigkeit von Keratinozyten führen (97). Während auch bei Glc-PAF

eine positive Regulation von Genen gezeigt werden konnten, die in Lipidbiosynthese und Metabolismus eine Rolle spielen, wurden durch Edelfosin solche Gene beeinflusst, die in Zelldifferenzierung, Zellentwicklung und der Migration und Invasion der Zellen von Bedeutung sind (2,97). Die von Edelfosin und Glc-PAF regulierten Gene betreffen zudem die Metallionen-Homöostase sowie die Systementwicklung der Zelle. Bedeutsam war bei dieser Genexpressionsanalyse, dass Gene, die die Zellproliferation betreffen, nicht signifikant durch die ATLS reguliert wurden. Das bedeutet, dass ATLS Signalwege der Zellproliferation vermutlich durch andere Mechanismen beeinflussen (2).

Einfluss im Tiermodell

Die anti-inflammatorische Wirkung von Inositol-C2-PAF, die sich durch die Genexpressionsanalyse vermuten ließ, konnte im Tiermodell bestätigt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die chronisch inflammatorischen Hautveränderungen bei zwei unterschiedlichen Mausmodellen für Psoriasis verringert wurde. Dabei wurden Arbeitskonzentrationen von 30 mg/kg Körpergewicht genutzt. Dieser Effekt ist wahrscheinlich nicht nur auf die bei Inositol-C2-PAF nachgewiesene Hemmung der Keratinozytenproliferation zurückzuführen, sondern auch auf die Hemmung der Leukozytenrekrutierung an den Ort der Entzündung, die auf der Hemmung von Rollen und Adhäsion der *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) an die Endothelzellen beruht (102).

Zellselektivität

Auch für Inositol-C2-PAF wurde, wie bei den anderen ATLS auch, eine gewisse Zellselektivität festgestellt. So konnte Inositol-C2-PAF seine selektiv zytotoxische Wirkungen bei schnell proliferierenden Keratinozyten zeigen, wobei Fibroblasten und periphere Blutmonozyten unbeeinflusst blieben (2). Eine Begründung der Zellselektivität könnten die Ether-Bindungen im Inositol-C2-PAF und das Vorhandensein einer „Etherase“ in bestimmten Zellen sein (siehe oben) (91,92,96). Auch wurde vermutet, dass ATLS, aufgrund ihres nur geringen Unterschiedes zu PAF, an den G-Protein gekoppelten PAF-Rezeptor binden können. Jedoch verursacht Edelfosin eine Thrombozytenaggregation nur in sehr geringem Maße und zeigt seine Wirkung über die bereits erwähnten unspezifischen Mechanismen. Bisherige Untersuchungen mit Inositol-C2-PAF wiesen bislang nicht auf die Stimulation von PAF-Rezeptoren hin (76).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Die beschriebenen Wirkungen von Inositol-C2-PAF sind bereits bei verschiedenen Zelltypen

getestet worden, sowohl auf nicht transformierten Zellen wie Fibroblasten und Monozyten als auch auf immortalisierten Zellen wie HaCaT (Keratinocyten) und Jurkat (T-Lymphocyten) sowie auf Tumorzellen des hämatopoietischen Systems (BJAB, Zellen eines Burkitt-Lymphoms) (2). Dabei wurden die Auswirkungen von Inositol-C2-PAF auf Zellmigration und Zellproliferation sowie Apoptoseregulation auf zellulärer Ebene und auch teilweise auf molekularer Ebene unter anderem auch in einer Genexpressionsanalyse betrachtet (2,76,97,98).

Diese Arbeit zielt nun darauf ab, in einer soliden Tumorform, dem Mammakarzinom an dem Beispiel von MCF-7-Zellen, die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf zellulärer und molekularer Ebene weiter zu erforschen. Dazu sollte zunächst in einem Zellviabilitätsassay die Arbeitskonzentration von Inositol-C2-PAF bei diesen Zellen bestimmt werden, um die weiteren Versuche durchzuführen zu können. Durch den Einsatz verschiedener Stimulatoren, den Zytokinen CCL2 (17,30) und IL-6 (27) sowie dem Wachstumsfaktor IGF-1 (6,46–48) sollten die vergleichsweise weniger stark invasiven und aggressiv wachsenden MCF-7-Zellen (3) zu einer verstärkten Proliferation (27) und Migration (17,27,30), wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde, gebracht werden. Der Einfluss und die Stärke der Wirkung von Inositol-C2-PAF sollte sodann durch verschiedene Assays auf zellulärer Ebene, wie Wundheilungsassays, haptotaktischen Migrationsassays und Proliferationsassays, als auch auf molekularer Ebene mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Der IL-6/STAT3-Signalweg sowie der IGF-1/PI3K/AKT-Signalweg erschienen dabei als Möglichkeiten der Wirkorte von Inositol-C2-PAF auf molekularer Ebene als naheliegend und vielversprechend. Zum einen, da unbehandelte MCF-7-Zellen keine oder keine starken Aktivierungen durch Phosphorylierung von STAT3 (40,41) oder AKT (48,67) zeigen und somit nach Stimulation durch das Zytokin oder den Wachstumsfaktor das Ausmaß der Wirkung von Inositol-C2-PAF gezeigt werden kann. Zum anderen, da andere ATLS wie Perifosin bereits ihre negativ regulierenden Auswirkungen auf den PI3K/AKT-Signalweg demonstrieren konnten (73). Auch der IL-6/STAT3-Signalweg könnte aufgrund der Phosphorylierung von STAT3 in Rezeptornähe und damit Membrannähe (36) ein mögliches Ziel von Inositol-C2-PAF sein, da es aufgrund seiner Struktur wahrscheinlich in die Zellmembran eingebaut wird (96).

Da die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten, dass der hemmende Effekt von Inositol-C2-PAF auf den PI3K/AKT-Signalweg stärker war als auf den IL-6/STAT3-Signalweg, sollte zum einen der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf weitere Moleküle *downstream* und *upstream* des PI3K/AKT-Signalwegs mittels Western Blot-Analyse erforscht werden. Zum anderen sollte der Einfluss von IL-6 und IGF-1 auf die Phosphorylierung der verschiedenen AKT-Isoformen sowie die mögliche Selektivität der hemmenden Wirkung von Inositol-C2-PAF auf die verstärkte Phosphorylierung der AKT-Isoformen durch die Stimulatoren mittels kapillarer isoelektrischer Fokussierung (cIEF, *capillary isoelectric focusing*) festgestellt werden.

Zusätzlich bietet diese Arbeit zum Schluss noch einen Vorschlag zu einer neuen Einteilung und Klassifizierung der ATLS. Dies erschien aufgrund einer in der Literatur aktuell vorgefundenen uneinheitlichen Einordnung und Bezeichnung der Verbindungen sinnvoll, die potentielle, aber auch derzeit bestehende Analoga in ihre Untergruppierungen nicht aufnehmen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 MCF-7-Zellen

Epithelial-luminale MCF-7-Zellen gehören zu einer in der Forschung bereits etablierten Zellreihe, die aus dem Pleuraerguss einer an einem Adenokarzinom der Mamma erkrankten 69-jährigen Patientin aus dem Jahr 1970 stammen (103).

Die Tumore der Mamma können aufgrund ihres histologischen und intrinsischen genomischen Profils in verschiedene Gruppen klassifiziert werden, deren Zuordnung beispielsweise Einfluss auf organspezifische Metastasierung, Behandlung und Prognose hat (5,104). Es werden folgende Gruppen unterschieden: *Basal-like*, *HER-2-amplificated*, *luminal A*, *luminal B* und *normal breast-like* (5). Die Gruppen *luminal A* und *luminal B* beispielsweise sind empfänglich für eine Hormontherapie, die *HER-2-amplificated* Gruppe für eine Trastuzumab-Therapie (104). Die MCF-7-Zellen gehören zur *luminal A* Gruppe (die eine gute Prognose bei den meisten Patientinnen hat) und sind ER- und PR-positive Zellen mit nur einer geringen Expression von HER-2/neu und dem Proliferationsmarker Ki-67 (20,104,105).

Es handelt es sich bei MCF-7-Zellen um eine insgesamt vergleichsweise weniger stark invasive Zellreihe eines Mammakarzinoms (3), die aufgrund ihres Rezeptorstatus auf eine hormonelle Therapie anspricht und sich auch oft responsiv gegenüber einer Chemotherapie zeigt (104).

In Kultur bilden sie eng zusammenhängende Zell-Cluster und zeigen recht robuste Zell-Zell-Adhäsionen. Mammakarzinom-Zelllinien sind in vitro gegenüber ihren Kulturkonditionen oft sensitiv (104).

Die MCF-7-Zellen wurden freundlicherweise von Göran Landberg (Sahlgrenska Cancer Center, Universität Göteborg, Schweden) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Geräte

2.1.2.1 Geräte für zellbiologische Methoden

Tabelle 1: Geräte für zellbiologische Methoden

Gerätebezeichnung	Firma	Ort, Land
Sicherheitswerkbank Airstream® Class II Biological Safety Cabinet	Esco Biotech	Hatboro, USA
Absauggerät Vacusafe	Integra Biosciences	Zizers, Schweiz
Mikrobiologischer Brutschrank Typ BB 6220	Heraeus	Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop Typ TMS-F	Nikon	Tokyo, Japan
Wärme- und Trockenschrank Typ UT 6760	Heraeus	Hanau, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
AxioCam b/w 412-311	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Fluoreszenzkontrollgerät Colibri Controller Nr. 5419000238	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Digitalkamera D90 18-105 VR Kit	Nikon	Tokyo, Japan
Präzisionswaage Adventurer™ AR2140	Ohaus	Parsippany, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge Typ PMC-060	Tomy Kogyo	Tokyo, Japan
Zentrifuge Typ 1K15	Sigma Laborzentrifugen	Osterode, Deutschland

2.1.2.2 Geräte für biochemische Methoden

Tabelle 2: Geräte für biochemische Methoden

Gerätebezeichnung	Firma	Ort, Land
BioPhotometer Typ 6131 04825	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Photometer-Drucker Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments	Chiba, Japan
Stromversorgungsgerät Power Pac 200	Bio-Rad	Hercules, USA
Chemilumineszenzbildgerät VersaDoc™ Imaging System 4000 MP	Bio-Rad	Hercules, USA
Gerät für kapillare isoelektrische Fokussierung NanoPro™ 100 Typ: Simon	ProteinSimple	Santa Clara, USA

Digital-pH (potentia hydrogenii)- Meter 646	Knick	Berlin, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Vortexer VF2	Janke und Kunkel Ika- Labortechnik	Staufen, Deutschland
Magnetrührer Ikamag® Reo	Janke und Kunkel Ika- Labortechnik	Staufen, Deutschland
Rotationsschüttler Typ 3005	GFL	Burgwedel, Deutschland
Rotationsschüttler Gyro-Rocker SSL3	Stuart	Staffordshire (Stone), UK

2.1.3 Computer-Programme

Tabelle 3: Computer-Programme

Programmbezeichnung	Firma oder Ersteller	Ort, Land
Axiovision Release 4.8.2 SP3	Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Quantity One - 4.6.5 (Beta- Version)	Bio-Rad	Hercules, USA
Compass Software Version 1.8.1	ProteinSimple	Santa Clara, USA
Bildbearbeitungsprogramm ImageJ 1.48v	Wayne Rasband	National Institutes of Health, USA
Bildbearbeitungsprogramm GIMP 2.8.18	Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Entwicklerteam	K. A.
Bildbearbeitungsprogramm IrfanView, Version 4.4.2	Irfan Skiljan	Irfan Skiljan ist Absolvent der Technischen Universität Wien
Word 2013	Microsoft Corporation	Redmond, USA
PowerPoint® 2013	Microsoft Corporation	Redmond, USA
Excel® 2013	Microsoft Corporation	Redmond, USA
Statistikprogramm IBM SPSS Statistics Version 23.0.0.2	IBM Corporation	Armonk, USA
Chemograph Plus Version 6.50 2014	DigiLab Software GmbH, Dr. P. Rösner	Altenholz, Deutschland
Zotero, Version 5.0.96.3	Roy Rosenzweig Center for History and New Media, George Mason University	Fairfax, USA

2.1.4 Verbrauchsmaterial

2.1.4.1 Material für zellbiologische Methoden

Tabelle 4: Material für zellbiologische Methoden

Materialbezeichnung	Firma	Ort, Land
Zellkulturflaschen (diverse)	Corning (Falcon)	Corning, USA
Zellkulturschalen (diverse)	Corning (Falcon)	Corning, USA
Zellkulturplatten 24-well #3524	Corning	Corning, USA
6,5 mm Transwell® Membraneneinsätze mit 8 µm Poren #3422	Corning	Corning, USA
Zählkammer Neubauer-improved	Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt	Newton, USA
Rotilabo®-Wattestäbchen	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Laborpipetten (diverse)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere® Filter Tips (diverse)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten (diverse)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Spritzen (diverse)	BD	Heidelberg, Deutschland
Einmal-Injektionskanülen (diverse)	Braun	Melsungen, Deutschland
Konische Röhrchen, Polypropylen (diverse)	Corning (Falcon)	Reynosa, Mexiko
SafeSeal Reagiergefäße (diverse)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
CryoTube™ Röhrchen	Thermo Fisher (Nalge Nunc International)	Rochester, USA
Mr. Frosty™ Gefrierbox	Thermo Fisher (Nalge Nunc International)	Rochester, USA
Deckgläser (diverse)	Karl Hecht	Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Objektträger (diverse)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Bechergläser DURAN® (diverse)	Schott	Mainz, Deutschland

2.1.4.2 Material für biochemische Methoden

Tabelle 5: Material für biochemische Methoden

Materialbezeichnung	Firma	Ort, Land
Ausrüstungs-Kit Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad	Hercules, USA

Ausrüstungs-Kit Mini-Protean® Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad	Hercules, USA
NanoPro™ 100 Master Kit CBS3000	ProteinSimple	Santa Clara, USA
Chromatographiepapier	Whatman	Maidstone, England
Nitrocellulosemembran	Thermo Fisher	Rockford, USA
Einmal-Küvetten	Brand	Wertheim, Deutschland

2.1.5 Chemikalien, Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Tabelle 6: Chemikalien, Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Materialbezeichnung	Firma	Ort, Land
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 15-013-CV3</i>	Corning (Mediatech)	Manassas, USA
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS) 21-031-CMR</i>	Corning (Mediatech)	Manassas, USA
Fötales Kälberserum (FCS, <i>fetal calf serum</i>)	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Stabiles Glutamin	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Ziegenserum (<i>goat serum</i>),	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Trypan-Blau Lösung	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Kristallviolett	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Methanol	KMF optiChem	Lohmar, Deutschland
Ethanol	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Merck	Darmstadt, Deutschland
Nichtionisches Tensid Tween® 20	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Nichtionisches Tensid Triton™ X-100	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA, <i>bovine serum albumin</i>)	PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Einbettungsmedium ProLong® Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher (Life Technologies)	Eugene, USA
Immersionsöl	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kollagen Typ 1, Rattenschwanz, Nr. 354236	BD	Bedford, USA

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Milli-Q hochreines Wasser ,ultrapure' aus Milli-Q- Wasseraufbereitungssystem	Merck	Darmstadt, Deutschland

2.1.5.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen für biochemische Methoden

Tabelle 7: Chemikalien, Puffer und Lösungen für biochemische Methoden

Materialbezeichnung	Firma	Ort, Land
Bradford-Lösung	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Marker Precision Plus Protein™ Standards Dual Color	Bio-Rad	Hercules, USA
1,4-Dithiothreit (DTT)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS, <i>sodium dodecyl sulfate</i>)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	J. T. Baker	Deventer, Holland
Glycin	Serva	Heidelberg, Deutschland
Trockenmilchpulver ,Nonfat dry milk/Blotting-Grade Blocker'	Bio-Rad	Hercules, USA
Chemilumineszenz-Reagenz Western Lightning® Plus-ECL	PerkinElmer	Waltham, USA
Bicin/Chaps Puffer 040-764	ProteinSimple	Santa Clara, USA
DMSO-Inhibitor-Mix 040-510	ProteinSimple	Santa Clara, USA
Wasserhaltiger (Aqueous) Inhibitor- Mix 040-482	ProteinSimple	Santa Clara, USA
NanoPro™ Premix G2 040-972	ProteinSimple	Santa Clara, USA
pI Standard Ladder 3 040-646	ProteinSimple	Santa Clara, USA
pI Standard, 5.5 040-028	ProteinSimple	Santa Clara, USA
Spezielle Antikörperlösung #040- 309	ProteinSimple	Santa Clara, USA
Salzsäure 1mol/l	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natronlauge 1mol/l	AppliChem	Darmstadt, Deutschland

2.1.6 Medien, Lösungen, Gele und Puffer

Tabelle 8: Medien, Lösungen, Gele und Puffer

„DMEM-Komplett“	1 % stabiles Glutamin (v/v) 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) 2 %/5 %/10 % FCS (v/v) In DMEM
Tris-buffered saline (TBS) (1mal Puffer)	NaCl: 150 mM Tris (pH 7,5): 7,7 mM In Milli-Q-Wasser
Lösungen für Gele	
Lösung A	Fertiglösung Rotiphorese® Gel 30
Lösung B	SDS: 0,8 g Tris (pH 8,8): 36,3 g In 200 ml Milli-Q-Wasser
Lösung C	SDS: 0,4 g Tris (pH 6,8): 6,0 g In 100 ml Milli-Q-Wasser
Trenngel (10 % SDS-Polyacrylamidgel) (für 2 Gele)	Lösung A: 3 ml Lösung B: 2,25 ml Milli-Q-Wasser: 3,75 ml 10 % APS (m/v) in Milli-Q-Wasser: 45 µl TEMED: 4,5 µl
Sammelgel (für 2 Gele)	Lösung A: 0,4 ml Lösung C: 0,75 ml Milli-Q-Wasser: 1,85 ml 10 % APS (m/v) in Milli-Q-Wasser: 12 µl TEMED: 3 µl
Probenpuffer (5mal)	Milli-Q-Wasser: 25 ml Tris (pH 6,8): 3,6 g SDS: 12,5 g, rühren und erwärmen auf 40° C Glycerin: 50 ml Bromphenolblau: 0,015 % (m/v) in Milli-Q-Wasser, Zugabe bis Farbumschlag der Lösung zu dunkelblau Milli-Q-Wasser: auf 100 ml auffüllen
DTT-Lösung	DTT: 500 µM In Milli-Q-Wasser
Probenpuffer (5mal, reduziert)	Probenpuffer (5x): 450 µl DTT-Lösung: 50µl
Western Blot Laufpuffer (1mal)	Tris (pH 8,3 - 8,8): 25 µM Glycin: 192 µM

	SDS: 0,1 % (m/v)
	In Milli-Q-Wasser
Western Blot	Tris (pH 8,0 - 10,5): 25 µM
Transferpuffer (1mal)	Glycin: 192 µM
	In Milli-Q-Wasser

2.1.7 Antikörper und Farbstoffe und ihre Anwendungen

2.1.7.1 Primärantikörper

Tabelle 9: Primärantikörper

Primärantikörper	Isotyp	Firma	Ort, Land
AKT , #9272	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
Phospho-AKT, Ser473 , D9E, XP®, #4060	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
Phospho-AKT, Thr308 , C31E5E, #2965	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
STAT3 , 124H6, #9139	Maus (<i>mouse</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
Phospho-STAT3, Tyr705 , D3A7, XP®, #9145	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
mTOR , #2972	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
Phospho-mTOR, Ser2448 , D9C2, XP®, #5536	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
PDK1 , #3062	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
Phospho-PDK1, Ser241 , #3061	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
PTEN , 138G6, #9559	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
Phospho-PTEN, Ser380/Thr382/383 , 44A7, #9549	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
Phospho-RB, Ser795 , #9301	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
Phospho-RB, Ser807/811 , #9308	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Cell Signaling	Boston, USA
E-Cadherin , 610181, 36/E-Cadherin	Maus (<i>mouse</i>)	BD	Heidelberg, Deutschland
NF-κB p65 (C-20) , sc-372	Kaninchen (<i>rabbit</i>)	Santa Cruz	Heidelberg, Deutschland
α-Tubulin , Control ab7291, DM1A	Maus (<i>mouse</i>)	abcam	Cambridge, UK
β-Aktin , A5316, AC-74	Maus (<i>mouse</i>)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

Tabelle 10: Blockierlösungen

Blockierlösung A	BSA: 5 % (m/v) Tween® 20: 0,1 % (v/v) In TBS
Blockierlösung B	<i>Nonfat dry milk</i> : 5 % (m/v) Tween® 20: 0,1 % (v/v) In TBS
Blockierlösung C	BSA: 2 % (m/v) <i>Goat serum</i> : 1 % (v/v) Natriumazid: 1 % (m/v) Triton™ X-100: 0,2 % (v/v) In PBS
Blockierlösung D	BSA: 5 % (m/v) <i>Goat serum</i> : 10 % (v/v) Tween® 20: 0,1 % (v/v) In TBS

Tabelle 11: Primärantikörper – Anwendung

WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz, cIEF: *capillary isoelectric focussing*

Primärantikörper/Anwendung	Blockierlösung	Verdünnung
AKT		
WB	Blockierlösung A	1:1000
Phospho-AKT (Ser473)		
WB	Blockierlösung A	1:1000
IF	Blockierlösung C	1:100
cIEF	Spezielle Antikörperlösung (#040-309, ProteinSimple)	1:25
Phospho-AKT (Thr308)		
WB	Blockierlösung A	1:1000
STAT3		
WB	Blockierlösung B	1:1000
Phospho-STAT3 (Tyr705)		
WB	Blockierlösung A	1:500
IF	Blockierlösung D	1:100
mTOR		
WB	Blockierlösung A	1:1000
Phospho-mTOR (Ser2448)		
WB	Blockierlösung A	1:1000
PDK1		
WB	Blockierlösung A	1:1000
Phospho-PDK1 (Ser241)		

WB	Blockierlösung A	1:1000
PTEN		
WB	Blockierlösung A	1:1000
Phospho-PTEN (Ser380, Thr382/383)		
WB	Blockierlösung A	1:1000
Phospho-RB (Ser795)		
WB	Blockierlösung A	1:1000
Phospho-RB (Ser807/811)		
WB	Blockierlösung A	1:1000
E-Cadherin		
WB	Blockierlösung A	1:5000
NF-κB		
WB	Blockierlösung A	1:100
α-Tubulin		
IF	Blockierlösung C	1:200
β-Aktin		
WB	Blockierlösung A	1:4000

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 12: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Firma	Ort, Land
SAM Peroxidiase-Konjugat (<i>sheep anti-mouse</i> , Schaf anti-Maus), IgG, A6782	Sigma-Aldrich	Saint-Louis, USA
GAR Peroxidase-Konjugat (<i>goat anti-rabbit</i> , Ziege anti-Kaninchen), IgG, R115	Leinco	Saint-Louis, USA
GAR Alexa Fluor® 488 (<i>goat anti-rabbit</i> , Ziege anti-Kaninchen), IgG, A11008	Invitrogen	Carlsbad, USA
GAM Alexa Fluor® 488 (<i>goat anti-mouse</i> , Ziege anti-Kaninchen), IgG, A11001	Invitrogen	Carlsbad, USA
GAR Peroxidase-Konjugat #040-656 (<i>goat anti-rabbit</i> , Ziege anti-Kaninchen)	ProteinSimple	Santa Clara, USA

Tabelle 13: Sekundärantikörper – Anwendung

WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz, cIEF: *capillary isoelectric focussing*

Sekundärantikörper/Anwendung	Blockierlösung	Verdünnung
SAM Peroxidase-Konjugat WB	Tween® 20: 0,1 % (v/v) In TBS	1:10000
GAR Peroxidase-Konjugat WB	Tween® 20: 0,1 % (v/v) In TBS	1:5000
GAR Alexa Fluor® 488 IF	In Inkubationslösung des Primärantikörpers	1:500
GAM Alexa Fluor® 488 IF	In Inkubationslösung des Primärantikörpers	1:500
GAR Peroxidase-Konjugat #040-656 cIEF	In spezieller Antikörperlösung (#040-309, ProteinSimple)	1:100

2.1.7.3 Fluoreszenz-Farbstoffe

Tabelle 14: Fluoreszenz-Farbstoffe und deren Anwendung

Farbstoff	Firma	Ort, Land	Verwendung
Texas Red®-X-Phalloidin (filamentöses Aktin, F- Aktin), T7471	Life Technologies	Eugene, USA	Blockierlösung C Endkonzentration: 165 nmol/l
Hoechst (Zellkernfärbung), bis- Benzimid Trihydrochlorid H33342, B2261-100MG	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland	In gemeinsamer Lösung mit Sekundärantikörper Verdünnung: 1:3000

2.1.8 Stimulanzen

Tabelle 15: Stimulanzen

Stimulanz	Firma oder Ersteller	Ort, Land	Arbeitskonzentration
IGF-1 , rekombinant human, 97534, E. Coli	Biomol	Hamburg, Deutschland	100 ng/ml
Interleukin-6 , rekombinant human, 11340064, E. Coli	ImmunoTools	Friesoythe, Deutschland	50 ng/ml
CCL2 , 11343380, E. Coli	ImmunoTools	Friesoythe, Deutschland	50 ng/ml
Inositol-C2-PAF	Vadim Shmanai	Minsk, Belarus	2,5 µM oder 5 µM

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von MCF-7-Zellen

Für die Kultivierung von MCF-7-Zellen in Zellkulturflaschen wurde das Zellmedium „DMEM-Komplett“ (Tab. 8) benutzt. Das Wachstum im Brutschrank erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Vor dem Ablösen in 0,05 % EDTA (m/v) in PBS wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde bei 900 U/min für 3 min zentrifugiert, das entstandene Pellet resuspendiert und die Zellzahl ermittelt (siehe 2.2.1.3). Anschließend wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl ausgesät.

Vor der Stimulation für die jeweiligen Experimente wurde das FCS im Medium sukzessive über 5 % (v/v) über Nacht auf 2 % (v/v) reduziert. In Medium mit 2 % FCS (v/v) Serum fand dann jeweils die Stimulation der Zellen statt.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Inkulturnahme von Zellen

Zunächst wurden die Zellen für die Kryokonservierung wie oben beschrieben pelletiert, um dann in einer Lösung aus 10 % DMSO (v/v) in FCS aufgenommen zu werden. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein CryoTube™ überführt. Die Lagerung der Zellen in einer Mr. Frosty™-Gefrierbox erfolgte bei -80 °C.

Für die Inkulturnahme wurde das CryoTube™ bei Raumtemperatur aufgetaut und der Inhalt bei 900 U/min für 3 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes konnten die Zellen als Pellet im Zellmedium „DMEM-Komplett“ (Tab. 8) aufgenommen und in einer Zellkulturflasche neu ausgesät und wie unter 2.2.1.1 beschrieben behandelt werden.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Nach Pelletierung und Resuspension der Zellen im Zellmedium wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt, um nachfolgend die Gesamtzellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop durch Auszählen zu ermitteln. Dabei wurde folgende Formel gemäß den Angaben des Herstellers (Tab. 4) angewandt (106):

Zellzahl/ml = Mittelwert der 4 ausgezählten großen Eckquadrate · 10 (Verdünnung) · 10⁴ (Kammerfaktor)

2.2.1.4 Zellviabilitätsmessung Inositol-C2-PAF behandelter Zellen mittels Trypanblau-Färbung

3,8 x 10⁴ MCF-7-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm ausgesät. Bei einer gewünschten Zelldichte von ca. 70 % wurden die Zellen bei 2 % FCS (v/v) im Zellmedium mit Inositol-C2-PAF über 24 h im Brutschrank inkubiert. Dabei wurde Inositol-C2-PAF mit den folgenden Konzentrationen getestet: 0,1 µM, 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM. Als Kontrolle wurden in einer Zellkulturschale nicht-stimulierte Zellen mitgeführt.

Nach Ablösen der Zellen, Zentrifugation und Resuspendierung wurden die Zellen wie unter 2.2.1.3 in Trypanblau-Lösung aufgenommen und gezählt.

Dabei wurden sowohl die vitalen Zellen, als auch die den Farbstoff aufnehmenden abgestorbenen Zellen erfasst, um die Gesamtzellzahl beziehungsweise den prozentualen Anteil an lebenden und abgestorbenen Zellen zu ermitteln und die verschiedenen Ansätze statistisch miteinander zu vergleichen. Kurz vor Ablauf der 24 h-Stimulation wurden mithilfe einer Digitalkamera am Lichtmikroskop bei 10facher Vergrößerung pro Versuch und Ansatz repräsentative Fotos zur beispielhaften Darstellung der Effekte auf die Zellen bei den unterschiedlichen Konzentrationen von Inositol-C2-PAF aufgenommen. Die beispielhaften Bilder wurden mit jeweils gleichen Kameraeinstellungen angefertigt und mit ImageJ jeweils zur optimalen Darstellung unterschiedlich nachbearbeitet.

2.2.1.5 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse

0,75 x 10⁴ MCF-7-Zellen wurden in 24-well Zellkulturplatten auf Deckgläsern ausgesät. Die Deckgläser wurden dabei zuvor in 100 % Methanol für 10 min, in 70 % Ethanol (v/v) in Milli-Q-Wasser für 30 min und in 96 % Ethanol (v/v) in Milli-Q-Wasser für 30 min im Becherglas auf dem Rotationsschüttler gereinigt. Dann wurden sie zunächst unter der Sicherheitswerkbank und zuletzt über Nacht bei 180 °C im Trockenschrank getrocknet. Bei einer Zelldichte von ca. 70 % auf den Deckgläsern wurden die Zellen bei 2 % FCS (v/v) im Zellmedium für 24 h stimuliert oder für Kontrollbedingungen unstimuliert belassen. Die stimulierenden Mediatoren wurden dafür in den folgenden Konzentrationen zugesetzt: IGF-1: 100 ng/ml, IL-6: 50 ng/ml, CCL2: 50 ng/ml und Inositol-C2-PAF: 2,5 µM oder 5 µM (Tab. 15). Danach wurden die Zellen fixiert und, wenn notwendig, solubilisiert. Die Fixierung erfolgte entweder mit eiskaltem Methanol für 15 min bei -20 °C, wenn Primärantikörper gegen pSTAT3^{Y705} eingesetzt wurden oder mit 4 % PFA (m/v) in PBS für 20 min bei Raumtemperatur bei allen anderen eingesetzten Primärantikörpern. Als nächstes wurden die Zellen für 2 h in der jeweiligen Blockierlösung für den geplanten

Primärantikörper (Tab. 10 und 11) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der in der entsprechenden Blockierlösung verdünnt wurde (Tab. 11), bei 4 °C über Nacht. Nach dreifachem Waschen mit PBS für 10 min wurden die Zellen mit dem zugehörigen Sekundärantikörper (Tab. 13) in der jeweiligen Blockierlösung des Primärantikörpers für 1 h, abgedunkelt bei Raumtemperatur, inkubiert. Färbungen der Zellnuklei oder des Zytoskeletts mit Hoechst 33342 beziehungsweise Texas Red[®]-X-Phalloidin erfolgten in ihrer Blockierlösung (Tab. 14) parallel für 1 h abgedunkelt bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden die Zellen auf den Deckgläsern mit ProLong[®]-Einbettungsmedium auf Objektträgern eingebettet. Bilder wurden mithilfe eines Axiovert 200-Fluoreszenzmikroskops und mit einem für Immersionsöl tauglichen Objektiv und, wenn nicht anders beschrieben, einer insgesamt 39,69fachen Vergrößerung nach Herstellerangaben, angefertigt. Dazu wurden die zugehörige Software AxioVision Release 4.8.2 SP3 und eine AxioCam b/w 412-311 genutzt. Die zu vergleichenden Bilder wurden unter gleichen Belichtungszeiten aufgenommen und identisch mit der AxioVision Software und/oder dem Bildbearbeitungsprogramm IrfanView bearbeitet. Für die Aufnahme der Zellkerne wurden optimierte Belichtungszeiten gewählt.

2.2.1.6 Bestimmung der Proliferationsrate mithilfe Fluoreszenz-markierter Zellkerne

Um die Proliferationsrate von Inositol-C2-PAF-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zu bestimmen, wurden die Zellkerne wie unter 2.2.1.5 beschrieben mit dem Hoechst-Farbstoff Fluoreszenz-markiert. Die Zellen wurden für 24 h mit 2,5 µM Inositol-C2-PAF behandelt oder unbehandelt kultiviert. Nach Beendigung des Experiments wurden die Zellkerne wie beschrieben markiert und am Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Für jeden Ansatz wurden jeweils 10 Bilder mit einem für Immersionsöl nutzbarem Objektiv bei insgesamt 25,2facher Vergrößerung und unterschiedlichen, optimierten Belichtungszeiten aufgenommen. Für die Aufnahmen wurden jeweils gleiche Bereiche der Deckgläser gewählt. Im Folgenden wurden dann die in Mitose befindlichen Zellen sowie die Gesamtzellzahl eines Bildes ermittelt und für jedes Bild und folgend für jedes Experiment addiert, um den prozentualen Anteil an proliferierenden Zellen zu ermitteln. Es wurden nur solche Zellen mitgezählt, die sich deutlich erkennbar in der Prophase, Metaphase, Anaphase oder Telophase befanden. Zellen in der Zytokinese wurden nicht berücksichtigt. Pro Ansatz gingen über diesen viermal durchgeführten Versuch jeweils zwischen 5500 und 6300 Zellen in die Auswertung ein.

2.2.1.7 Wundheilungsassay (*Scratchassay*)

$3,8 \times 10^4$ MCF-7-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 35 mm Durchmesser ausgesät und kultiviert, bis sie bei 5 % FCS (v/v) im Zellmedium eine Zelldichte von 100 % erreichten. Nachfolgend wurde in jedem Ansatz mit einer gelben Pipettenspitze (Größe 2 - 100 μ l) in die Mitte der Schale vom Rand aus eine kreuzförmige Wunde in den Zellrasen gekratzt. Die Zellen wurden dann 1 h im Brutschrank gelagert, wobei sie nach 30 min einmal mit PBS gewaschen wurden, um Zelldebris zu entfernen.

Die Zellen wurden dann unter Medium mit 2 % FCS (v/v) für 24 h stimuliert oder unstimuliert als Kontrolle belassen. Es wurden die in Tab. 15 erwähnten Stimulanzen in ihren jeweiligen Konzentrationen genutzt. Inositol-C2-PAF wurde in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt. Während der Stimulation wurden mit einer Digitalkamera und einem Lichtmikroskop bei einer 10fachen Vergrößerung mit gleichen Kameraeinstellungen Bilder der Wundheilungen nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h aufgenommen. Für die optimale Auswertung wurden immer dieselben 4 vordefinierten Ausschnitte in einer Zellkulturschale fotografiert. Mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ wurde die gewachsene Zellfläche in jedem Ansatz berechnet, indem die nichtbewachsene freie innere Fläche jedes Bildes mit dem Freihand-Werkzeug des Programms zu jedem Zeitpunkt ermittelt und von der freien Fläche des jeweiligen ursprünglichen 1 h-Wertes abgezogen wurde. Somit konnten diese unter Mittelung der 4 Werte pro Ansatz untereinander statistisch verglichen werden. Beispielhafte repräsentative Bilder wurden mithilfe von ImageJ optimiert dargestellt.

2.2.1.8 Haptotaktischer Migrationsassay

Bei dem haptotaktischen Migrationsassay wurde versucht, mithilfe einer 6,5 mm Transwell[®]-Platte mit Membraneinsätze mit 8 μ m Poren in vivo-ähnliche Versuchsbedingungen herzustellen, um den Einfluss von Inositol-C2-PAF auf das Migrationsverhalten von MCF-7-Zellen an einem Kollagen-I-Gradienten zu ermitteln.

1×10^5 MCF-7-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 100 mm Durchmesser ausgesät und wie unter 2.2.1.1 beschrieben bis zu einer Zelldichte von 70 % kultiviert. Zunächst wurden die Membraneinsätze auf der äußeren Membranseite mit Kollagen I (20 μ g/ml in 0,02 % Essigsäure (v/v) in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur beschichtet. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Membraneinsätze für 30 min mit 1 mg/ml BSA in PBS blockiert. Nach Entfernung der Blockierlösung wurden die Membraneinsätze dann in die mit 1 ml Medium/2 % FCS (v/v) gefüllten Wells der 24-Well Zellkulturplatte gehängt. Anschließend wurden $1,6 \cdot 10^4$ Zellen in 190 μ l

Medium/2 % FCS (v/v) in den inneren Teil des Membraneinsatzes, also auf den Filter, pipettiert. Dazu wurden 10 µl serumfreies Zellmedium pipettiert, in dem die Stimulanzen in den entsprechenden gewünschten Konzentrationen für die Ansätze gelöst waren. Auf einen Filter, der als Kontrolle galt, wurde nur Medium pipettiert. Es wurden die in Tab. 15 genannten Stimulanzen in ihren dort hinterlegten Konzentrationen genutzt. Inositol-C2-PAF wurde in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt. Die Zellen wurden über 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Membraneinsätze nach Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen. Dann wurden die verbliebenen Zellen mithilfe eines Wattestäbchens auf der Innenseite des Membraneinsatzes entfernt. Anschließend folgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mittels 4 % PFA (m/v)/0,025 % Saponin (m/v) in PBS bei Raumtemperatur für 20 min. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die durch die Membran gewanderten Zellen mit 0,1 % Kristallviolett (m/v) in Milli-Q-Wasser für 25 min angefärbt und danach mit Milli-Q-Wasser gewaschen, bis sich keine Farbwolken mehr bildeten. Über Nacht wurden die Membraneinsätze getrocknet. Am Lichtmikroskop wurden mithilfe eines Zähllokulars bei insgesamt 250facher Vergrößerung 5 Sichtfelder für jeden Membraneinsatz ausgezählt, sodass die Ansätze statistisch untereinander verglichen und beurteilt werden konnten. Zur Vereinheitlichung der Zählweise für jeden Membraneinsatz wurden gleiche Bereiche auf den jeweiligen Filtern ausgewählt und fotografiert.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Probengewinnung und Probenvorbereitung für Western Blot-Analyse und kapillare isoelektrische Fokussierung

$0,5 \times 10^5$ MCF-7-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 60 mm Durchmesser ausgesät und wie unter 2.2.1.1 beschrieben bis zu einer Zelldichte von 70 % kultiviert. Bei 2 % FCS (v/v) in Zellmedium wurden die Zellen über 24 h stimuliert oder unstimuliert belassen. Dafür wurden die in Tab. 15 genannten Stimulanzen in ihren dort hinterlegten Konzentrationen eingesetzt. Inositol-C2-PAF wurde in einer Konzentration von 5 µM verwandt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen auf Eis mit einem Zellschaber in 150 µl Bicin/Chaps Lysepuffer (mit 1mal DMSO-Inhibitor-Mix, 1mal wasserhaltiger (*aqueous*) Inhibitor-Mix) abgeschabt. Die Zellen wurden dann bei 4 °C für 45 min geschüttelt und für 15 min bei 15200 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Zellpellet getrennt in einem anderen Reaktionsgefäß aufgefangen. Zur quantitativen Gesamtproteinbestimmung wurde als photometrische Methode der Bradford-Test genutzt. Dabei macht sich der Test zu Nutze, dass die Bradford-Lösung (beinhaltet Coomassie-Brillantblau) ungebunden ein Absorptionsmaximum von 465 nm hat, welches sich

durch die Anwesenheit von Proteinen zu 595 nm verschiebt (107). Zunächst wurde mit BSA eine Protein-Standardreihe hergestellt, um Proben mit Proteinmengen zwischen 0 und 10 mg/ml erfassen zu können. Dabei wurde bei 595 nm gegen den Reagenzien-Leerwert gemessen. Anschließend konnten anhand der Standardreihe eigene Proben gemessen werden, indem jeweils 1 µl der Probe, 799 µl Milli-Q-Wasser und 200 µl Bradford-Lösung addiert wurden und die Extinktion bei 595 nm gegen den Protein-Leerwert gemessen wurde (800 µl Milli-Q-Wasser + 200 µl Bradford-Lösung).

2.2.2.2 Western Blot-Analyse

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Moleküle nach ihrem Molekulargewicht wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli genutzt. Bei diesem Verfahren wird die Eigenladung von Proteinen durch SDS, einem anionischen Detergens, überdeckt, sodass bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel eine Linearität zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der Wanderungsstrecke der Proteine besteht (107).

Den Proben wurde dafür $\frac{1}{5}$ des Volumens mit einem 5fach konzentrierten reduzierten Probenpuffer (Tab. 8) zugesetzt. Diese wurden im Folgenden bei 95 °C im Thermomixer gekocht und 60 µg denaturiertes Protein jeder Probe auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel (Tab. 8) aufgetragen. Zur Laufkontrolle und Überprüfung des Molekulargewichts wurde für jeden Lauf der Bandenmarker *Precision Plus Protein™ Standards Dual Color* mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 80 - 160 V.

Tankblotting-Verfahren und Antikörperinkubation der Blotmembranen

Um die Proteine nach der Elektrophorese weiter analysieren zu können, wurde die Methode des Western Blottings mit Elektrotransfer genutzt. Dabei wurde auf das Tankblotting-Verfahren zurückgegriffen, bei dem unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes innerhalb eines Puffertanks in einer Gitterkassette zwischen zwei Filterpapieren die im Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und immobilisiert werden, auf der anschließend die Proteine über Antikörper nachgewiesen werden können (107).

Der Transfer erfolgte für 1 h bei 0,25 A. Um die Gleichmäßigkeit der Proteinmenge der Proben und die Qualität des Transfers vorab zu überprüfen, wurden die übertragenen Banden mit 0,1 % Ponceau S (m/v) in 5 % Essigsäure (v/v) in Milli-Q-Wasser angefärbt. Nach Waschen der Membranen mit 0,1 % Tween® 20 (v/v) in 1mal TBS bei Raumtemperatur wurden die unspezifischen Bindungsstellen dieser Membranen zunächst über Nacht bei 4 °C schüttelnd mit

der für die jeweilige Blotmembran vorgesehenen Blockierlösung des Primärantikörper (Tab. 11) blockiert. Auf ein dreimaliges Waschen mit 0,1 % Tween[®] 20 (v/v) in 1mal TBS bei Raumtemperatur folgte die Zugabe des Primärantikörpers auf die jeweilige Blotmembran in der Blockierlösung schüttelnd über Nacht bei 4 °C. Als nächstes erfolgten mindestens 5 weitere Waschschrirte mit 0,1 % Tween[®] 20 (v/v) in 1mal TBS über insgesamt 1 h bei Raumtemperatur, wonach die Inkubation der Blotmembranen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Tab. 13) bei Raumtemperatur für 1 h durchgeführt wurde. Auch hier folgte intensives Waschen der Membran mit 0,1 % Tween[®] 20 (v/v) in 1mal TBS über 1 h.

Proteinbandendarstellung mittels Chemilumineszenz

Mithilfe des VersaDoc[™] Imaging-Systems und des Programms Quantity One konnten nachfolgend die Proteinbanden auf den Blotmembranen nachgewiesen werden, nachdem sie vorher mit den beiden Chemilumineszenz-Reagenzien Western Lightning[®] Plus-ECL nach Herstellerangaben (Tab. 7) inkubiert wurden (108). Es wurden jeweils Bilder nach 80, 160 und 240 Sekunden Belichtungszeit angefertigt und mithilfe der Programme Quantity One und ImageJ unter gleichen Bedingungen nachbearbeitet.

2.2.2.3 Kapillare isoelektrische Fokussierung

Neben der Western Blot-Analyse wurde zusätzlich die kapillare isoelektrische Fokussierung zur Auftrennung von Proteinen genutzt. Dabei wandern die in eine Kapillare gebrachten Proteine in einem elektrischen Feld durch einen pH-Gradienten bis zu ihrem isoelektrischen Punkt (pI). Dort werden sie unter UV-Licht an der Kapillarwand immobilisiert und unter Zugabe des Primär- und Sekundärantikörpers und die durch die hinzugefügten Luminole und Peroxide entstehende Chemilumineszenz mit einer integrierten *charge-coupled device* (CCD)-Kamera detektiert. Die Ergebnisse können mit dem Computer-Programm Compass quantitativ dargestellt werden (109). Vorbereitend wurden für die Erstellung eines *Master-Mixes* 131 µl des NanoPro[™] Premix G2 (pH 5 - 8) mit den Ampholyten als Lösung zur Auftrennung und Erstellung des Gradienten, 3 µl der pI Standard Ladder 3 (beinhaltet die pIs 4,9, 6,0, 6,4, 7,0 und 7,3) und 0,5 µl des pI Standard 5,5 als spätere Referenzwerte für die Detektion der gewünschten Proteine zusammenpipettiert. Für den Versuch wurde eine Proteinmenge von 125 ng pro Kapillare eingesetzt. Hierfür wurde eine durch den Bradford-Test ermittelte Menge des jeweiligen Probenansatzes mit 18,75 µl des *Master-Mixes* und 0,5 µl DMSO-Inhibitor versetzt. Um gleich große Lösungsmengen von 25 µl pro Versuchsansatz (Doppelläufe mit je 10 µl Endvolumen) zu erreichen, wurde das fehlende Volumen durch Bicin/Chaps ergänzt. Diese Lösung wurde nun, genauso wie die Antikörper und

Reagenzien, Luminol und Peroxid, Waschpuffer, Katholyte und Anolyte, auf die Versuchsplatte für das Gerät NanoPro™ 100 pipettiert. Dies und die folgenden Schritte, die die Inkubation mit den Antikörpern und Reagenzien beinhalten, wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (109).

Während des automatisch stattfindenden Laufs wurden die Proteine durch isoelektrische Fokussierung über 40 min bei 21 mW aufgetrennt und durch Bestrahlung mit UV-Licht für 100 s immobilisiert. Der Primärantikörper pAKT^{S473} (Tab. 11) wurde in einer Verdünnung von 1:25 eingesetzt und in der Kapillare für 4 h inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit dem Waschpuffer für je 150 s. Der Sekundärantikörper (Tab. 13) wurde mit einer Verdünnung von 1:100 in der Kapillare für 1 h aufgebracht. Auch hiernach wurden zwei aufeinanderfolgende Waschschrte über je 150 Sekunden durchgeführt. Zuletzt durchlief der Mix aus Luminol und Peroxid die Kapillare, wodurch die entstehende Chemilumineszenz mittels der integrierten CCD-Kamera quantitativ erfasst werden konnte. Die dargestellten Ergebnisse ergaben sich dabei in jedem Versuch aus einer Belichtungszeit von 480 Sekunden.

Durch das Computer-Programm Compass konnte die Chemilumineszenz quantitativ in einer Kurve dargestellt werden, wobei die entstehenden Spitzenwerte einem pl zugeordnet werden konnten. Ein relativer Proteinmengenvergleich in Bezug auf die Kontrolle erfolgte mittels Integralbildung der dargestellten Kurven der Proben (110).

Für jeden Ansatz in jedem Versuch wurden 2 technische Replikate erstellt.

2.2.3 Statistische Auswertung

Um die erhobenen Ergebnisse einer statistischen Datenanalyse zu unterziehen, wurden für die Versuche mit ihren metrischen Variablen jeweils zweiseitige, unverbundene T-Tests mit dem Programm IBM SPSS Statistics 23 durchgeführt (111).

Die in den Diagrammen dargestellten Standardabweichungen vom arithmetischen Mittelwert wurden ausgehend von einer Stichprobe der Grundgesamtheit nach folgender Formel berechnet (112):

$$\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}}$$

Σ = Summe
 x = Ausprägung eines Stichprobenwerts
 \bar{x} = Mittelwert der Stichprobe
 n = Stichprobenumfang

Die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde in den einzelnen Versuchen mithilfe des Bonferroni-Verfahrens je nach Anzahl der betrachteten Hypothesen adjustiert (113). Im Zellviabilitäts-Assay wurde dafür jeder Vergleich einer angesetzten Konzentration mit den unbehandelten

Kontrollzellen als Hypothese betrachtet. In diesem Versuch ergab dies 6 Hypothesen, sodass anstatt von $p < 0,05$ nun ein Signifikanzniveau von $p < 0,0083$ ($0,05/6$) für einen signifikanten Unterschied von zwei zu vergleichenden Stichproben erreicht werden musste. Wenn ein $p < 0,05$ in einem Versuch erreicht wurde, sich dieser Wert aber nicht unterhalb des neu berechneten Signifikanzniveaus nach Bonferroni befand, so wurde dieser Wert trotzdem der Anschaulichkeit halber im jeweiligen Diagramm berücksichtigt und erwähnt. In allen anderen Versuchen wurden sowohl jeweils die Vergleiche zwischen den unbehandelten Kontrollzellen mit den einzelnen Stimulationen mit Inositol-C2-PAF, IGF-1, IL-6, CCL2 und IL-6 mit CCL2 als einzelne Hypothesen bewertet, sowie auch die Vergleiche von den Ansätzen allein mit IGF-1, IL-6, CCL2 und IL-6 mit CCL2 mit der jeweiligen Zugabe von Inositol-C2-PAF.

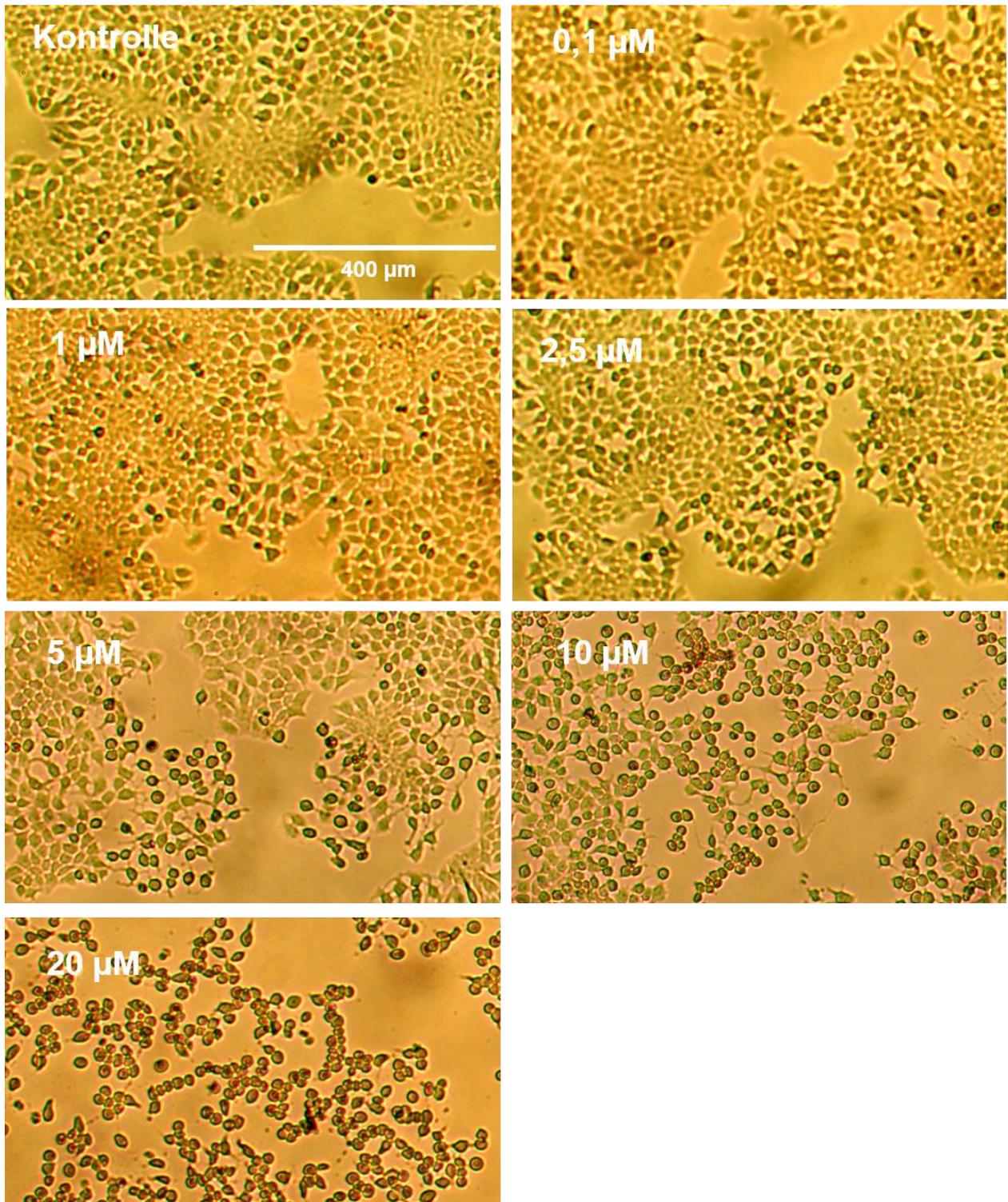
3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Arbeitskonzentration von Inositol-C2-PAF bei MCF-7-Zellen

Um den Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Brustkrebszelllinie MCF-7 (103) zu ermitteln und eine Arbeitskonzentration zu finden, die für die nachfolgenden Versuche sinnvoll ist, wurde zunächst nach der Konzentration gesucht, die effektiv, aber nicht signifikant toxisch ist.

Hierfür wurden die Zellen über 24 h mit Inositol-C2-PAF mit 0,1 μM , 1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM und 20 μM inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Veränderung der Zellmorphologie und ein Eindruck des Einflusses auf die Zellzahl unter dem Lichtmikroskop und anschließender Fotodokumentation festgehalten (Abb. 5a). Weiterhin wurde mittels Trypanblau-Färbung die Anzahl der nicht-vitalen und der vitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Abb. 5b zeigt das Verhältnis der lebenden, den Farbstoff nicht aufnehmenden, Zellen und den abgestorbenen, den Farbstoff aufnehmenden, Zellen. Hierbei zeigte sich, dass Inositol-C2-PAF in dem Konzentrationsbereich von 0,1 μM bis 5 μM keine signifikante Toxizität aufwies. Erst bei 10 μM (63,4 % vitale Zellen) und 20 μM (52,1 % vitale Zellen) konnte eine signifikant höhere Sterberate der Zellen gegenüber unbehandelten Zellen festgestellt werden (86,4 % vitale Zellen). Dieses Ergebnis wird auch durch die Fotodokumentation in Abb. 5a unterstützt. Die Bilder zeigen einen deutlich erkennbaren morphologischen Wandel der Zellen mit der ansteigenden Konzentration an Inositol-C2-PAF. Die sich aus dem Zellverbund lösenden und stark gestressten, abgerundeten und zum Teil auch abgestorbenen Zellen nahmen zahlenmäßig mit der ansteigenden Konzentration deutlich erkennbar zu und grenzten sich deutlich von den vitalen MCF-7-Zellen ab, die eng zusammenhängende Zell-Cluster bildeten und robuste Zell-Zell-Adhäsionen zeigten, so wie von Holliday und Speirs (2011) beschrieben (104). Um diesen Umstand der veränderten Morphologie visuell noch genauer darzustellen, wurden MCF-7-Zellen einmalig mit der nicht-toxischen Konzentration von 2,5 μM Inositol-C2-PAF über 24 h stimuliert und das Zytoskelett durch Visualisierung der zytoskeletalen Proteine α -Tubulin und F-Aktin (10) mittels indirekter Immunfluoreszenz-Analyse dargestellt (Abb. 6). Das Bildbeispiel zeigt ein Zellareal, in dem der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Morphologie und das Zytoskelett deutlich zu erkennen ist. Wie schon in Abb. 5a dargestellt, zeigten sich aufgelöste Zellverbände und gestresste Zellen mit vermindertem Zytoplasma. Teilweise waren die Zellen nur noch über wenige Zellausläufer miteinander verbunden.

5a



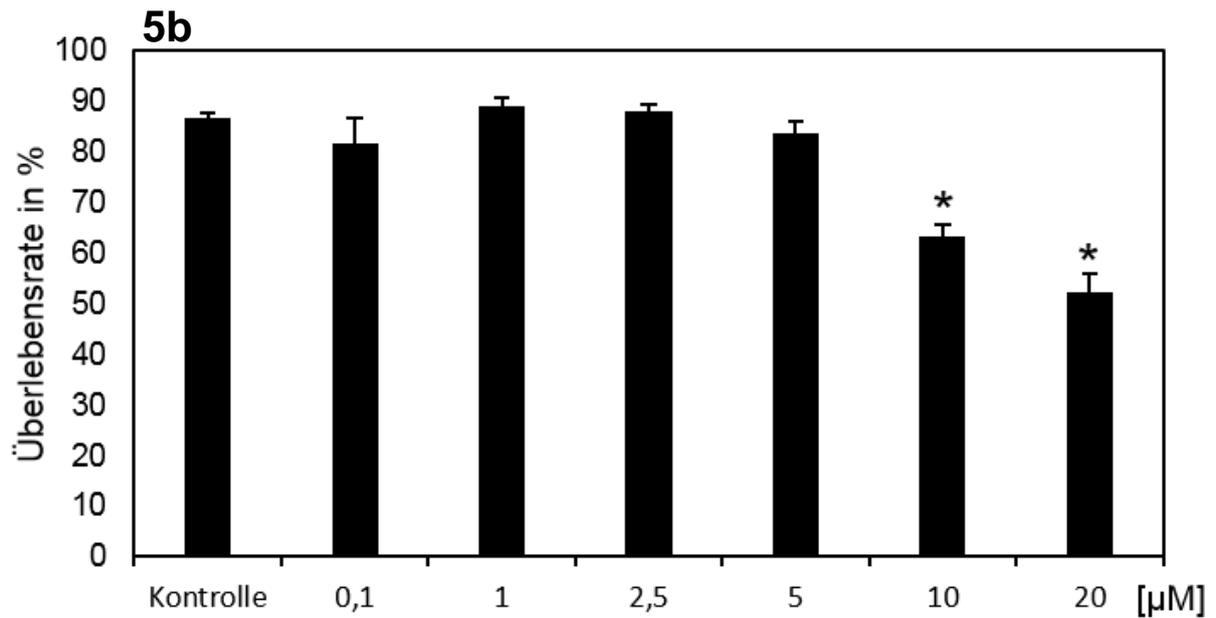


Abbildung 5: Überlebensrate von MCF-7-Zellen bei steigender Inositol-C2-PAF-Konzentration

Ermittlung der Überlebensrate von MCF-7-Zellen durch Inkubation mit Inositol-C2-PAF in ansteigender Konzentration (0,1 μM, 1 μM, 2,5 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM) über 24 h unter lichtmikroskopischer Betrachtung (a) und durch Färbung mit Trypan-Blau und anschließender Auswertung durch lichtmikroskopische Auszählung (b). Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung. * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle unter Verwendung der Bonferroni-Korrektur ($p < 0,0083$ (0,05/6)). Fotos wurden zur jeweiligen bestmöglichen Darstellung optimiert bearbeitet. Bei diesem Experiment wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

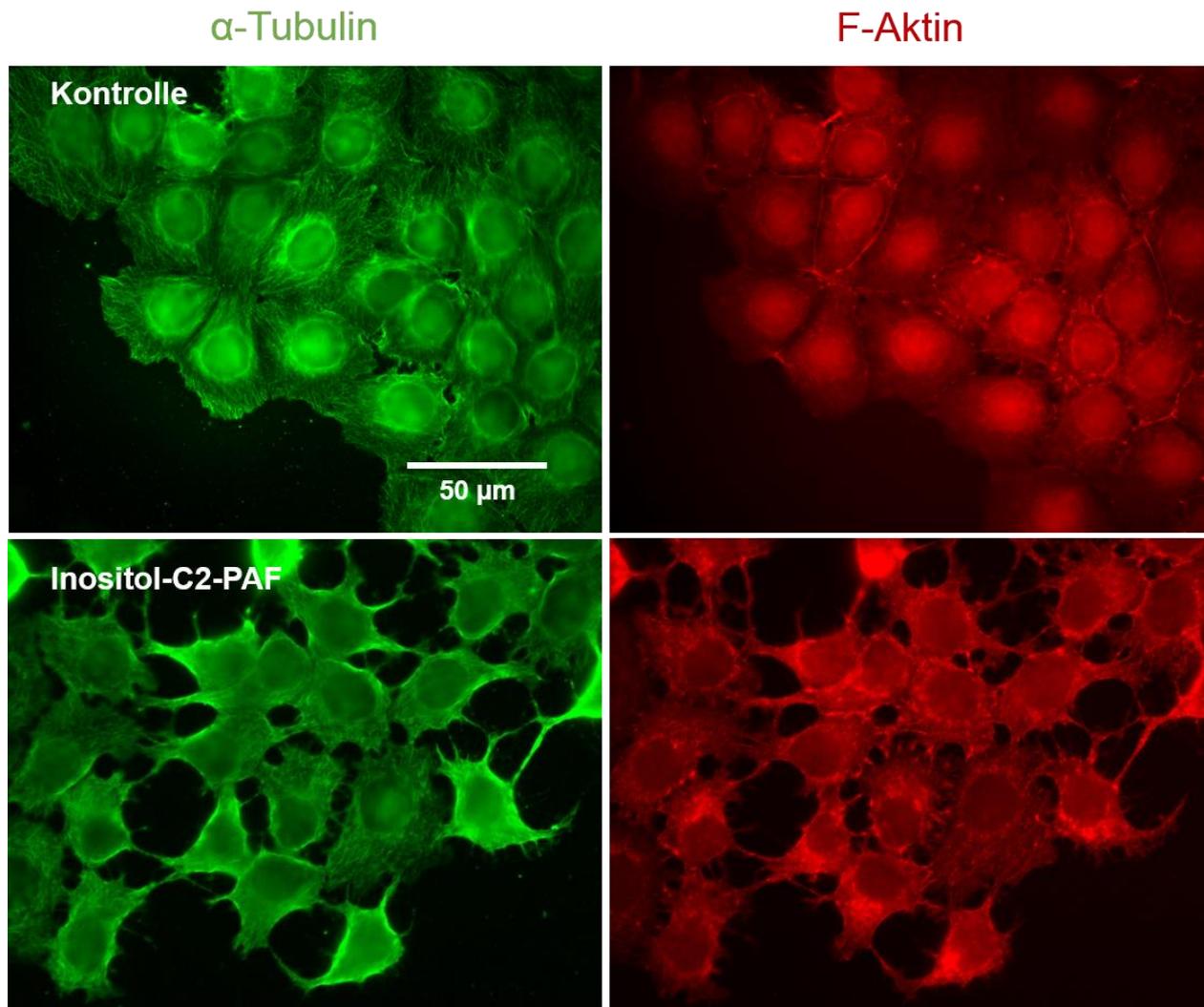


Abbildung 6: Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Morphologie von MCF-7-Zellen

MCF-7-Zellen wurden zur Betrachtung ihrer Morphologie über 24 h mit 2,5 µM Inositol-C2-PAF inkubiert und unter indirekter Immunfluoreszenz deren Zytoskelettproteine α -Tubulin und F-Aktin (10) dargestellt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Dieser der Veranschaulichung dienende Versuch wurde einmal durchgeführt. Fotos wurden zur jeweiligen bestmöglichen Darstellung optimiert bearbeitet.

3.2 Inhibition der Migration von MCF-7-Zellen durch Inositol-C2-PAF

In bereits publizierten Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl das ATL Edelfosin als auch das strukturähnliche Ohmlin die Migration von Kolonkarzinomzellen beziehungsweise Urothelkarzinomzellen inhibieren können (82,85,86). Auch in Studien mit Inositol-C2-PAF konnte bereits eine Hemmung der Migration von Keratinozyten über einen Kollagen IV-Gradienten sowie in Wundheilungsassays nachgewiesen werden (2). Ob Inositol-C2-PAF auch einen hemmenden Effekt auf die Migration von MCF-7-Zellen hat, sollte im Rahmen dieser Arbeit herausgefunden

werden.

Da es sich bei den MCF-7-Zellen im Vergleich um eine eher weniger stark invasive Zellreihe handelt (3), sollten die MCF-7-Zellen durch Nutzung verschiedener Stimulanzen in einen aggressiveren und stärker proliferierenden EMT- oder EMT-ähnlichen Zustand gebracht werden und in diesem Zustand mit der zusätzlichen Gabe von Inositol-C2-PAF verglichen werden. So wurde beschrieben, dass die Inkubation von MCF-7-Zellen mit IL-6 einen EMT-Phänotyp induziert (27) und dass die zusätzliche Inkubation von CCL2 mit IL-6 bei NSCLC-Zellen einen synergistischen Effekt bei der Anzahl der Zellen, die eine EMT durchlaufen, hervorruft (17). Angelehnt an die Studien von Chen et al. (2015) und Sullivan et al. (2009) wurden eine Inkubationszeit von 24 h und eine Konzentration von 50 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml CCL2 in jenen Experimenten für die folgenden hier gezeigten Versuche übernommen (für Details siehe Kapitel 4.3) (17,27).

Zunächst wurde ein Wundheilungsassay durchgeführt, bei dem MCF-7-Zellen nach Setzen einer Wunde in einem Zellrasen mit 5 μ M Inositol-C2-PAF stimuliert oder unbehandelt belassen wurden. Mit dem Lichtmikroskop wurden nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h jeweils an den identischen Stellen Fotos aufgenommen und mithilfe der Software ImageJ die zusammengewachsene Fläche in mm^2 nach 3 h, 6 h und 24 h bestimmt und mit dem Wert der Anfangsfläche verglichen.

Nach 3 h und 6 h ließen sich noch keine Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Inositol-C2-PAF-behandelten Zellen im Zusammenwachsen der Wundfläche feststellen (Abb. 7a). Nach 24 h zeigte sich, dass die zusammengewachsene Fläche von unbehandelten Zellen 0,300 mm^2 betrug. In mit Inositol-C2-PAF behandelten Zellen reduzierte sich diese Fläche auf 0,257 mm^2 . Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Beispielhafte Wundflächen zu den Zeitpunkten 1 h und 24 h nach Zufügen der Wunde von Kontrollzellen und Inositol-C2-PAF-behandelten Zellen sind in Abb. 7c dargestellt.

Im Rahmen dieses experimentellen Ansatzes wurde auch der Einfluss von IL-6 und CCL2 auf den Wundverschluss in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF untersucht (Abb. 7b). Auch hier ließen sich nach 3 h und 6 h noch keine deutlichen Unterschiede in der Wundheilung zwischen den Ansätzen feststellen. Nach 24 h erhöhte sich die zugewachsene Fläche bei den Ansätzen mit IL-6 und der Kombination von IL-6 und CCL2 gegenüber unbehandelten Zellen (0,300 mm^2) am stärksten auf 0,319 mm^2 für IL-6 beziehungsweise 0,352 mm^2 für IL-6 und CCL2. Mit 0,298 mm^2 blieb die zugewachsene Fläche bei dem Ansatz mit CCL2 nach 24 h im etwa gleichen Wertebereich wie bei der Kontrolle.

Außerdem kam es bei allen Ansätzen, bei denen Inositol-C2-PAF zusätzlich hinzugefügt wurde, zu einer Verminderung des Zusammenwachsens der Wundfläche. In Kombination mit IL-6 reduzierte sich die Fläche von 0,319 mm^2 auf 0,254 mm^2 und mit CCL2 von 0,298 mm^2 auf 0,282 mm^2 . Den deutlichsten Effekt hatte Inositol-C2-PAF in der Kombination mit CCL2 und IL-6. Hier

verringerte sich die zusammengewachsene Fläche statistisch signifikant von 0,352 mm² auf 0,235 mm².

Damit blieb ein erhöhter Wundverschluss durch IL-6 und CCL2 in der Tendenz zu sehen, dieser war aber nicht statistisch signifikant. Für Inositol-C2-PAF war die Tendenz zu beobachten, dass es einen hemmenden Einfluss auf das Zusammenwachsen der Zellen hatte. Da Inositol-C2-PAF in diesem Wundheilungsassay den stärksten und auch einzig statistisch signifikanten Effekt im Versuchsansatz mit CCL2 und IL-6 hatte, wurde diese Kombination für den nun beschriebenen haptotaktischen Migrationsassay weiterverwandt.

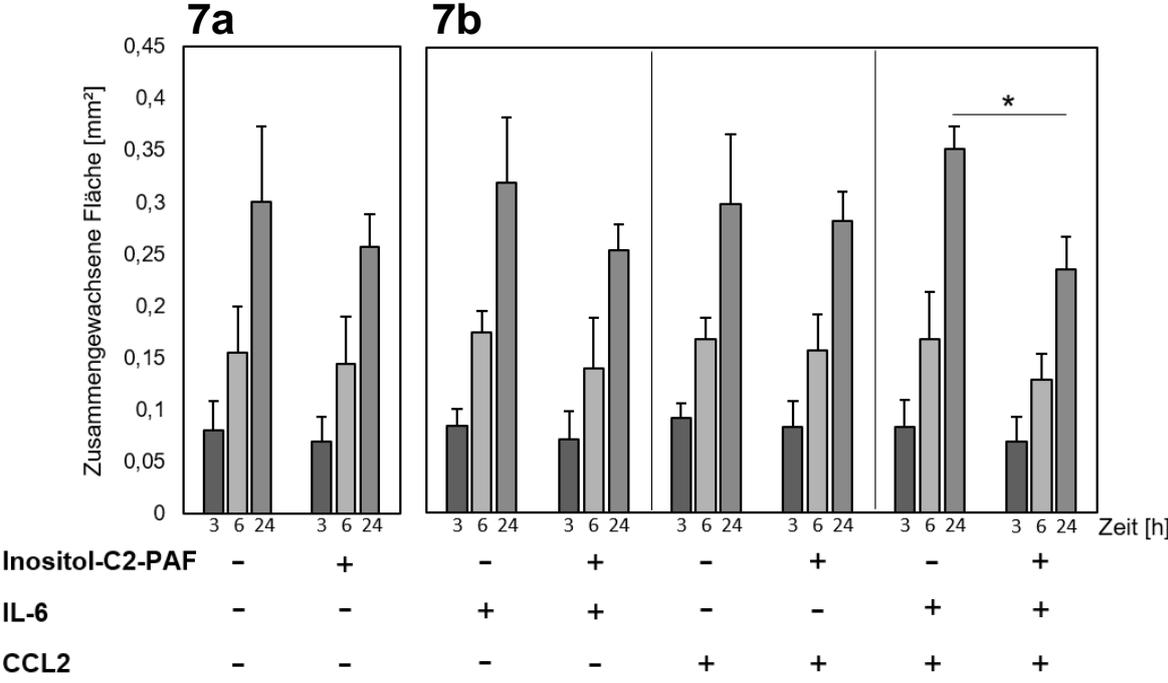
Um einen möglichen Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Motilität von MCF-7-Zellen detaillierter zu untersuchen, wurde ein haptotaktischer Migrationsassay durchgeführt. Hier wanderten MCF-7-Zellen 24 h über einen mit Kollagen I beschichteten Filter von der Ober- auf die Unterseite des Filters. Anschließend wurden die Zellen nach Fixierung und Färbung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Stimuliert wurden die Zellen mit je 50 ng/ml CCL2 und IL-6 in An- und Abwesenheit von 5 µM Inositol-C2-PAF. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. In diesem experimentellen Ansatz wurden die Zellen zusätzlich mit 100 ng/ml IGF-1 behandelt.

Für den Wachstumsfaktor IGF-1 konnte bereits gezeigt werden, dass er sich für die Entwicklung einer EMT und damit die Metastasierung von Mammakarzinomen verantwortlich zeichnet (6). Sowohl Liao et al. (2014) als auch Sarkissyan et al. (2014) konnten zeigen, dass IGF-1 einen positiven Einfluss auf die Auslösung einer EMT (48) beziehungsweise die Erhöhung der Invasion und Proliferation (46) bei MCF-7-Zellen bewirken kann. Eine Inkubationszeit von 24 h und eine Konzentration von 100 ng/ml wurden für IGF-1 angelehnt an die Studien von Liao et al. (2014) und Sarkissyan et al. (2014) für die folgenden Versuche übernommen (für Details siehe Kapitel 4.2) (46,48).

Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt, dass die Kombination von IL-6 und CCL2 die Migration von MCF-7-Zellen im Vergleich zur Migration der Kontrollzellen auf 121 % erhöhte (Abb. 8a). Auch IGF-1 bewirkte eine geringe Erhöhung der Migration auf 107 %. Die zusätzliche Gabe von Inositol-C2-PAF reduzierte die relative Anzahl der migrierten Zellen auf 93,7 % für CCL2 und IL-6 und 72,4 % für IGF-1. Diese Ergebnisse stellen jeweils nur eine Tendenz dar, der die statistische Signifikanz fehlt. Auch der Unterschied im Vergleich der beiden Ansätze mit Stimulation mit IGF-1 mit und ohne Inositol-C2-PAF zeigte nach Bonferroni-Korrektur ($p < 0,0125$ ($0,05/4$)) keine Signifikanz ($p = 0,036$).

Um Hinweise zu erhalten, ob die gewählten Mediatoren einen Einfluss auf die EMT haben könnten, wurde im Western Blot-Verfahren die Expression des EMT-Markers E-Cadherin (15) in MCF-7-Zellen, die mit IL-6, IL-6 und CCL2 sowie IGF-1 in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF inkubiert wurden, untersucht. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Inkubationszeit und Konzentration der Mediatoren entsprachen denen in den vorherbeschriebenen

Migrationsversuchen. β -Aktin diene als Proteinladekontrolle (114). In diesem Versuch sollte der Verlust von E-Cadherin einen Hinweis auf eine mögliche EMT geben (15), jedoch wurde in keinem der Ansätze Unterschiede der E-Cadherinmenge erfasst (Abb. 8b). Damit erscheint eine komplette EMT der MCF-7-Zellen unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich.



7c

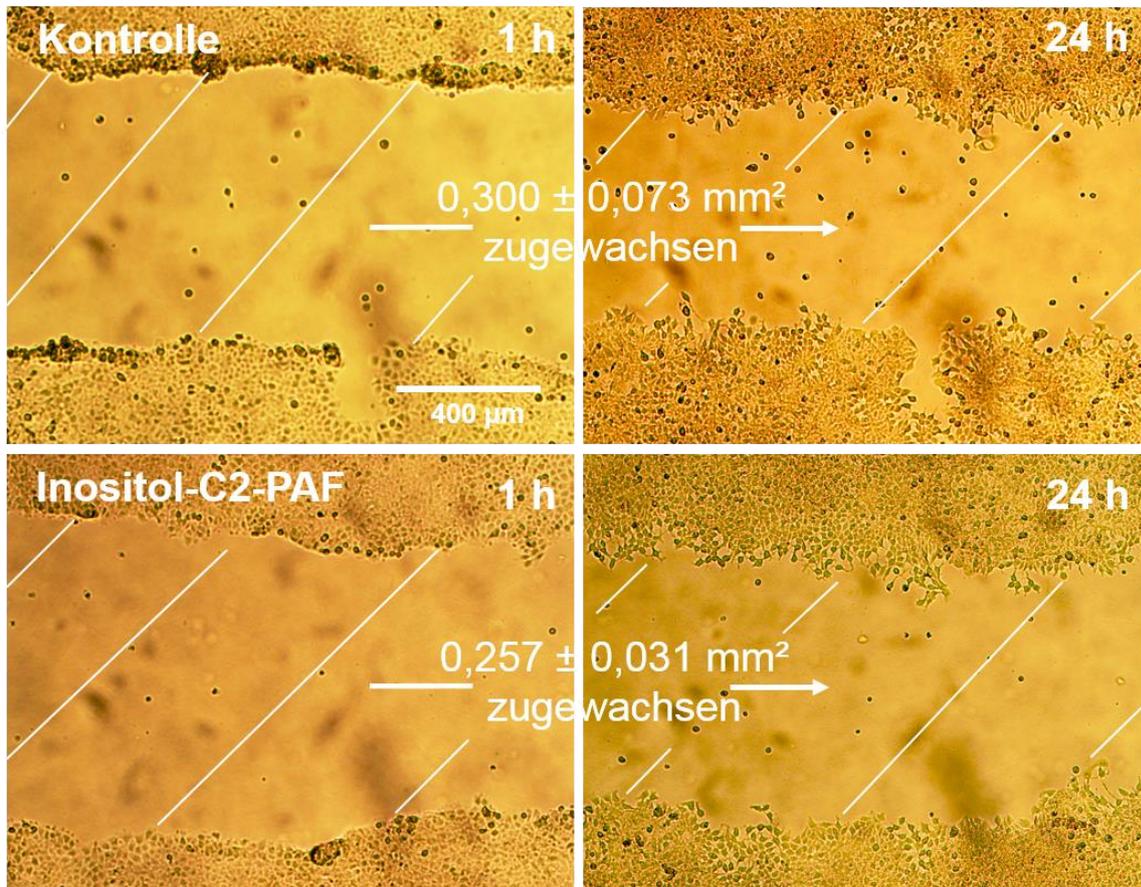
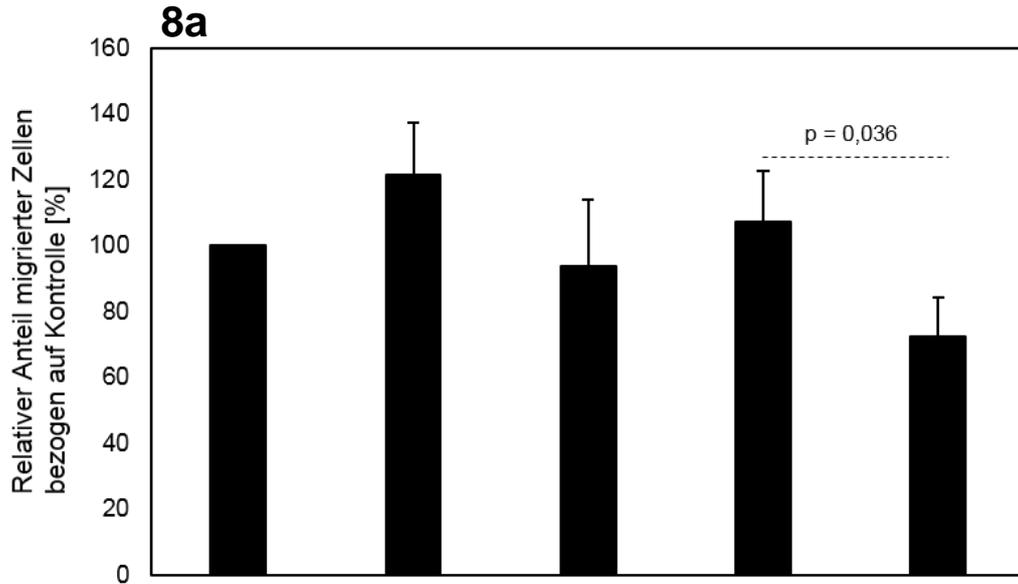
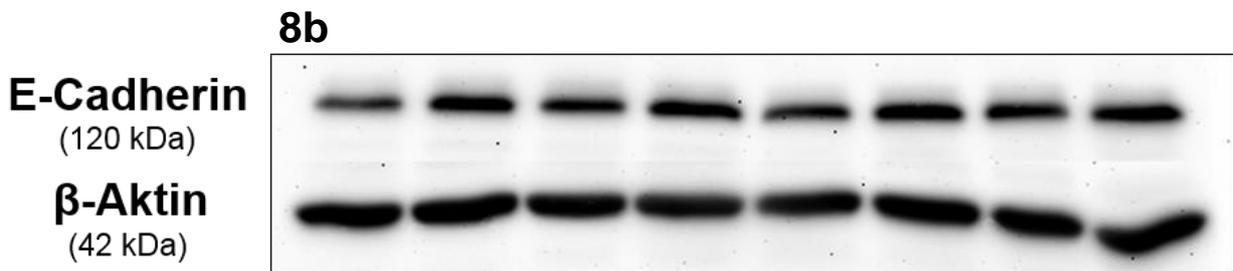


Abbildung 7: Migration von MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF in einem Wundheilungssassay

MCF-7-Zellen wurden zur Ermittlung ihres Migrationsverhaltens nach Setzen einer Wunde in einen Zellrasen über 24 h mit 5 µM Inositol-C2-PAF stimuliert oder unbehandelt belassen. Nach 1 h, 3 h, 6 h und 24 h wurden mit dem Lichtmikroskop jeweils an denselben Stellen Fotos geschossen und somit durch Nutzung der Software ImageJ die zusammengewachsene Fläche in mm² nach 3 h, 6 h und 24 h bestimmt und verglichen (a, c). Dieselbe Methode wurde für einen weiteren Versuch genutzt, in dem MCF-7-Zellen mit 50 ng/ml IL-6 oder/und 50 ng/ml CCL2 stimuliert wurden. Dies geschah sowohl in An- als auch Abwesenheit von 5 µM Inositol-C2-PAF (b). Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung. * bezeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied unter Beachtung der Bonferroni-Korrektur ($p < 0,007$ ($0,05/7$)). Fotos wurden zur jeweiligen bestmöglichen Darstellung optimiert bearbeitet. In c ist ein repräsentatives Beispiel von unbehandelten und mit Inositol-C2-PAF behandelten Zellen dargestellt. Bei diesem Experiment wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.



Inositol-C2-PAF	-	-	+	-	+
IL-6	-	+	+	-	-
CCL2	-	+	+	-	-
IGF-1	-	-	-	+	+



Inositol-C2-PAF	-	+	-	+	-	+	-	+
IL-6	-	-	+	+	-	-	+	+
CCL2	-	-	-	-	-	-	+	+
IGF-1	-	-	-	-	+	+	-	-

Abbildung 8: Migration von MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF in einem haptotaktischen Migrationsassay und Expression des EMT-Markers E-Cadherin

MCF-7-Zellen wurden zur Ermittlung ihres Migrationsverhaltens unter Inositol-C2-PAF über eine mit Kollagen I beschichtete Filtermembran 24 h stimuliert oder unbehandelt belassen (a). Nachfolgend konnten die migrierten Zellen durch Fixierung und Kristallviolett-Färbung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und die Ergebnisse statistisch verglichen werden. Stimuliert wurden die Zellen über 24 h in An- und Abwesenheit von 5 μ M Inositol-C2-PAF mit je 50 ng/ml IL-6 und CCL2 oder 100 ng/ml IGF-1. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede wurden unter Beachtung der Bonferroni-Korrektur betrachtet ($p < 0,0125$ (0,05/4)). Relevante p-Werte mit $p < 0,05$ wurden mit angegeben.

Zur Ermittlung der Expression von dem EMT-Marker E-Cadherin (15) unter Inositol-C2-PAF bei MCF-7-Zellen wurden Proteinmengenbestimmungen von E-Cadherin sowie der Ladekontrolle β -Aktin (114) mittels Western-Blot durchgeführt

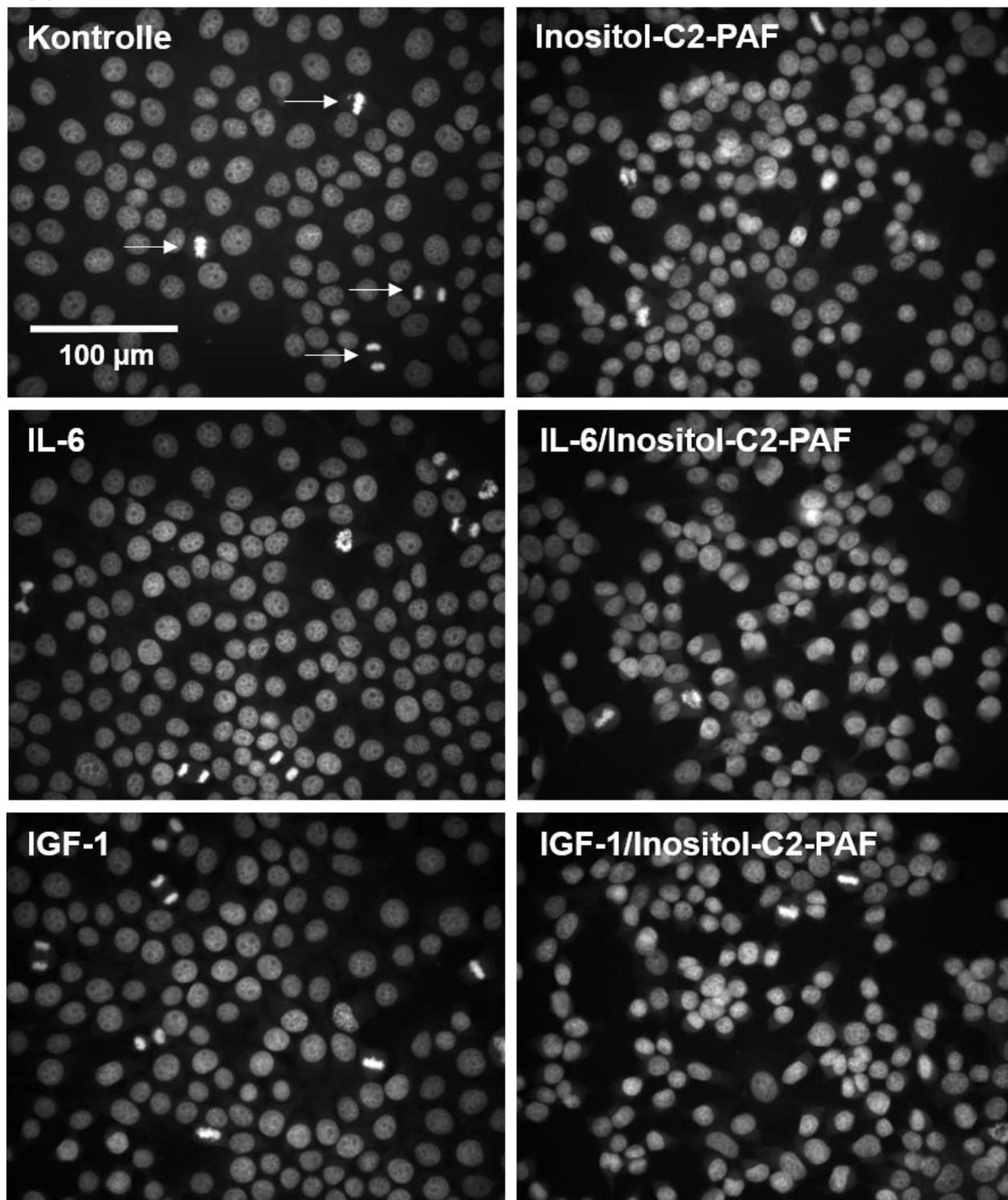
(b, ein repräsentatives Beispiel ist hier gezeigt). Stimuliert wurden die Zellen 24 h mit 5 μ M Inositol-C2-PAF. In Kombination mit Inositol-C2-PAF oder allein kamen folgende Stimulanzien zum Einsatz: IGF-1 (100 ng/ml) und IL-6 (50 ng/ml) mit und ohne CCL2 (50 ng/ml). Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Bei diesen Experimenten wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt.

3.3 Inhibition der Proliferation von MCF-7-Zellen durch Inositol-C2-PAF

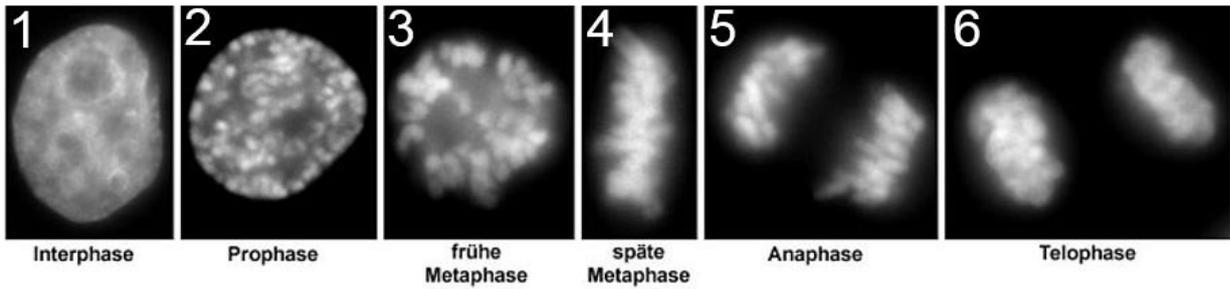
Neben der durch die EMT bedingte morphologische Änderung weisen metastasierende Zellen auch eine verstärkte Proliferationsneigung auf (15). Aufgrund ihrer Wirkungsweise in der Aktivierung ihrer beiden Haupt-Signaltransduktionswege IL-6/STAT3 und PI3K/AKT haben sowohl IL-6 als auch IGF-1 auch Einfluss auf den Zellzyklus beziehungsweise die Proliferation der Tumorzellen (6,36,115).

Um zu testen, ob Inositol-C2-PAF die Wachstumsfaktor-induzierte Zellproliferation beeinflussen kann, wurde ein Zellproliferationsassay entwickelt. Hierfür wurden die MCF-7-Zellen für 24 h in An- beziehungsweise Abwesenheit von 2,5 μ M Inositol-C2-PAF und mit 50 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml IGF-1 stimuliert. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Zellkerne durch Hoechst 33342 angefärbt. Dann erfolgte die Analyse der in Teilung befindlichen Zellen am Fluoreszenzmikroskop. Über diesen viermal durchgeführten Versuch wurden pro Ansatz jeweils zwischen 5500 und 6300 Zellen erfasst. Beispielhafte Bilder der verschiedenen Ansätze sind in Abb. 9a gezeigt. In den unbehandelten Zellen weisen Pfeile exemplarisch auf die sich in Teilung befindlichen Zellen. Grundsätzlich wurden solche Zellen als sich in Teilung befindend berücksichtigt, die sich in der Prophase, der Metaphase, der Anaphase oder der Telophase befinden (Abb. 9b). Zellen in Zytokinese wurden nicht berücksichtigt. Abb. 9c stellt nun die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze dar, in denen der relative Anteil der Mitosen bezogen auf die Gesamtzellzahl in Prozent angegeben werden. Es zeigt sich hier, dass im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen (3,75 %) sowohl bei dem Ansatz, in dem die Zellen mit IGF-1 als auch bei dem Ansatz, in dem die Zellen mit IL-6 stimuliert wurden, der Anteil der in Mitose befindlichen Zellen auf 5,5 % beziehungsweise auf 4,7 % stieg. Die statistische Auswertung zeigt, dass IGF-1 die Proliferation der Zellen signifikant erhöhte. Die durch IL-6 verursachte Erhöhung der Proliferation mit $p = 0,045$ hingegen war nach Bonferroni-Korrektur ($p < 0,01 (0,05/5)$) nicht signifikant. Bei den Zellen, die nur mit Inositol-C2-PAF stimuliert wurden, reduzierte sich die Anzahl der sich teilenden Zellen signifikant auf 2,5 %. Auch in den Ansätzen, in denen Inositol-C2-PAF zu mit IGF-1 oder IL-6 stimulierten Zellen hinzugegeben wurde, reduzierte sich die in Teilung befindliche Anzahl an Zellen signifikant auf 2,6 % beziehungsweise 2,5 %.

9a



9b



9c

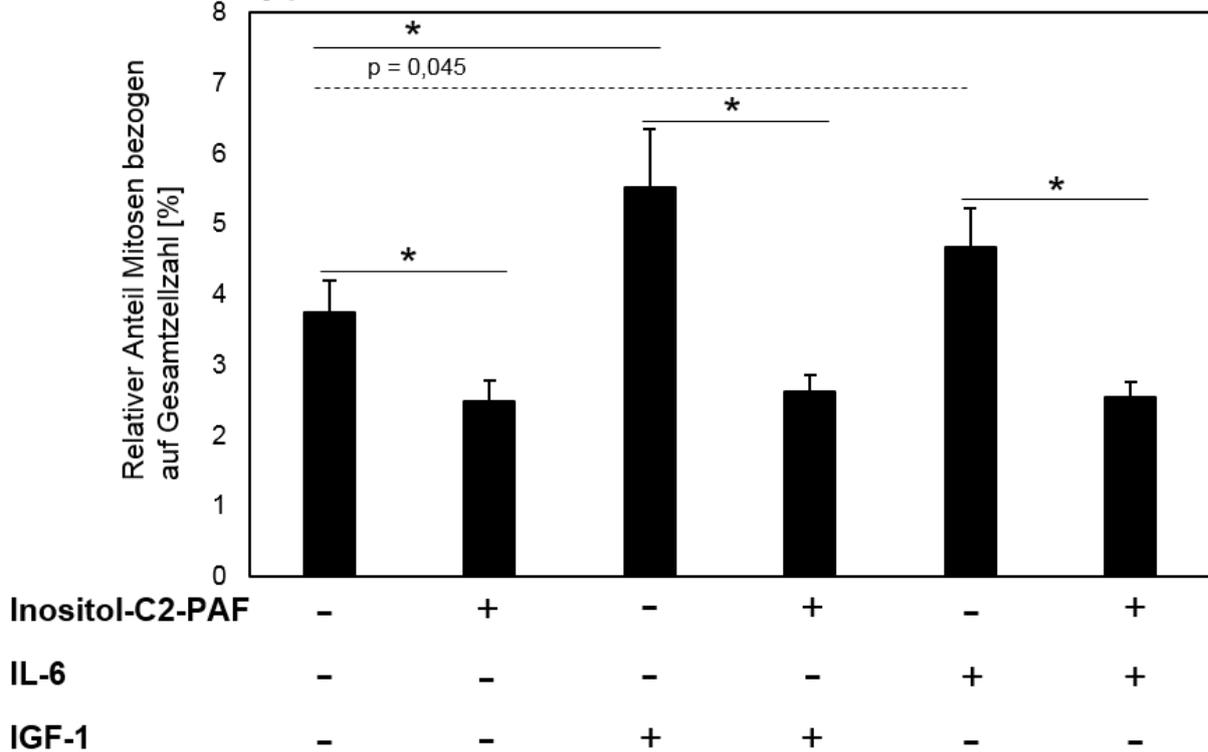


Abbildung 9: Proliferation von MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF in einem Proliferationsassay durch Anwendung indirekter Immunfluoreszenz

MCF-7-Zellen wurden zur Ermittlung ihrer Teilungsbereitschaft unter Inositol-C2-PAF nach Anfärbung der Zellnuklei mit Hoechst 33342 unter indirekter Immunfluoreszenz betrachtet und abgelichtet. Anschließend konnten die Nuklei ausgezählt und die in Teilung befindlichen Zellen bestimmt werden, wobei nur die die in Stadium 2 - 6 befindlichen Zellen berücksichtigt wurden, Zellen in Zytokinese wurden nicht mit eingeschlossen (a, beispielhafte Bilder der Immunfluoreszenz, Pfeile zeigen in unbehandelten Zellen als Muster dienend in Teilung befindliche Zellen an; b, Mitosestadien, Abb. modifiziert nach Dietzel (2007) (116). c zeigt die Ergebnisse der Zählung als relativen Anteil der sich teilenden Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl. Stimuliert wurden die Zellen 24 h allein mit 2,5 µM Inositol-C2-PAF und in An- und Abwesenheit hiervon mit 50 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml IGF-1. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung. * bezeichnet einen signifikanten Unterschied unter Verwendung der Bonferroni-Korrektur ($p < 0,01$ (0,05/5)). Weitere relevante p-Werte wurden mit angegeben. Fotos wurden zur jeweiligen bestmöglichen Darstellung optimiert bearbeitet. Dieser Versuch wurde viermal durchgeführt und pro Ansatz zwischen 5500 und 6300 Zellen gezählt.

3.4 Aktivitätsbestimmung von STAT3 und AKT sowie dessen Isoformen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF

3.4.1 Einleitung

Um zu überprüfen, ob die gewählten Mediatoren Signale in den MCF-7-Zellen induzieren können, wurde ihre Wirkung auch auf molekularer Ebene untersucht.

Hierzu wurden zunächst die beiden Hauptsignalwege, die durch IL-6 und IGF-1 aktiviert werden, der IL-6/STAT3-Signalweg (36) und der PI3K/AKT-Signalweg (6), betrachtet. Der Fokus lag dabei auf der Bestimmung der jeweils gut charakterisierten Signalmoleküle STAT3 und AKT (6,36).

Für das Chemokin CCL2 konnten Chen et al. (2015) zeigen, dass in NSCLC-Zellen die IL-6 vermittelte Aktivierung von seinem Hauptsignalweg über STAT3 durch Phosphorylierung durch CCL2 noch synergistisch gesteigert werden konnte und dass CCL2 und IL-6 sich sogar gegenseitig in einer Verstärkungsschleife zusätzlich selbst induzierten und eine erhöhte STAT3-Aktivität aufrechterhielten (17). Daher sollte auch für CCL2 in Kombination mit IL-6 dieser Signalweg über die Aktivierung durch Phosphorylierung von STAT3 überprüft werden.

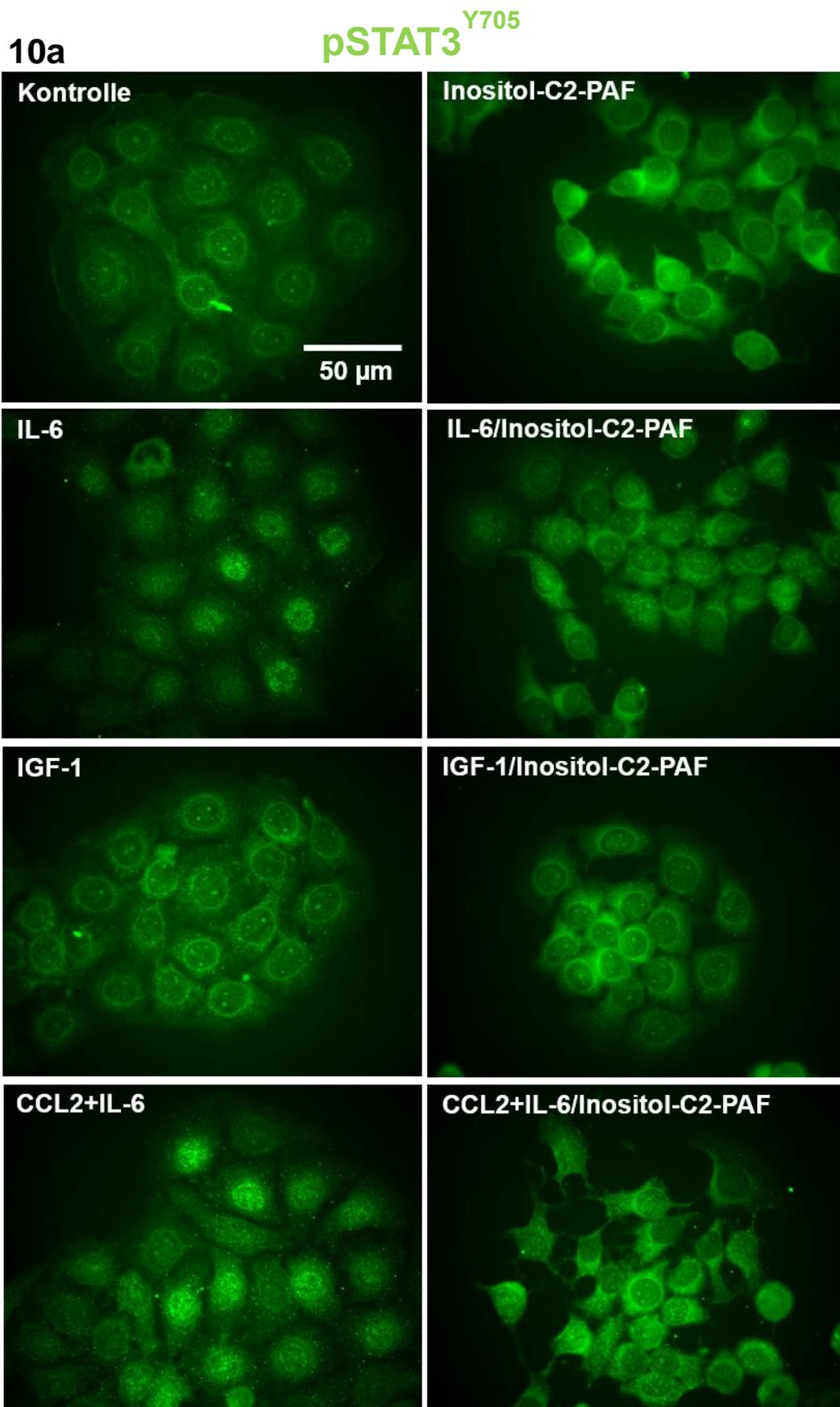
Unter Kontrollbedingungen sind STAT3 (40,41) und AKT (48,67) in MCF-7-Zellen nicht phosphoryliert, sodass nach Stimulation durch CCL2 und IL-6 beziehungsweise IGF-1 das Ausmaß der Wirkung von Inositol-C2-PAF durch Vergleich mit unstimulierten Zellen deutlich gezeigt werden sollte.

Es wurden im Folgenden Versuche zur Proteinexpressionsbestimmungen mittels Western Blot-Analyse von STAT3/pSTAT3^{Y705} und AKT/pAKT^{S473} und die Betrachtung spezieller Ausprägungen der Proteine pSTAT3^{Y705} und pAKT^{S473} unter indirekter Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. Die Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 gilt dabei als entscheidender Phosphorylierungsort für dessen Aktivität (37), während die Phosphorylierung von AKT an Ser473 zu einer Aktivierungsverstärkung und zur Stabilisierung des Aktivierungsstatus der Kinase und die Phosphorylierung an Thr308 als erforderlich für die Aktivierung gilt (52).

3.4.2 Aktivitätsbestimmung von STAT3

Zunächst wurde die Auswirkung von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung von STAT3 untersucht. MCF-7-Zellen wurden hierzu über 24 h mit 2,5 µM (indirekte Immunfluoreszenz) beziehungsweise 5 µM (Western Blot) Inositol-C2-PAF stimuliert. Weitere Stimulanzien kamen

für die verschiedenen Ansätze allein oder in Kombination mit Inositol-C2-PAF zur Anwendung: IGF-1 (100 ng/ml) sowie IL-6 (50 ng/ml) mit und ohne CCL2 (50 ng/ml). Unbehandelte Zellen wurden jeweils als Kontrolle mitgeführt. Abb. 10b zeigt einen repräsentativen Blot von STAT3, der phosphorylierten und somit aktivierten Form pSTAT3^{Y705} (36) sowie β -Aktin, das als Proteinladekontrolle (114) mitgeführt wurde. Während sich an der Gesamtmenge des STAT3-Proteins über die verschiedenen Ansätze keine Unterschiede nachweisen ließen, war der Phosphorylierungszustand unterschiedlich. In der Kontrolle war keine Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 nachweisbar. Die Stimulation mit IGF-1 ergab auch keine vermehrte Phosphorylierung. Die Stimulation mit IL-6 mit und ohne CCL2 zeigte hingegen eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705 auf ein etwa gleiches Niveau. Die gleichzeitige Gabe von Inositol-C2-PAF reduzierte die Menge an phosphoryliertem STAT3, jedoch nicht auf das Ausgangsniveau der Kontrolle. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Analyse von pSTAT3^{Y705} in der indirekten Immunfluoreszenz unter den genannten Bedingungen (Abb. 10a). Das inaktive STAT3 befindet sich im Zytosol der Zellen, während die aktive phosphorylierte Form im Zellkern zu finden ist und dort als Transkriptionsfaktor wirkt (36). Diese Analyse zeigt, dass sich unter Kontrollbedingungen pSTAT3^{Y705} nicht im Zellkern befindet, sondern im Zytosol perinukleär lokalisiert ist. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch nach Stimulation mit IGF-1. Die Behandlung mit Inositol-C2-PAF verstärkte die perinukleäre Akkumulation von pSTAT^{Y705}, der Kern wurde unter diesen Bedingungen nicht mehr so stark angefärbt. In den beiden Ansätzen mit IL-6 mit und ohne CCL2 war vermehrt pSTAT3^{Y705} im Zellkern lokalisiert. Übereinstimmend mit den Daten des Western Blots zeigte sich auch hier in Anwesenheit von Inositol-C2-PAF eine jeweilige Reduktion der Kernlokalisation.



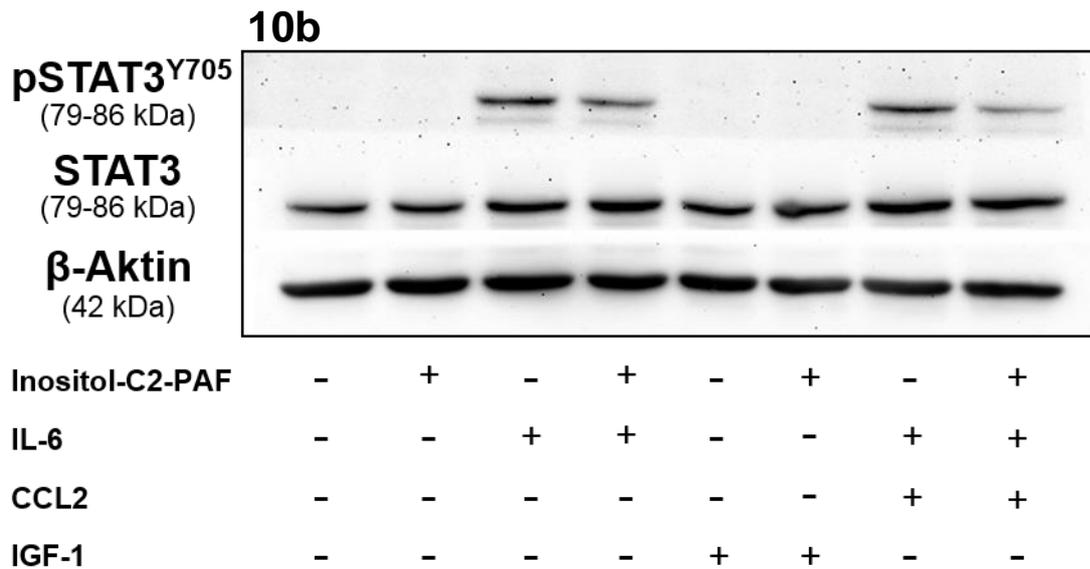


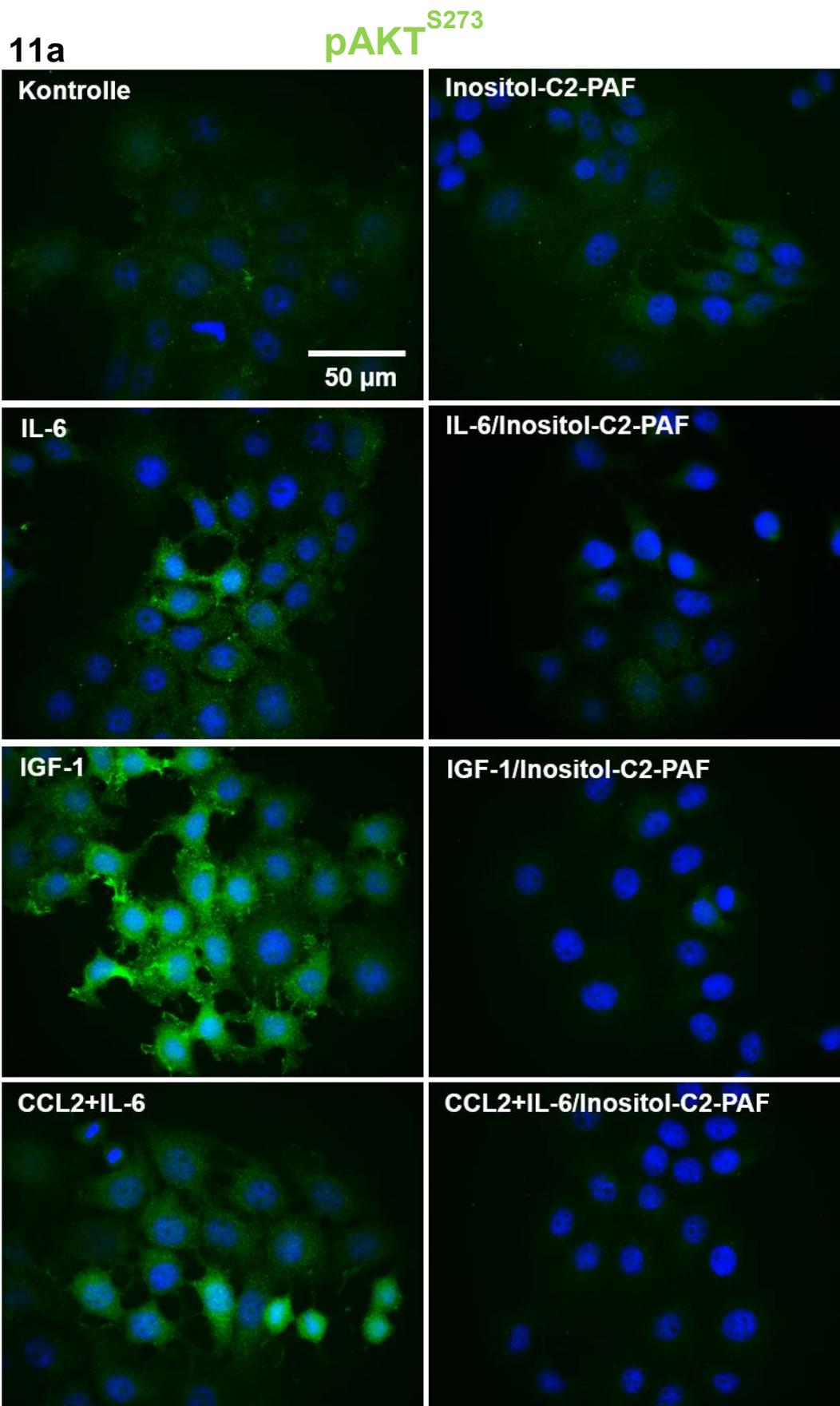
Abbildung 10: Bestimmung der Proteinmenge von pSTAT3^{Y705} bei MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF via Western Blot und indirekter Immunfluoreszenz

Zur Ermittlung der Phosphorylierung von STAT3 unter Inositol-C2-PAF bei MCF-7-Zellen wurden Bestimmungen der Proteinmenge von pSTAT3^{Y705} und STAT3 sowie der Ladekontrolle β-Aktin (114) mittels Western Blot durchgeführt (b, ein repräsentatives Beispiel ist gezeigt). Zur beispielhaften Veranschaulichung dieser Ergebnisse wurde die Menge von an sich in den Zellkernen befindlichem pSTAT3^{Y705} einmalig unter indirekter Immunfluoreszenz betrachtet (a). Stimuliert wurden die Zellen 24 h mit 2,5 μM (indirekte Immunfluoreszenz) bzw. 5 μM (Western-Blot) Inositol-C2-PAF. In Kombination mit Inositol-C2-PAF oder allein kamen folgende Stimulanzien zum Einsatz: IGF-1 (100 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml) mit und ohne CCL2 (50 ng/ml). Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Immunfluoreszenz-Bilder sind zur bestmöglichen Illustration der Zellkerne unterschiedlich optimiert bearbeitet. Bei diesem Experiment wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

3.4.3 Aktivitätsbestimmung von AKT

Als nächstes wurde auf molekularer Ebene der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung und damit Aktivierung von AKT untersucht (52). MCF-7-Zellen wurden abermals über 24 h mit 2,5 μM (indirekte Immunfluoreszenz) beziehungsweise 5 μM (Western Blot) stimuliert. Des Weiteren kamen wieder folgende Stimulanzien allein oder in Kombination mit Inositol-C2-PAF zum Einsatz: IGF-1 (100 ng/ml) sowie IL-6 (50 ng/ml) mit und ohne CCL2 (50 ng/ml). Unbehandelte Zellen wurden jeweils als Kontrolle mitgeführt. In Abb. 11b ist nun jeweils ein repräsentatives Beispiel eines Western Blots von AKT, der phosphorylierten, aktivierten Form pAKT^{S473} (52) sowie β-Aktin als Proteinladekontrolle (114) dargestellt. Während sich an der Gesamtmenge an AKT über die verschiedenen Ansätze keine Unterschiede nachweisen ließen, änderte sich dies jedoch bei der phosphorylierten, aktivierten Form (52). Eine gewisse Grundaktivität bestand schon in den unbehandelten Zellen. Diese ließ sich jedoch durch Stimulation unterschiedlich stark verändern. Sowohl IL-6 allein als auch die Kombination mit CCL2 sorgten bereits für eine verstärkte Phosphorylierung. Am deutlichsten wurde diese aber durch die Stimulation mit IGF-1. Hier zeigte sich die stärkste Bande. Setzte man hingegen

Inositol-C2-PAF zu den Zellen hinzu, verringerte sich bei gleichbleibender Gesamtmenge AKT die Phosphorylierung von AKT. Besonders deutlich wurde dies, wenn Inositol-C2-PAF den anderen Stimulanzen IL-6, CCL2 und IGF-1 zugefügt wurde. In all diesen Ansätzen wurde die Ausprägung von pAKT^{S473} mindestens auf etwa das Niveau der unbehandelten Zellen reduziert. Dieser Eindruck wurde durch die Betrachtung von pAKT^{S473} unter einer einmalig durchgeführten indirekten Immunfluoreszenz-Analyse bei den verschiedenen Ansätzen veranschaulicht (Abb. 11a). Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zeigte sich, dass sich durch Stimulation mit IGF-1 und IL-6 mit und ohne CCL2 die gleiche Tendenz wie in der Western Blot-Analyse abzeichnete und eine Erhöhung der Phosphorylierung von AKT zu beobachten war, die auch hier unter Stimulation mit IGF-1 am stärksten ausgeprägt war und weniger stark unter IL-6 mit und ohne CCL2. Auch zeigte die indirekte Immunfluoreszenz-Analyse eine Reduktion der Phosphorylierung von AKT in allen Ansätzen in denen Inositol-C2-PAF zugefügt wurde, mindestens auf das Niveau der unbehandelten Zellen.



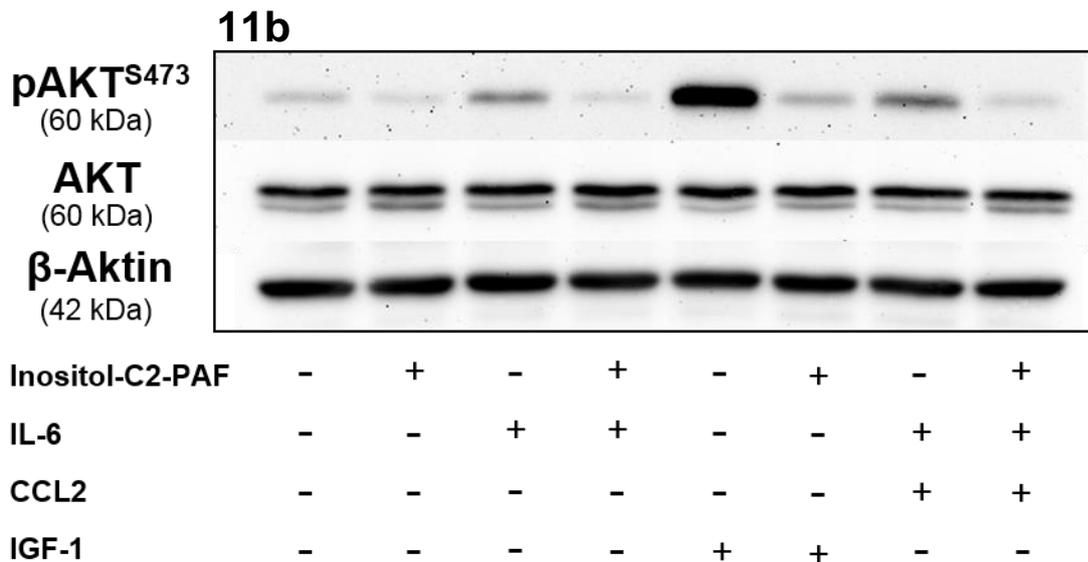


Abbildung 11: Bestimmung der Proteinmenge von pAKT^{S473} bei MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF via Western Blot und indirekter Immunfluoreszenz

Zur Ermittlung der Phosphorylierung von AKT unter Inositol-C2-PAF bei MCF-7-Zellen wurden Bestimmungen der Proteinmenge von pAKT^{S473} und AKT sowie der Ladekontrolle β-Aktin (114) mittels Western-Blot durchgeführt (b, ein repräsentatives Beispiel ist hier gezeigt). Zur beispielhaften Veranschaulichung dieser Ergebnisse wurde die Menge an sich in den Zellen befindlichem pAKT^{S473} einmalig unter indirekter Immunfluoreszenz betrachtet (a). Stimuliert wurden die Zellen 24 h mit 2,5 μM (indirekte Immunfluoreszenz) bzw. 5 μM (Western-Blot) Inositol-C2-PAF. In Kombination mit Inositol-C2-PAF oder allein kamen folgende Stimulanzen zum Einsatz: IGF-1 (100 ng/ml), IL-6 (50 ng/ml) mit und ohne CCL2 (50 ng/ml). Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Belichtung und Bearbeitung aller Immunfluoreszenz-Bilder erfolgten unter identischen Bedingungen. Bei diesem Experiment wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

3.4.4 Aktivitätsbestimmung der AKT-Isoformen

Die bisher vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf molekularer Ebene einen stärker hemmenden Effekt auf die Aktivierung von AKT als auf die Aktivierung von STAT3 hatte. Auch auf zellulärer Ebene zeigte Inositol-C2-PAF einen deutlich hemmenden Effekt auf den die Proliferation induzierenden Effekt durch IGF-1. Daher sollte die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung/Aktivierung von AKT weiter untersucht werden. Auch sollte die sich in der Western Blot-Analyse gezeigte Aktivierung von AKT durch IL-6 detaillierter analysiert werden (52).

Da von der Serin/Threonin-Kinase AKT insgesamt drei AKT-Isoformen existieren (AKT1, AKT2 und AKT3) sollte die Induktion dieser AKT-Isoformen durch die Stimulanzen IGF-1 und IL-6 bei den MCF-7-Zellen sowie der hemmende Effekt durch Inositol-C2-PAF auf diese Isoformen erforscht werden (54). Nach derzeitiger Kenntnislage der Literatur ist momentan bei MCF-7-Zellen nicht beschrieben, welche AKT-Isoformen durch IL-6 und IGF-1 phosphoryliert werden. Auch ist bisher nicht untersucht, welche AKT-Isoformen in ihrer Phosphorylierung durch ATLS beeinflusst werden.

Daher wurde zum einen als Überprüfung der bisherigen Resultate zusätzlich zur qualitativen Ebene mittels Western Blot-Analyse auf quantitativer Ebene zur Bestimmung der Wirkung von IL-6 und IGF-1 auf die Phosphorylierungen der AKT-Isoformen sowie deren Hemmung durch Inositol-C2-PAF die Methode der cIEF (NanoPro™ 100) angewandt. Hierbei wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt, unter UV-Licht an einer Kapillarwand immobilisiert und unter Zugabe eines Primär- und Sekundärantikörpers die durch die hinzugefügten Luminole und Peroxide entstehende Chemilumineszenz mit der integrierten CCD-Kamera detektiert (109). Der isoelektrische Punkt eines Proteins korrespondiert mit verschiedenen Iso- und Phosphoformen sowie anderen posttranslationalen Modifikationen (107). Dies konnte mithilfe des Computer-Programms *Compass* analysiert und grafisch dargestellt und letztlich durch Bildung von Integralen relativ quantifiziert werden (109,110). Da die pls der unterschiedlichen AKT-Isoformen anhand der Literatur bekannt sind (siehe unten), konnte in dem nachfolgenden Versuch rückgeschlossen werden, auf welche AKT-Isoformen der jeweilige Einfluss von IGF-1, IL-6 und Inositol-C2-PAF abzielt.

In diesem Versuch wurden MCF-7-Zellen 24 h unbehandelt als Kontrolle belassen, mit 100 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml IL-6 oder 5 µM Inositol-C2-PAF beziehungsweise mit IGF-1 oder IL-6 in Anwesenheit von Inositol-C2-PAF stimuliert. Die vorliegenden Daten ergeben sich aus zwei Versuchen mit je zwei technischen Replikaten, die statistisch unabhängig voneinander betrachtet wurden.

Wie in Abb. 12a ersichtlich, zeigte die detaillierte Analyse der Kurvenprofile eines hier beispielhaft dargestellten Versuchs, dass eine durch IGF-1 induzierte Erhöhung der Phosphorylierung von AKT auf einer Zunahme von pAKT^{S473}-Formen mit den pls 5.06, 5.14, 5.31, 5.42 und 5.53 beruhte, während sich dies bei der Behandlung mit IL-6 auf die Formen mit den pls 5.42 und 5.53 beschränkte. Es zeigte sich hier weiterhin, dass eine Behandlung mit Inositol-C2-PAF in allen Ansätzen zu einer Reduktion aller Spitzenwerte auf den Wert der Kontrolle oder sogar darunter führte.

Die Quantifizierung dieser einzelnen Profile ist in Abb. 12b dargestellt und demonstriert, dass IGF-1 die Phosphorylierung von AKT im Gegensatz zur Kontrolle nach Bonferroni-Korrektur ($p < 0,01$ ($0,05/5$)) signifikant etwa um den Faktor 10 erhöhte und IL-6 die Phosphorylierung von AKT etwa um den Faktor 2 erhöhte ($p = 0,011$). Eine Behandlung mit Inositol-C2-PAF reduzierte die Menge von phosphoryliertem AKT in den Ansätzen zusammen mit IGF-1 beziehungsweise IL-6 gegenüber denjenigen, in denen nur mit IGF-1 beziehungsweise IL-6 stimuliert wurde, signifikant bis auf ein Niveau unterhalb des unbehandelten Kontrollwertes. Auch die alleinige Anwendung mit Inositol-C2-PAF senkte die Menge an phosphoryliertem AKT auf ein niedrigeres Niveau als bei den unbehandelten Zellen herab ($p = 0,054$).

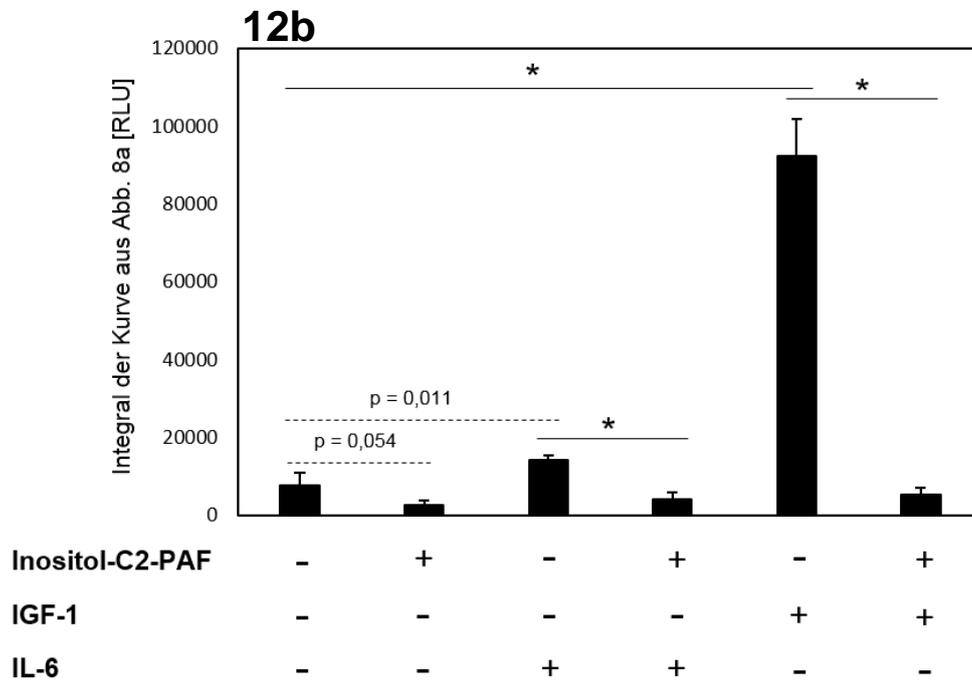
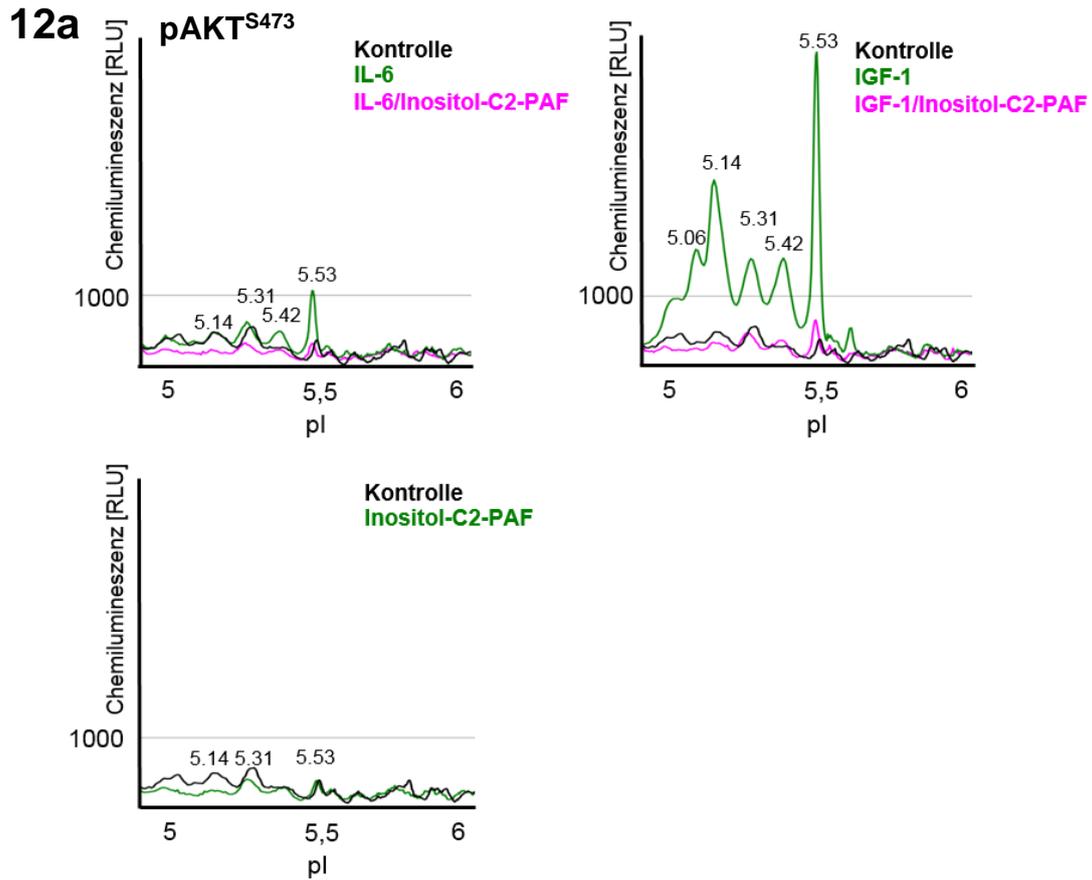


Abbildung 12: Kapillare isoelektrische Fokussierung zur quantitativen Bestimmung von pAKT^{S473} und der Bestimmung der Aktivierung der AKT-Isoformen bei MCF-7-Zellen unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF

Zur Ermittlung des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf die pIs bei pAKT^{S473} und somit auf die unterschiedlichen Isoformen von AKT (117) sowie zur quantitativen Bestimmung der Aktivierung von AKT wurde die Technik der kapillaren isoelektrischen Fokussierung angewandt (NanoPro™ 100). a zeigt dabei die Auftrennung der pIs der

unterschiedlichen Ansätze, gemessen anhand der Chemilumineszenz mittels Compass Software in relativen Lichteinheiten (relative light units, RLU). **b** stellt die Chemilumineszenz in RLU durch das Integral der Kurven aus **a** vergleichend in einem Diagramm dar. Es wurden in jedem Versuch die gleichen Belichtungszeiten verwendet. Die Zellen wurden über 24 h allein mit 5 μ M Inositol-C2-PAF und in An- und Abwesenheit hiervon mit 50 ng/ml IL-6 oder 100 ng/ml IGF-1 stimuliert. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung. * bezeichnet einen signifikanten Unterschied unter Verwendung der Bonferroni-Korrektur ($p < 0,01$ (0,05/5)). Weitere relevante p-Werte wurden mit angegeben. Die vorliegenden Werte ergeben sich aus zwei Versuchen mit je zwei technischen Replikaten, die statistisch unabhängig voneinander betrachtet wurden.

3.5 Aktivitätsbestimmung von Metaboliten *upstream* und *downstream* von AKT unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF

Zusätzlich zu der Bestimmung des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf die AKT-Isoformen sollte der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den PI3K/AKT-Signalweg noch genauer bestimmt werden. Dafür sollte die Aktivität verschiedener Moleküle *upstream* und *downstream* von AKT unbehandelt und unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF mittels Western Blot-Analyse beleuchtet werden. Ferner sollte die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf eine Phosphorylierung an einer weiteren Stelle von AKT untersucht werden.

Die bisher untersuchte Phosphorylierung von AKT an Ser473 ist für dessen Aktivierungsverstärkung sowie dessen Stabilisierung des Aktivierungsstatus von immenser Bedeutung, jedoch ist die Phosphorylierung an Thr308 die eigentlich notwendige Phosphorylierungsstelle für die Aktivierung von AKT (52). Daher sollte der Einfluss auch auf dieses Phosphorylierungsereignis gezeigt werden.

Upstream von AKT wurden die Phosphatase PTEN, die PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert, sodass AKT in der Signalkaskade nicht mehr an PIP3 binden kann, wo es aktiviert würde, und PDK1, welches AKT an Thr308 phosphoryliert und damit aktiviert, betrachtet (52). Während die Phosphorylierung von PTEN an Ser380, Thr382 und Thr383 dessen Phosphatase-Aktivität inhibiert, seine Konformation stabilisiert und seine Lokalisierung an der Plasmamembran reduziert (118), ist die Phosphorylierung von Ser241 an PDK1 essentiell für dessen Aktivität (119).

Downstream von AKT sollte die Aktivierung von mTORC1, welches durch die inhibierende Wirkung von AKT auf TSC2 und PRAS40 letztlich phosphoryliert und damit aktiviert wird, untersucht werden (55). Ferner sollte die Phosphorylierung des RB-Proteins, einem zentralen Regulator des Zellzyklus, an Ser795 und Ser807/811 betrachtet werden (59). Das RB-Protein steht sehr tief *downstream* in der Signalkaskade von AKT und wird über mehrere Auswirkungen von AKT (zum Beispiel die Phosphorylierung von MDM2 (54) oder p21 (60) affektiert. Dies führt letztlich zur Phosphorylierung des RB-Proteins durch den Cyclin-D/CDK4/6-Kinasekomplex,

womit das RB-Protein nun nicht mehr den E2F inaktiviert, welcher somit die S-Phase einleitet (24). Da der Grad der Hyperphosphorylierung die Inaktivierung des RB-Proteins bestimmt, sollten hier zumindest zwei verschiedene Antikörper (pRB^{S795} und pRB^{S807/S811}) genutzt werden (59). Zuletzt sollte noch die Aktivität des sich *downstream* von AKT befindlichen Transkriptionsfaktors NF-κB bestimmt werden (54). Dieser wird durch AKT aktiviert und freigesetzt, indem AKT die IKKα aktiviert, welche für die Degradation des Inhibitors von NF-κB, IκBα, sorgt (26,49). Hierdurch wird NF-κB freigesetzt und kann somit als Transkriptionsfaktor für die Transkription pro-inflammatorischer Proteine, beziehungsweise von Proteinen, die in der Tumorprogression von Bedeutung sind, wirken (5,24,26,54). p65 gilt dabei als repräsentative Untereinheit der NF-κB-Aktivität (62).

Für die Aktivitätsbestimmung dieser zahlreichen Proteine *upstream* und *downstream* von AKT wurden MCF-7-Zellen über 24 h mit 5 μM Inositol-C2-PAF stimuliert oder unbehandelt belassen und im Anschluss die Methode des Western Blottings angewandt, um die Expression und den Phosphorylierungsstatus der Proteine zu erfassen. β-Aktin diente in diesem Versuch als Ladekontrolle (114). Abb. 13 zeigt dabei jeweils ein repräsentatives Beispiel eines Blots für die genannten Signalmoleküle. In den Abb. 13a und 13b ist ersichtlich, dass sich *upstream* von AKT durch Inositol-C2-PAF keine Änderung der Phosphorylierung oder der Gesamtexpression von pPTEN^{S380/T382/T383} und PTEN oder von pPDK1^{S241} und PDK1 ergeben hat. Auch der Phosphorylierungsstatus von pAKT^{T308} hat sich durch Zugabe von Inositol-C2-PAF nicht geändert (Abb. 13c). In Abb. 13d und Abb. 13e jedoch zeigt sich ein deutlicher reduzierender Effekt von Inositol-C2-PAF sowohl auf den Phosphorylierungsstatus von pmTOR^{S2448} als auch von pRB^{S795} und pRB^{S807/S811} und damit von Proteinen *downstream* von AKT. Die Gesamtexpression von mTOR blieb bei dem Einsatz von Inositol-C2-PAF etwa auf dem Level der Kontrolle. Ein Effekt von Inositol-C2-PAF auf die Aktivität von NF-κB konnte in diesem Ansatz nicht nachgewiesen werden (Abb. 13f).

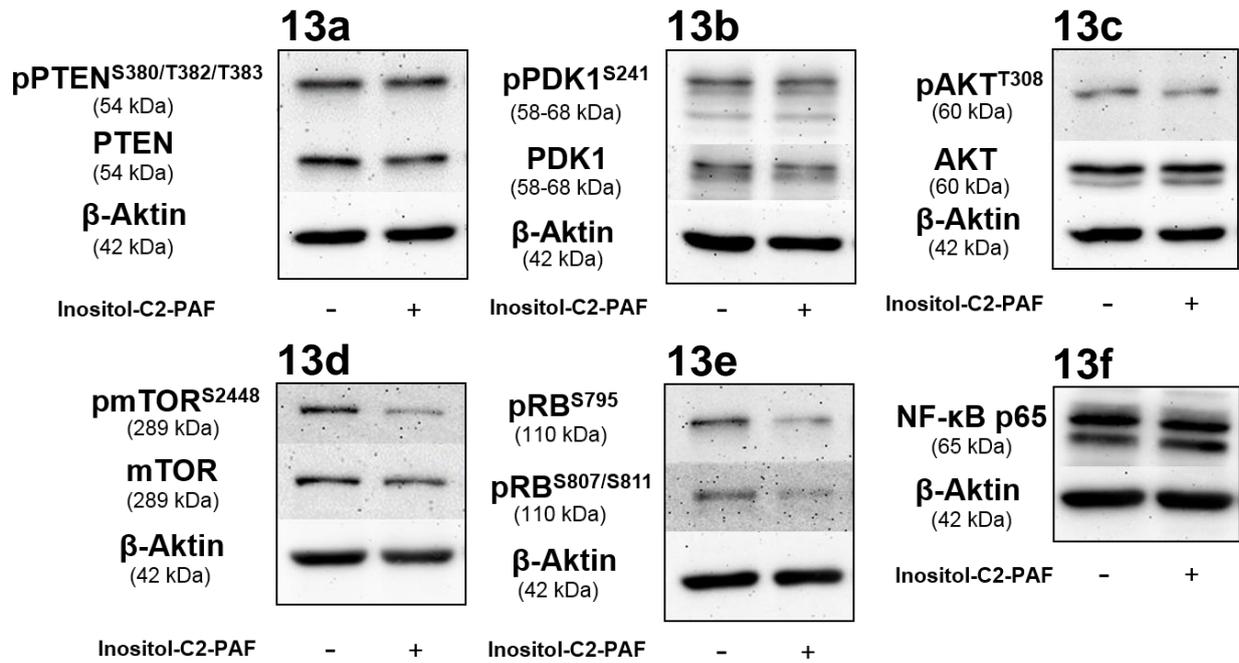


Abbildung 13: Aktivierungsstatus von Molekülen *upstream* und *downstream* von AKT

Zur Ermittlung des Einflusses von Inositol-C2-PAF auf Mitglieder des PI3-Kinase/AKT-Signalwegs *upstream* und *downstream* von AKT (24,52,54) wurden MCF-7-Zellen über 24 h mit 5 μ M Inositol-C2-PAF stimuliert und die Methode des Western Blottings angewandt. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Dabei wurden folgende Moleküle betrachtet: pPTEN^{S380/T382/T383} und PTEN (a), pPDK1^{S241} und PDK1 (b), pAKT^{T308} und AKT (c), pmTOR^{S2448} und mTOR (d), pRB^{S795} und pRB^{S807/S811} (e), NF-κB p65 (f). Ein repräsentatives Beispiel eines jeden Blots ist dargestellt. Bei diesem Experiment wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Bestimmung der Arbeitskonzentration von Inositol-C2-PAF bei MCF-7-Zellen

4.1.1 Arbeitskonzentration und Konzentrationsbestimmungen von ATLs in der Literatur

Diese Arbeit hat als Ziel, im soliden Mammakarzinom, an dem Beispiel von MCF-7 Zellen (103), die Wirkung von Inositol-C2-PAF auf zellulärer und molekularer Ebene weiter zu erforschen. Die Untersuchungen hierfür erforderten zunächst die Ermittlung einer optimalen Wirkstoffkonzentration von Inositol-C2-PAF in den Brustkrebszellen, die für die Zellen gerade noch nicht signifikant toxisch ist. Ebenso wie für Edelfosin konnte auch für Inositol-C2-PAF bereits eine detergensartige Wirkung, die bei hohen Konzentrationen zur Zelllyse führt, festgestellt werden (76). Fischer et al. (2006) konnten in einem Zytotoxizitätsassay bei HaCaT-Zellen (einer immortalisierten Keratinozytenzelllinie) nachweisen, dass Inositol-C2-PAF in einer Konzentration von 0,6 - 5 μM über Inkubationszeiten von 4 h und 48 h nicht toxisch war. In dieser Studie konnte eine mittlere letale Konzentration (LC_{50}) von 15 μM und eine IC_{50} von 1,8 μM bestimmt werden (96). Semini et al. (2011) zeigten, dass Inositol-C2-PAF bei einer Konzentration von 5 μM über 16 h die beiden Zelllinien HaCaT und SCC-25, einer Zelllinie eines Plattenepithelkarzinoms der Zunge, in ihrer Migration signifikant hemmen konnten (100). Weiterhin hatte Inositol-C2-PAF bei dieser Konzentration über 24 h einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression in HaCaT-Zellen. Es konnten solche Gene herunterreguliert werden, die insbesondere bei Immunantworten und Inflammationsreaktion des Organismus eine Rolle spielen. Beispielhaft sei hier die Verminderung der Expression von MHC II-Molekülen genannt (101).

Im Vergleich ließ sich für Edelfosin durch Aznar et al. (2013) bei der Zelllinie MCF-7 in Zellkultur in einem Versuchsansatz über 72 h eine IC_{50} von 17,8 $\mu\text{g/ml}$ nachweisen, was einer Konzentration von 34 μM entspricht (95). Gradziel et al. (2016) konnten bei der Zelllinie MCF-7 in Zellkultur bei einem Versuchsansatz über 24 h hingegen für Miltefosin und Perfosin jeweils eine IC_{50} von $> 10 \mu\text{M}$ aufzeigen (120). Ferner zeigten Alam et al. (2013) für Edelfosin, Miltefosin und Perifosin bei der Zelllinie MCF-7 in Zellkultur über eine nicht genannte Inkubationszeit IC_{50} -Werte von $9,3 \pm 1,0 \mu\text{M}$ (Edelfosin), $11,4 \pm 2,7 \mu\text{M}$ (Mildefosin) und $13,3 \pm 2,7 \mu\text{M}$ (Perifosin) (121).

4.1.2 Bestimmung der in dieser Arbeit verwendeten Arbeitskonzentration von Inositol-C2-PAF

In MCF-7-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit in dem Konzentrationsbereich von 0,1 - 5 μM Inositol-C2-PAF kein toxischer Effekt beobachtet werden. Erst bei einer Steigerung auf 10 beziehungsweise 20 μM Inositol-C2-PAF konnte eine signifikant höhere Sterberate der Zellen ermittelt werden, was sich auch morphologisch bei diesen Konzentrationen zeigte. Die sich aus dem Zellverbund lösenden, stark gestressten und abgerundeten Zellen weisen dabei auf die zunehmende zytotoxische Wirkungsweise (122) von Inositol-C2-PAF hin. Eine Immunfluoreszenz-Analyse von MCF-7-Zellen unter Stimulation von 2,5 μM Inositol-C2-PAF, bei der die zytoskelettalen Proteine F-Aktin und α -Tubulin (10) dargestellt wurden, definiert die lichtmikroskopisch dargestellten Zellveränderungen noch etwas genauer und zeigt die beginnende Auflösung von Zell-Zell-Kontakten und ein vermindertes Zytoplasma.

Aufgrund der im Zellviabilitätsassay erhaltenen Daten wurde in allen Experimenten (wenn nicht anders erwähnt) die nicht-toxische Konzentration von 5 μM Inositol-C2-PAF eingesetzt, zumal sich diese und niedrigere Konzentrationen auch in anderen Zellen bei anderen Autoren effektiv zeigte (96,100,101) und die deutlich niedriger als die von den oben genannten anderen Autoren ermittelten IC_{50} -Werte zu Edelfosin, Miltefosin oder Perifosin liegt (95,120,121).

4.2 Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Migration von MCF-7-Zellen

4.2.1 Einfluss von ATLs auf die Zellmigration in der Literatur sowie Bestimmung der Arbeitskonzentration der Stimulanzen

Bei der Metastasierung von Karzinomen spielt neben der unkontrollierten Proliferation und Angiogenese die EMT eine Rolle, so auch beim Mammakarzinom. Durch die EMT erlangen nicht-invasive epitheliale Tumorzellen eines soliden Tumors die Fähigkeit, die Basalmembran zu infiltrieren und in Blut- oder Lymphgefäße zu gelangen. Anschließend dringen sie an einem sekundären Ort in ein anderes Gewebe ein und setzen dort Metastasen (15). Bei diesem komplexen Prozess spielt das TME eine tragende Rolle, zu dem die Tumorzellen selbst, die mesenchymalen Zellen und eine Vielzahl an tumorinfiltrierenden Zellen gehören (17). Zu den

tumorinfiltrierenden Zellen beim Mammakarzinom gehören beispielsweise die TAMs, die als inflammatorische Monozyten in das Tumorgewebe rekrutiert werden können und dort weiter zu den TAMs differenzieren können. Sie induzieren Tumorstadium und Angiogenese und fördern die Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen (5). Hierfür sezernieren die TAMs Wachstumsfaktoren wie EGF oder EZM-degradierende Enzyme wie MMPs, aber auch Zytokine wie IL-6 und CCL2 (4,5).

Auch für MCF-7-Zellen, bei denen es sich um eine vergleichsweise eher weniger stark invasive Zellreihe handelt (3) und die für IL-6 und CCL2 nachweislich Rezeptoren besitzen (16,30), konnte in Studien von Sullivan et al. (2009) und Chen et al. (2015) gezeigt werden, dass IL-6 eine EMT in MCF-7-Zellen hervorrufen kann (17,27). Die kombinierte Gabe von CCL2 und IL-6 hatte bei NSCLC-Zellen sogar einen synergistischen Effekt in Bezug auf die EMT (17). Sullivan et al. (2009) konnten darüber hinaus darlegen, dass MCF-7-Zellen in einem 3D-Kultur-Assay nach Stimulation mit 50 ng/ml IL-6 über 24 h eine verminderte Expression von E-Cadherin zeigten (27), einem transmembranären Glykoprotein, das über Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett eine Zell-Zell-Adhäsion vermittelt (18,19). Die verminderte Expression stellt ein Hauptmerkmal der EMT dar (15). Gentechnisch veränderte MCF-7-Zellen, die konstitutiv IL-6 produzieren (MCF-7^{IL-6}), exprimieren im Gegensatz zu MCF-7-Wildtypzellen kein E-Cadherin. Allerdings weisen sie dafür eine starke Expression des zyttoplasmatischen Intermediärfilaments Vimentin auf, dessen Hochregulierung charakteristisch für einen mesenchymalen Phänotyp von Karzinomzellen ist. Darüber hinaus sind MCF-7^{IL-6}-Zellen signifikant stärker invasiv als der unveränderte Wildtyp (27). Ebenso konnten Chen et al. (2015) berichten, dass NSCLC Zellen (hier die A549-Zellreihe) nach Inkubation mit 50 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml CCL2 nach 7 Tagen eine deutliche fibroblastenähnliche Morphologie zeigen, was auf eine EMT hinweist. Auch in diesen Zellen konnte unter diesen Bedingungen eine Reduktion des EMT-Markers E-Cadherin und eine Induktion des mesenchymalen Markers Vimentin beobachtet werden. IL-6 und CCL2 förderten weiterhin die Zellmigration und -invasion im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die jeweils zusätzliche Gabe von CCL2 zu IL-6 konnte die EMT-Veränderungen beziehungsweise die erhöhte Migration und Invasion der Zellen gegenüber der alleinigen Gabe von IL-6 noch zusätzlich steigern (17). Entsprechend den hier vorliegenden Daten in der Literatur wurde daher entschieden, einen Wundheilungs- und einen haptotaktischen Migrationsassay mit MCF-7-Zellen über 24 h unter Inkubation mit den Arbeitskonzentrationen 50 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml CCL2 durchzuführen. Ebenso wie für CCL2 und IL-6 konnte auch für den Wachstumsfaktor IGF-1 gezeigt werden, dass er eine EMT in Mammakarzinomzellen und damit deren Metastasierung hervorrufen kann. Erhöhte Levels von IGF-1 sind stark assoziiert mit einer Tumormetastasierung und einer schlechten Prognose (6). Außerdem wurde eine verstärkte Expression des Rezeptors IGF-1R in bis zu 50 % der Mammakarzinome nachgewiesen (45).

Liao et al. (2014) und Sarkissyan et al. (2014) konnten diesen positiven Einfluss von IGF-1 auf die Auslösung einer EMT beziehungsweise die Erhöhung der Invasion und Proliferation auch bei MCF-7-Zellen nachweisen (46,48). Im Einzelnen beschrieben Liao et al. (2014), dass MCF-7-Zellen in einem Zellmigrationsassay unter Stimulation mit IGF-1 über 72 h mit Konzentrationen von 8 ng/ml, 40 ng/ml und 200 ng/ml sowie in einem Wundheilungsassay über bis zu 36 h unter Stimulation mit IGF-1 mit einer Konzentration von 200 ng/ml eine deutlich größere Mobilität zeigten als unbehandelte Kontrollzellen. Zudem wurden neben IGF-1 weitere Wachstumsfaktoren wie EGF, *fibroblast growth factor* (FGF) und *hepatocyte growth factor* (HGF), untersucht, wobei IGF-1 die stärksten Effekte zeigte. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die mit 200 ng/ml IGF-1 bis zu 72 h behandelten Zellen über die Zeit die typischen morphologischen Veränderungen durchliefen, die bei der Transition zu einem invasiven Status der Zelle zu beobachten sind. Zudem kam es unter der Stimulation mit 200 ng/ml IGF-1 über die Zeit zu einer deutlichen Abnahme der Expression von E-Cadherin und einer deutlichen Zunahme der Expression von Vimentin (48). Sarkissyan et al. (2014) demonstrierten in ihrer Studie, dass MCF-7-Zellen in einem Proliferationsassay über 48 h in Anwesenheit von 100 ng/ml IGF-1 ein signifikant stärkeres Wachstum zeigten als unbehandelte Kontrollzellen. Außerdem wurde von ihnen nachgewiesen, dass die MCF-7-Zellen unter Stimulation mit IGF-1 über 40 h in einem Invasionsassay eine stärkere migratorische Aktivität als die unbehandelten MCF-7-Zellen zeigten. Auch war eine reduzierte E-Cadherin Expression der MCF-7-Zellen auf die Inkubation mit IGF-1 nachweisbar, was den Eindruck einer durchgemachten EMT der Zellen bestätigte (46). In Zusammenschau dieser dargestellten Literaturangaben wurde entschieden, den in der vorliegenden Arbeit im haptotaktischen Migrationsassay genutzten Ansatz mit IGF-1 mit einer Konzentration von 100 ng/ml gemeinsam mit IL-6 und CCL2 über 24 h durchzuführen.

Wie bereits erwähnt, ist die Wirkung der ATLs auf die Migration von Zellen unterschiedlich beschrieben und gibt in den verschiedenen Studien kein einheitliches Bild ab. Einige Studien zeigen, dass Edelfosin die Migration und Metastasierung von Tumorzellen wie Melanomzellen (84) und Urothelkarzinomzellen (86) reduzierte. Ebenso hemmt Ohmline, ein weiterer Vertreter der ATLs, die Zellmigration von Kolonkarzinomzellen (82). Für Inositol-C2-PAF wurde in vorangegangenen Arbeiten ein hemmender Effekt auf die haptotaktische Zellmigration von Keratinozyten beschrieben (2).

Im Gegensatz dazu wiesen Steelant et al. (2001) nach, dass Edelfosin die Funktionen des EMT-Markers E-Cadherin inhibierte (15,87), womit gemutmaßt werden könnte, dass eine Aussaat und Metastasierung dieser Zellen erleichtert werden müsste. In einer weiteren Studie wurden ebenfalls invasionsfördernde Eigenschaften durch Edelfosin in MCF-7-Zellen beobachtet (88).

4.2.2 Geringe Hemmung der Migration von MCF-7-Zellen durch Inositol-C2-PAF

In der vorliegenden Arbeit konnte in MCF-7-Zellen im Wundheilungsassay unter Kontrollbedingungen eine migrationshemmende Wirkung durch Inositol-C2-PAF beobachtet werden. Die Zellmigration wurde auch in Abwesenheit verschiedener Stimulanzen (IL-6 und CCL2) untersucht. Leider konnten die Mediatoren keine signifikante Erhöhung der Migration im Vergleich zu unbehandelten MCF-7-Zellen induzieren. Es gab jedoch eine tendenzielle Erhöhung, die durch Inositol-C2-PAF in jedem Ansatz gemindert werden konnte.

Den größten positiven Einfluss auf die Zellwanderungsbereitschaft der MCF-7-Zellen hatte dabei die kombinatorische Gabe von IL-6 und CCL2. Bei Zugabe von Inositol-C2-PAF zu diesem Ansatz konnte hier der stärkste und statistisch signifikante Hemmungseffekt durch Inositol-C2-PAF nachgewiesen werden.

Ein ähnliches Bild zeichnete der auch durchgeführte haptotaktische Migrationsassay mit MCF-7-Zellen nach Gabe von IL-6 und CCL2 beziehungsweise IGF-1, die jeweils mit und ohne Inositol-C2-PAF inkubiert wurden. Auch hier zeigte sich nur eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Zellmigration unter Stimulation mit CCL2 und IL-6 sowie IGF-1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Eine Hemmung der Migration unter dem Einfluss von Inositol-C2-PAF war in allen Ansätzen zu erkennen, jedoch auch hier ohne signifikanten Unterschied. Dies galt auch für den Vergleich der Inkubation der MCF-7-Zellen mit IGF-1 und der Inkubation mit IGF-1 und Inositol-C2-PAF. Gestützt wird der mangelnde Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die mediatorinduzierte Zellmigration durch die Western Blot-Analyse mit dem EMT-Marker E-Cadherin (15). In keinem der genannten Ansätze konnte eine signifikante Veränderung von E-Cadherin gezeigt werden. Damit erscheint eine durchgemachte EMT der MCF-7-Zellen unter diesen Bedingungen unwahrscheinlicher, womit ebenso der vermutete hemmende Effekt von Inositol-C2-PAF auf eine EMT nicht bestätigt werden kann.

Im Gegensatz zu den Studien von Sullivan et al. (2009) und Chen et al. (2015) konnte im Rahmen dieser Arbeit bei den MCF-7-Zellen mit IL-6 und CCL2 keine eindeutige EMT hervorgerufen werden (17,27). Die durch die Mediatoren hervorgerufene verstärkte Migration war nicht signifikant. Diese Ergebnisse könnten jedoch darauf zurückzuführen sein, dass trotz gleicher Inkubationszeiten und gleicher Konzentrationen der Mediatoren die Rahmenbedingungen beider Studien unterschiedlich waren. So wurde in der Arbeit von Sullivan et al. (2009) zum einen ein 3D-Kultur-Assay genutzt und zum anderen mit gentechnisch veränderten MCF-7-Zellen gearbeitet, die konstitutiv IL-6 exprimierten (27), während im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit einer 2D-Zellkultur gearbeitet wurde für die MCF-7-Wildtyp-Zellen genutzt wurden. In der

Arbeit von Chen et al. (2015) wurden außerdem mit NSCLC-Zellen (Zellen eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms) ein völlig andere Tumorzellart verwendet (17). Als Folge wäre es sinnvoll, noch einmal unter den genau gleichen Bedingungen, wie von Sullivan et al. (2009) beschrieben, Versuche mit MCF-7-Zellen vorzunehmen und den Effekt von Inositol-C2-PAF zu untersuchen.

Ebenso konnten die Ergebnisse von Liao et al. (2014) und Sarkissyan et al. (2014) mit den hier vorliegenden Daten nicht gestützt werden (46,48). Auch hier konnte in diesem Ausmaß kein positiv signifikanter Effekt von IGF-1 auf die Migrationsbereitschaft von MCF-7-Zellen oder die Auslösung einer EMT, erkennbar an einer Herunterregulation von E-Cadherin (15), festgestellt werden. Jedoch waren auch hier die Versuchsbedingungen in beiden Arbeiten leicht verändert, die diese Diskrepanz erklären könnten. Während in der Arbeit von Liao et al. (2014) MCF-7-Zellen mit 200 ng/ml IGF-1 über einen Zeitraum von 6 h bis 36 h behandelt wurden (48) und Sarkissyan et al. (2014) Inkubationen von MCF-7-Zellen mit 100 ng/ml über 40 h und 48 h durchführten (46), wurde in der vorliegenden Arbeit eine Konzentration von 100 ng/ml und eine Inkubationsdauer von 24 h gewählt. Somit wäre es möglich, dass für einen wie von beiden Arbeiten nachgewiesenen Effekt entweder die Zeitdauer oder Konzentration hätte erhöht werden müssen. Nachfolgende Untersuchungen sollten daher mit entsprechend höherer Konzentration des Stimulanz und längeren Inkubationszeiten durchgeführt werden.

Auch der in dieser Arbeit dargestellte hemmende Effekt durch Inositol-C2-PAF auf die Migration von MCF-7-Zellen in dem Wundheilungs- und haptotaktischen Migrationsassay kann aufgrund der nur tendenziellen Ergebnisse und weitgehend fehlender statistischer Signifikanz kein ganz eindeutiges Bild im Vergleich mit der Literatur abgeben. Insgesamt wird aber die hemmende Wirkung von Inositol-C2-PAF, die schon bei Keratinozyten in einem haptotaktischen Migrationsassay nachgewiesen werden konnte (2), durch die Ergebnisse dieser Arbeit zumindest teilweise unterstützt. Gleichwohl kann konstatiert werden, dass die von Potier et al. (2011), Slaton et al. (1994) und Guéginou et al. (2016) abgebildete Hemmung der Migration verschiedener Tumortypen (siehe oben) durch Edelfosin oder Ohmlin, wie Inositol-C2-PAF ebenfalls Vertreter der ATLs, durch diese Ergebnisse auch eher gestützt wird (82,84,86), während die gegenteilig durch Steelant et al. (2001) gezeigte Hemmung von E-Cadherin durch Edelfosin (und damit eine eher begünstigte Aussaat und Metastasierung der Tumorzellen) (87) durch Inositol-C2-PAF hier nicht bestätigt werden konnte. Auch die von van Slambrouck und Steelant (2007) festgestellte Verstärkung der invasiven Eigenschaften von MCF-7-Zellen durch Edelfosin (88) konnte damit in dieser Arbeit für Inositol-C2-PAF nicht belegt werden.

4.3 Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Proliferationsbereitschaft von MCF-7-Zellen

4.3.1 Einfluss von ATLS auf die Zellproliferation in der Literatur

Neben der EMT gehört ebenso die Proliferation der Tumorzellen wie auch Angiogenese zu den Hauptprozessen, die eine Metastasierung ermöglichen (15).

In verschiedenen Studien wurde die Modulation der Proliferation von MCF-7-Zellen durch IL-6 und IGF-1 untersucht. Während Sullivan et al. (2009) nachweisen konnten, dass konstitutiv IL-6-exprimierende MCF-7-Zellen mehr Mitosefiguren zeigten als unbehandelte MCF-7-Zellen (27), wiesen Sasser et al. (2007) ebenso nach, dass IL-6 in vitro und in vivo die Proliferation von MCF-7-Zellen beziehungsweise deren Tumorwachstum verstärken konnte (123).

Auch Sarkissyan et al. (2014) konnten zeigen, dass mit IGF-1 behandelte MCF-7-Zellen ein signifikant stärkeres Wachstum zeigten und dieses Wachstum unter Nutzung des PI3K-Inhibitors LY294002, der den IGF-1-Signalweg unterdrückt, so weit abgeschwächt werden konnte, dass es unter dem unbehandelten MCF-7-Zellen lag (46). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass MCF-7-Zellen in Zellviabilitäts- und Zellzyklusassays in Anwesenheit von IGF-1 ein stärkeres Wachstum zeigten als unbehandelte Zellen. Durch Luteolin, eine Substanz, die ebenfalls den IGF-1-Signalweg hemmt, konnte dieses Wachstum gehemmt werden (124).

Auf molekularer Ebene sind die Ergebnisse dieser Studien insofern sinnvoll, als dass die Gene von Cyclin D1 (38) oder auch Bcl-2 (35) durch STAT3 als Transkriptionsfaktor vermehrt transkribiert werden, was durch IL-6 über den IL-6/STAT3-Signalweg eingeleitet werden kann (4). Auch IGF-1 kann durch die Aktivierung von AKT (50) auf proliferationsfördernde Abläufe Einfluss nehmen, indem es Proteine wie BAD (54) oder Caspase 9 (58) hemmt beziehungsweise mTORC1 aktiviert (55).

Die Datenlage bezüglich der Inhibition der Proliferation durch ATLS scheint in der Literatur deutlich gesicherter zu sein als ihr Einfluss auf die Zellmigration. Durch verschiedene Mechanismen konnte die Wirkung von ATLS wie Edelfosin auf Proliferation und Apoptose bereits nachgewiesen werden, wie die Aktivierung des Fas/CD95-Todesrezeptorsignalwegs (78), eine direkte Wirkung auf Mitochondrien mit Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und Aktivierung der Caspase-Kaskade, eine Förderung des ER-Stress-induzierten Zelltods (77), eine Hemmung der für Zellproliferation beziehungsweise Zellteilung bedeutsamen Phosphatidylcholin-Synthese (73,74) sowie die Verschiebung weg von anti-apoptotischer Signaltransduktion über PI3K/AKT beziehungsweise MAPK/ERK hin zu einer pro-apoptotischen

Signaltransduktion über SAPK/JNK (89). Versuche, die bereits mit Inositol-C2-PAF durchgeführt wurden, unterstützen diese These der Hemmung der Proliferation durch ATLS. Hier konnte gezeigt werden, dass Inositol-C2-PAF in verschiedenen Zelllinien, Jurkat-Zellen (T-Zell-Leukämie-Zellen), BJAB-Zellen (Burkitt-Lymphom-Zellen) (98) und HaCaT-Zellen (Keratinocyten) (96) Apoptose induzierte oder die Zellproliferationstendenz hemmte.

4.3.2 Starke Hemmung der Proliferation von MCF-7-Zellen durch Inositol-C2-PAF

In dem in dieser Arbeit genutzten Proliferationsassay wurden MCF-7-Zellen mit IL-6 oder IGF-1 mit und ohne Inositol-C2-PAF über 24 h stimuliert oder unbehandelt belassen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Effekte wurden die gleichen Konzentrationen, die auch in den Migrationsassays eingesetzt wurden, genutzt. Dabei wurden die in der Mitose befindlichen Zellen in jedem der Ansätze gezählt. Sowohl IGF-1 als auch IL-6 führten zu einer verstärkten Proliferation der MCF-7-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Durch Inositol-C2-PAF konnte die Proliferation von MCF-7-Zellen in allen Ansätzen signifikant auf ein Niveau unterhalb der von unbehandelten Zellen gesenkt werden.

Mit diesen Ergebnissen können zum einen die oben genannten Ergebnisse aus Studien bestätigt werden, die besagen, dass es unter Stimulation mit IGF-1 und IL-6 zu einer verstärkten Proliferation von MCF-7-Zellen kommt (27,46,123,124). Zum anderen konnte Inositol-C2-PAF in der untersuchten Zellreihe, den Mammakarzinomzellen MCF-7, wie bereits in anderen (Tumor-) Zellen gezeigt (96,98) und ebenso wie andere ATLS wie Edelfosin (73,78,89) die Proliferation dieser Zellen sogar unter Zellzyklus fördernden Bedingungen signifikant auf ein Niveau unter das von unbehandelten Zellen senken.

4.4 PI3K/AKT- und STAT3-Signalweg – Einfluss der Mediatoren IL-6, CCL2 und IGF-1 sowie Inositol-C2-PAF und möglicher *Crosstalk* der Signalwege

4.4.1 Einfluss der Stimulanzen CCL2, IL-6 und IGF-1 sowie der ATLS auf den STAT3- und den PI3K/AKT-Signalweg in der Literatur

Der oben beschriebene Einfluss von Inositol-C2-PAF beziehungsweise der Stimulanzen IL-6, CCL2 und IGF-1 wurde zusätzlich zur zellulären Ebene auch auf molekularer Ebene via Western Blot-Analyse untersucht. Die Hauptsignalwege der beiden Stimulanzen IL-6 und IGF-1 sind der IL-6/STAT3-Signalweg (4) beziehungsweise der PI3K/AKT-Signalweg (6), deren Hauptmoleküle STAT3 und AKT darstellen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden und als Transkriptionsfaktor (STAT3) (36) oder Kinase (AKT) (52) ihre weitere Wirkung vermitteln. Die Wirkung von CCL2 sollte in Kombination mit IL-6 ebenfalls über den STAT3-Signalweg vermittelt werden, da Chen et al. (2015) darlegen konnten, dass CCL2 die STAT3-Aktivierung über IL-6 in NSCLC-Zellen synergistisch steigern konnte (17).

Lee et al. (2010) konnten in MCF-7-Zellen bereits zeigen, dass konstitutiv aktives STAT3 bei unbehandelten MCF-7-Zellen nur sehr geringfügig vorhanden war und dass der Einsatz von IL-6 zu einer starken Aktivierung durch den Nachweis der Phosphorylierung an Tyr705 von STAT3 führte (41). Ebenso konnten Kondaveeti et al. (2015) anführen, dass in unbehandelten MCF-7-Zellen nur eine gering messbare Aktivierung von STAT3 darzustellen ist, aber in solchen MCF-7-Zellen, die eine EMT durchgemacht haben, eine starke Aktivierung von STAT3 zu verzeichnen ist (40).

Liao et al. (2014) konnten in ihrer Arbeit demonstrieren, dass es unter Stimulation mit IGF-1 bei MCF-7-Zellen zu einer starken Aktivierung von AKT kam, die bei unbehandelten MCF-7-Zellen, wenn überhaupt, nur minimal vorhanden war. Die Zugabe des Inhibitors LY294002 (ein PI3K-Antagonist) konnte die Aktivierung von AKT durch IGF-1 ferner unterdrücken (48). Ebenso konnten Alkhalaf et al. (2002) in MCF-7-Zellen darlegen, dass eine Grundaktivierung von AKT nur spärlich vorhanden ist (67).

Von Interesse erscheint in diesem Zusammenhang natürlich auch, ob im Gegenzug durch IL-6 und die Aktivierung von STAT3 auch eine Aktivierung von AKT erfolgt, beziehungsweise umgekehrt, ob durch IGF-1 und die Aktivierung von AKT auch eine Aktivierung von STAT3

geschehen könnte. Daher wurde die Untersuchung dieser Vorgänge mit in diese Arbeit aufgenommen.

Cheng et al. (2008) konnten zeigen, dass STAT3 die Expression des Transkriptionsfaktors Twist hochreguliert (Abb. 1) (42), der bei vielen physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel bei der Entwicklung und Differenzierung des Mesoderms, eine essentielle Rolle spielt (125). Ist die Proteinmenge dieses Transkriptionsfaktors, der sich häufig in Tumoren, unter anderem Brustkrebstumoren, überexprimiert zeigt, erhöht, steigert sich auch die Fähigkeit der Tumorzellen zur Metastasierung durch EMT, deren *Survival* und Chemoresistenz (42). Ebenfalls konnten Cheng et al. (2007) zeigen, dass diese Twist-vermittelte Migration, Invasion und Chemoresistenz auch durch seine transkriptionelle Induktion von AKT2 begründet sind (43), welche, wie bereits dargestellt, eine wichtige Rolle in der Signaltransduktionsachse der Brustkrebsprogression und -metastasierung spielt (6). Auch in Zellen des multiplen Myeloms zeigte sich eine durch IL-6 vermittelte AKT-Phosphorylierung. Diese wird auf die Stimulation von SHP-2 durch IL-6 via gp130 zurückgeführt. Dies aktiviert sodann die PI3K, die die weitere Kaskade zur AKT-Phosphorylierung, wie oben beschrieben, fortsetzt (126). Mehrere weitere Studien auch in unterschiedlichen Zelltypen konnten diese IL-6 vermittelte PI3K- beziehungsweise AKT-Aktivierung nachweisen (127–130). Darüberhinaus konnte eine CCL2-induzierte AKT-Aktivierung in Prostatakrebszellen bereits beschrieben werden (131).

Ob umgekehrt eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs auch eine Aktivierung des JAK/STAT3-Signalwegs zur Folge hat, ist bislang unzureichend untersucht und die Daten hierzu sind zudem widersprüchlich. Während Bian et al. (2018) in ihrer Studie mit NSCLC-Zellen zeigen konnten, dass eine Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs zu einer kompensatorischen Aktivierung von STAT3 führt (132), beobachteten Abdelhamed et al. (2016) in den gleichen Zellen unter Einsatz von PI3K- und AKT-Inhibitoren einen reduzierten Phosphorylierungs-Status von STAT3 (133). Eine weitere Studie stützt diese Daten und beschreibt eine positive Korrelation zwischen dem PI3K/AKT-Signalweg und dem STAT3-Signalweg. Die Autoren beobachteten weiterhin, dass mTOR, als Komponente des PI3K/AKT-Signalweges, STAT3 in NBFL-Zellen (Zellen eines Nebennierenneuroblastoms) und HEK293T-Zellen (embryonale Nierenzellen), an Ser727 phosphoryliert (52,134), was eine fördernde Wirkung auf die Aktivität von STAT3 hat (36). Wie genau dieser *Crosstalk* zwischen dem PI3K/AKT-Signalweg und dem JAK/STAT3-Signalweg auf molekularer Ebene funktioniert, ist derzeit demnach noch nicht abschließend geklärt.

Ruiter et al. (2003) haben zeigen können, dass verschiedene ATLS wie Edelfosin, Perifosin und Miltefosin in den Karzinomzelllinien A431 und HeLa die Insulin- und EGF-induzierte Aktivierung von AKT hemmen (89). Die Hypothese ist, dass die Hauptwirkung von Perifosin darin besteht, durch Veränderung der Zellmembran die Translokation von AKT über die PH-Domäne zu hemmen und somit die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs zu blockieren (73). In vivo konnte

an einem Rattenmodell mit Temporallappenepilepsie gezeigt werden, dass die durch Kainsäure hervorgerufene Phosphorylierung und Aktivierung von AKT durch Perifosin gehemmt werden konnte (135). Auch in MCF-7/ADM-Zellen konnte gezeigt werden, dass Perifosin eine Reduktion der Phosphorylierung von AKT hervorrufen kann (62). Eine weitere Studie konnte nachweisen, dass Perifosin in Zellen eines Multiplen Myeloms eine durch IL-6 und IGF-1 hervorgerufene Aktivierung von AKT signifikant inhibierte, jedoch auf die durch IL-6 hervorgerufene Aktivierung von STAT3 keinen Einfluss hatte (136). Da STAT3 aber membrannah an gp130 durch JAK phosphoryliert wird (36) und die Hypothese besteht, dass Inositol-C2-PAF aufgrund seiner Struktur in die Zellmembran eingebaut wird und von dort aus seine Wirkung entfaltet (96), erscheint eine Wirkung von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung von STAT3 aber zumindest von der räumlichen Nähe durchaus denkbar.

4.4.2 Geringe Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 durch Inositol-C2-PAF

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob Inositol-C2-PAF die Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705, dem entscheidenden Phosphorylierungsort für dessen Aktivität (37), sowie die Gesamtexpression von STAT3 beeinflusst.

Unbehandelte MCF-7-Zellen wiesen wenig bis kein phosphoryliertes STAT3 auf. Erst die Stimulation mit IL-6 führte zu einer deutlichen Phosphorylierung von STAT3 an Tyr705, was die Ergebnisse von Lee et al. (2010) und Kondaveeti et al. (2015) in MCF-7-Zellen bestätigte (40,41). Dabei akkumulierte pSTAT3^{Y705} in den MCF-7-Zellen nach Stimulation mit IL-6 im Zellkern, während STAT3 in unstimulierten Zellen eher im Zytosol lokalisiert war. Diese Ansammlung des pSTAT3^{Y705} im Zellkern erscheint auch insofern schlüssig, da es als Homodimer als Transkriptionsfaktor, wie in der Einleitung beschrieben, auf DNA-Ebene wirksam ist (4,36). Auch die Kombination von IL-6 mit CCL2 führte im Rahmen dieser Arbeit zu einer gesteigerten Phosphorylierung von STAT3, jedoch nicht auf einem signifikant höheren Niveau. Chen et al. (2015) haben im Gegensatz dazu eine synergistische Wirkung von CCL2 in Kombination mit IL-6 in Bezug auf die STAT3-Phosphorylierung beobachten können. Allerdings nutzten die Autoren dieser Studie eine andere Tumorzelllinie (NSCLC-Zellen) und auch die Kulturbedingungen wichen etwas von den hier beschriebenen ab, was dieses unterschiedliche Ergebnis erklären könnte. Trotz Nutzung der gleichen Konzentration von CCL2 und IL-6 (je 50 ng/ml) über 24 h bei Chen et al. (2015) wie auch in dieser vorliegenden Arbeit, setzten Chen et al. (2015) die NSCLC Zellen nach Stimulation über 24 h die Zellen danach Serum-freiem Medium über weitere 24 h aus, bevor sie die Zellen abernteten (17). Möglicherweise wäre eine Nutzung dieser Konditionen

von Chen et al. (2015) für MCF-7-Zellen eine Alternative für weitere Versuche, um auszuschließen, dass nicht die hier genutzten Bedingungen der Behandlung der MCF-7-Zellen für die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse verantwortlich sind, sondern der Zelltyp selbst. Ansonsten kann an dieser Stelle vermutet werden, dass CCL2 bei Zugabe zu IL-6 bei MCF-7-Zellen nicht zu einer zusätzlichen Wirkung in der Phosphorylierung von STAT3 führt.

Die Stimulation mit IGF-1 hatte keinen Einfluss auf die STAT3-Phosphorylierung. Eine Einordnung dieses Ergebnisses erfolgt weiter unten.

Der Einsatz von Inositol-C2-PAF führte zu einer schwachen Verminderung der Phosphorylierung von STAT3 gegenüber mit IL-6 (und CCL2) stimulierten Zellen. Dies ist nach derzeitigem Kenntnisstand das erste Mal, dass ein Einfluss eines ATLs auf die Aktivität von STAT3 in Zellen nachgewiesen werden konnte. Auf die Gesamtexpression von STAT3 hatte Inositol-C2-PAF keinen Einfluss.

4.4.3 Starke Hemmung der Phosphorylierung von AKT durch Inositol-C2-PAF

Weiterhin wurde die Phosphorylierung von AKT an Ser473, dem Phosphorylierungsort, der für die maximale Aktivierung und Stabilisierung des Aktivierungsstatus der Kinase verantwortlich ist (52), und die Gesamtexpression von AKT untersucht.

Zunächst ist auch hier festzustellen, dass die unbehandelten MCF-7-Zellen wenig phosphoryliertes AKT aufweisen. Durch die Stimulation mit IGF-1 kam es zu einer, wie in der Literatur schon beschriebenen (48,67), sehr starken Phosphorylierung am Ser473-Rest und somit zur Aktivierung von AKT.

Eine Verstärkung der Phosphorylierung von AKT ließ sich auch mit IL-6 und CCL2 gemeinsam mit IL-6 in etwa gleichem Maße provozieren. Allerdings war die Phosphorylierung nicht so ausgeprägt wie die durch IGF-1 induzierte. Eine Einordnung dieser Ergebnisse, dass IL-6 zu einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs führt, soll weiter unten erfolgen.

Der Einsatz von Inositol-C2-PAF führte in jedem Ansatz zu einer deutlichen Reduktion der AKT-Phosphorylierung. Hierbei wurde zum Teil das Phosphorylierungsniveau der unbehandelten Zellen unterschritten.

Diese Ergebnisse bestätigen damit andere Studien, die zeigen konnten, dass ATLs wie Edelfosin, Miltefosin und Perifosin der Aktivierung von AKT in Karzinomzellen entgegenwirken können (62,89).

Hierdurch ergab sich, dass trotz struktureller Unterschiede der ATLs Teile der Wirkungen der ATLs sehr ähnlich oder identisch sind. Ein genau abgestimmter Versuch mit einer Zelllinie wie

MCF-7 unter Stimulation mit IGF-1 (oder IL-6) mit unterschiedlichen ATLS wie Edelfosin, Miltefosin, Perifosin und Inositol-C2-PAF wäre hier eine Möglichkeit, detaillierte Struktur-/Wirkungsbeziehungen für die verschiedenen Gruppen in den ATLS anzustellen und damit die Effektivität dieser ATLS in Bezug auf die inhibitorischen Eigenschaften auf AKT zu vergleichen. Auch für AKT konnte kein Einfluss auf die Gesamtexpression unter den unterschiedlichen Bedingungen beobachtet werden.

4.4.4 Inhibition der Aktivierung verschiedener AKT-Isoformen durch Inositol-C2-PAF

Wie gezeigt, hat Inositol-C2-PAF einen starken inhibitorischen Einfluss auf den PI3K/AKT-Signalweg. Darüberhinaus hemmte die Substanz auf zellulärer Ebene signifikant die IGF-1-induzierte Proliferation in MCF-7-Zellen. Daher wurde der Einfluss von Inositol-C2-PAF detaillierter auch auf die verschiedenen in den Zellen exprimierten AKT-Isoformen untersucht.

Um zu untersuchen, welche AKT-Isoformen durch Inositol-C2-PAF moduliert werden, wurde über die Western Blot-Technik hinaus das NanoPro™ 100-System (cIEF) eingesetzt, um den Einfluss auf die Phosphorylierungsstadien verschiedener AKT-Isoformen quantitativ zu erfassen. Dieses Verfahren ist außerdem schnell und bietet die Möglichkeit der quantitativen Analyse von kleinen Proben. Dabei können die gleichen Antikörper wie im Western Blot genutzt werden (137).

Die Proteine werden hierfür in einer Kapillare durch isoelektrische Fokussierung aufgetrennt, immobilisiert und mit Antikörpern inkubiert. Die Intensität der Signale an den jeweiligen isoelektrischen Punkten wird mittels Chemilumineszenz erfasst (137). Die Signale der phosphorylierten AKT-Isoformen wurden mit denen der in der Literatur bereits publizierten verglichen und zugeordnet.

In der Mamma sind AKT1 und AKT2 die dominanten Isoformen, auch in den davon abgeleiteten Tumorzellen. AKT3 ist ebenso in mehreren Brustkrebszelllinien hochreguliert, jedoch besonders in solchen vom basalen Typ. Iacovides et al. (2013) konnten zeigen, dass AKT1 und AKT2 in allen 22 von ihnen getesteten Brustkrebszelllinien (zwölf vom basalen Typ, zehn vom luminalen Typ) exprimiert wurden. Nur in acht von den 22 Zelllinien wurde auch AKT3 exprimiert. Davon waren sechs vom basalen und nur zwei vom luminalen Subtyp (66). Da die in dieser Arbeit genutzten MCF-7-Zellen in der Arbeit von Iacovides et al. (2013) nicht getestet wurden, aber vom *luminal A* Typ sind, erschien eine Expression von AKT3 in MCF-7-Zellen somit eher unwahrscheinlich. Dies wurde aber nicht weiter untersucht.

Für AKT liegen die pIs aller Isoformen zwischen 5.0 und 6.0. Für die Neuroblastomzellen N1E-115 und primäre Neuronen konnte gezeigt werden, dass vier bis fünf Signale der aktivierenden

Phosphorylierung an Ser473 zugeordnet werden können, nämlich bei pH 5.06, 5.14, 5.31, 5.42 und 5.53. Unter Nutzung von Isoform-spezifischen AKT-Antikörpern konnten die Signale bei 5.06, 5.14 und 5.31 primär der AKT1-Isoform zugeordnet werden, während die Signale bei 5.42 und 5.53 mit verschiedenen, höchstwahrscheinlich aber mit der AKT1- und AKT2-Isoform korrespondieren (117).

In der vorliegenden Arbeit sorgte die Behandlung der MCF-7-Zellen mit IGF-1 für eine Erhöhung von pAKT^{S473} im Bereich aller pls von 5.06 bis 5.53, während die Inkubation mit IL-6 zu einer selektiven Erhöhung der pls 5.42 und 5.53 führte. Die zusätzliche oder alleinige Gabe von Inositol-C2-PAF resultierte in einer Reduktion aller Signale von pAKT^{S473} in allen Ansätzen. Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Schrötter (2016) (117) scheint IGF-1 die Phosphorylierung beider AKT-Isoformen, AKT1 und AKT2, zu induzieren, während IL-6 nur die Phosphorylierung von AKT2 an Ser473 in MCF-7-Zellen vermittelt. Dieses Ergebnis würde die oben genannte These unterstützen, dass der von Cheng et al. (2007) nachgewiesene Signalweg IL-6/STAT3/Twist/AKT2 (43) entscheidend sein könnte, dass durch eine erhöhte AKT2-Aktivierung die hier nachgewiesene vermehrte Phosphorylierung von AKT durch Inkubation mit IL-6 hervorgerufen werden könnte.

Darüberhinaus scheint Inositol-C2-PAF nicht nur die Phosphorylierung einer AKT-Isoform zu hemmen, sondern sowohl die Phosphorylierung von AKT1 als auch von AKT2.

Die quantitativen Ergebnisse der Befunde aus den Versuchen der kapillaren isoelektrischen Fokussierung stützen und erweitern somit die in der Western Blot-Analyse erhaltenen Ergebnisse.

4.4.5 Möglicher *Crosstalk* zwischen dem IGF-1-induzierten PI3K/AKT-Signalweg und dem STAT3-Signalweg

Wie gezeigt, führte die Stimulation durch IGF-1 in MCF-7-Zellen zu keiner Erhöhung der Phosphorylierung von STAT3, wohingegen eine Stimulation durch IL-6 die Aktivität von AKT erhöhte. Somit ist ein Wechselspiel zwischen den beiden Signalwegen in diesen Tumorzellen denkbar.

Es gibt mehrere Studien, die eine IL-6-vermittelte PI3K- beziehungsweise AKT-Aktivierung bereits nachweisen konnten. Dazu gehören die Studien von Kaneshiro et al. (2014) in einer Osteoblasten-Zelllinie (MC3T3-E1) (127), Tu et al. (2000) (128) und Hideshima et al. (2001) (126) in Myelomzelllinien (AF10 und MM.1S) und Chen et al. (1999) in einer Hepatozyten-Zelllinie (Hep3B) (130), die zeigten, dass IL-6 die Phosphorylierung von AKT steigert. Auch Chung et al. (2000) konnten darlegen, dass IL-6 in Prostatakrebszelllinien die Aktivierung der PI3K erhöht

(129), was letztlich auch zu einer verstärkten AKT-Aktivierung führen würde (50). Ferner konnten Cheng et al. (2007, 2008) in ihren beiden Studien für MCF-7-Zellen zeigen, dass IL-6 über STAT3 zu einer Hochregulation des Transkriptionsfaktors Twist führt, der wiederum zur Erhöhung der AKT2-Expression beiträgt (42,43). Dieser STAT3/ Twist/AKT2-Signalweg stellt damit ein attraktives Ziel einer therapeutischen Intervention dar (43). Zhang et al. (2013) wiesen nach, dass der *Knockdown* von Twist in metastatischen Brustkrebszellen die Fähigkeit dieser Zellen einschränkt, von der Brustdrüse in die Lunge zu wandern. Durch den Einsatz der microRNA-720 (miR-720), die die Wirkung von Twist inhibiert, konnte die Migration und Invasion von Brustkrebszellen gesenkt werden (125). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass IL-6 zu einer erkennbaren Stimulation der Aktivierung von AKT führte, unterstützt die Resultate dieser Studien. Ein vermuteter Mechanismus der vermehrten Aktivierung könnte dementsprechend der von Cheng et al. (2007) postulierte Weg über IL-6/STAT3/ Twist/AKT2 sein (43), der letztlich dafür sorgen könnte, dass das Grundangebot an gesamtem AKT durch Erhöhung der AKT2-Fraktion als Substrat für die PDK1 und mTORC2 gesteigert wird und folglich auch eine größere Menge an phosphoryliertem AKT in IL-6-behandelten Zellen gegenüber unbehandelten Zellen vorhanden ist.

In Prostatakrebszellen (PC-3 und VCaP) kann auch CCL2 zu einer Aktivierung von AKT führen (131). Eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT in mit IL-6 und CCL2 behandelten Zellen im Vergleich zu Zellen, die nur mit IL-6 behandelt wurden, konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht festgestellt werden, sodass sich in dieser Konstellation der behandelten MCF-7-Zellen keine gegenseitige Verstärkung der Wirkung von IL-6 und CCL2 herausstellte. Dieses Ergebnis stützt diejenigen Aussagen von Chen et al. (2015) in der NSCLC-Zelllinie einer gegenseitigen Wirkungsverstärkung nicht (17). Der oben vorgeschlagene Ansatz eines neuen Versuches unter den gleichen Kultur- und Stimulationsbedingungen, wie von Chen et al. (2015) genutzt, könnte auf die Untersuchung des PI3K/AKT-Signalwegs neben dem STAT3-Signalweg bezüglich der Frage der sich verstärkenden Wirkung von IL-6 und CCL2 ausgeweitet werden.

Wie bereits erwähnt, ist der Einfluss auf den STAT3-Signalweg durch IGF-1 beziehungsweise durch Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges nicht gut untersucht und die publizierten Daten sind voneinander abweichend. Für NSCLC-Zellen (H460 und H2126) konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs zu einer kompensatorischen Aktivierung von STAT3 führte (Bian et al. (2018)) (132), während in der NSCLC-Zelllinie PC-9 eine Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs zu einer Abnahme der Phosphorylierung von STAT3 führte (Abdelhamed et al. (2016)) (133). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, hatte IGF-1 in MCF-7-Zellen keinen Einfluss auf die Aktivierung von STAT3. Allerdings führte die Zugabe von Inositol-C2-PAF, das wie dargestellt ein starker Inhibitor des PI3K/AKT-Signalwegs ist, in IL-6-stimulierten Zellen zu einer schwachen Inhibition der Phosphorylierung von STAT3, was mit den Ergebnissen

von Abdelhamed et al. (2016) einhergehen würde und den Ergebnisse von Bian et al. (2018) der kompensatorischen Aktivierung von STAT3 durch Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs eher entgegenstehen würde. Ob diese Inhibition durch Inositol-C2-PAF auf eine direkte Inhibition des STAT3-Signalwegs zurückzuführen ist oder aber über die Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs, bleibt fraglich. Eine genauere Einschätzung erfolgt weiter unten.

4.5 Möglicher Wirkmechanismus von Inositol-C2-PAF

4.5.1 Einfluss von ATLS auf den PI3K/AKT-Signalweg *upstream* und *downstream* von AKT in der Literatur

Um den Wirkmechanismus von Inositol-C2-PAF in Bezug auf den PI3K/AKT-Signalweg besser verstehen zu können, wurde der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Expression und Phosphorylierung weiterer Moleküle *upstream* und *downstream* von AKT untersucht. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss auf den Phosphorylierungspunkt Thr308 von AKT betrachtet. Die Phosphorylierung an dieser Aminosäure ist die Voraussetzung für die AKT-Aktivierung (52).

Chiarini et al. (2008) konnten bereits mittels Western Blot-Analyse darlegen, dass Perifosin in T-Akute lymphatische Leukämie (ALL)-Zellen (CEM-R) zu einer kompletten Hemmung der Phosphorylierung von AKT an Ser473 führte, während es auch zu einer Hemmung der Phosphorylierung von Thr308 kam. Der Einfluss auf Letztere war aber geringer (138). Auch Reis-Sobreiro et al. (2013) konnten ähnliche Ergebnisse in Mantelzelllymphom-Zellen (Z-138) feststellen. Hier verursachte der Einsatz von Edelfosin eine komplette Reduktion der Phosphorylierung von AKT an Ser473. Ebenso konnte zwar eine Reduktion der Phosphorylierung von AKT an Thr308 hervorgerufen werden, die aber auch hier letztlich nicht komplett und immer noch detektierbar war (139).

Upstream von AKT liegt der Gegenspieler der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs, PTEN, der für eine Dephosphorylierung von PIP3 zu PIP2 (52) und dessen eigene Phosphorylierung an Ser380, Thr382, Thr383 oder Ser385 zu einer Inhibition der Phosphatase-Aktivität führt (118). Zudem befindet sich *upstream* die PDK1, die AKT an Thr308 phosphoryliert (52) und deren eigene Phosphorylierung von Ser241 an PDK1 notwendig für die Aktivität ist (119). Eine Auswirkung von ATLS auf beide Proteine ist nach derzeitiger Kenntnislage nicht beschrieben. mTORC1 liegt *downstream* von AKT und wird über Zwischenmoleküle phosphoryliert und aktiviert und sorgt über verschiedene Wege insbesondere für eine Progression des Zellzyklus (55). Die Phosphorylierung von mTOR an Ser2448 wurde in der Literatur zwar häufig als Marker der

Aktivierung von mTORC1 genutzt, jedoch zeigen erhobene Studien, dass zum einen diese Phosphorylierung auch an mTORC2, dem Komplex *upstream* von AKT, der für dessen Phosphorylierung an Ser473 sorgt, auftritt und zum anderen eine Mutation an Ser2448 keinen Einfluss auf die Aktivität zu haben scheint. Während somit die Phosphorylierung von mTOR an Ser2448 mit der Signalaktivität von mTORC1 korrelieren kann, entkräften die genannten Faktoren diese Phosphorylierung als spezifischen Marker für die mTORC1-Aktivität (52). Die hier genannten Ergebnisse und die Diskussion sind daher unter diesem Vorbehalt zu bewerten. Chen et al. (2017) konnten bereits nachweisen, dass Perifosin in der Lungenkarzinomzelllinie A549 zu einer Hemmung der Phosphorylierung von mTOR führte, ohne die Gesamtexpression von mTOR zu verändern (140).

Weiterhin wurde *downstream* die Phosphorylierung des RB-Proteins, einem zentralen Zellzyklus-Regulator (24), an Ser795 und Ser807/Ser811 untersucht. Eine Hyperphosphorylierung des RB-Proteins führt zu seiner Inaktivierung (59), sodass hierdurch der Zellzyklus über die S-Phase eingeleitet werden kann (24). Eine Auswirkung der ATLs auf die Phosphorylierung und Aktivität des RB-Proteins ist nach aktuellem Kenntnisstand der Literatur noch nicht beschrieben.

Zuletzt wurde zudem die Aktivität des sich downstream von AKT befindlichen NF- κ B bestimmt, von dem gemeinhin angenommen wird, durch AKT aktiviert zu werden (54) und dessen Untereinheit p65 als repräsentative Untereinheit seiner Aktivität gilt (62). Lin et al. (2012) konnten nachweisen, dass Perifosin in MCF-7/ADM-Zellen zu einer signifikant erniedrigten Aktivität von NF- κ B führte (62). García et al. (2009) legten jedoch gegenteilig dar, dass in Lymphomzellen der Maus (LBR-V160 und LBR-D160) die Nutzung der PI3K-Inhibitoren Wortmannin und LY294002 für eine Aktivierung von NF- κ B sorgte (63). Die Literatur erscheint dementsprechend zu uneinheitlichen Ergebnissen zu kommen.

4.5.2 Einfluss von Inositol-C2-PAF auf den PI3K/AKT-Signalweg *upstream* und *downstream* von AKT

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass Inositol-C2-PAF keinen Einfluss auf die Gesamtexpression oder die Phosphatase-Aktivität von PTEN hatte. Auch die Gesamtexpression oder Aktivität der PDK1 wurde durch Inositol-C2-PAF nicht beeinflusst. Somit scheint Inositol-C2-PAF die Aktivität von AKT nicht über die PDK1 und dessen induzierte Phosphorylierung an Thr308 zu beeinflussen. Diese These wird dadurch gestützt, dass Inositol-C2-PAF die Phosphorylierung an Thr308 hier nicht hemmte. Damit können die Ergebnisse von Chiarini et al. (2008) und Reis-Sobeiro et al. (2013) bestätigt werden, dass die Hemmung von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung von AKT an Ser473 deutlich stärker war als auf die Phosphorylierung

an Thr308 (138,139). Dass allerdings überhaupt eine Hemmung der Phosphorylierung von Thr308 durch ATLS wie Perifosin und Edelfosin hervorgerufen werden kann, wie von diesen beiden Studien beschrieben (138,139), kann durch die hier vorliegende Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Diese Differenz in der Wirkung könnte einerseits daran liegen, dass strukturell ein Unterschied der genutzten ATLS besteht und somit auch die genauen Wirkorte und Wirkmechanismen unterschiedlich sein können. Zudem wurden in den beiden zitierten Studien Zellen hämato-/onkologischer Erkrankungen betrachtet (138,139), während in dieser Arbeit mit MCF-7-Zellen solide Mammakarzinomzellen (103) untersucht wurden. Auch dieser Faktor könnte eine Auswirkung auf Wirkort und Wirkmechanismus haben.

Downstream von AKT (55) zeigte sich, dass Inositol-C2-PAF einen hemmenden Einfluss auf die Phosphorylierung von mTORC1, jedoch keinen auf die Gesamtexpression hatte. Diese Ergebnisse bestätigen die oben genannte Studie von Chen et al. (2017), die genau diesen Sachverhalt ebenfalls bereits in Lungenkarzinomzellen nachweisen konnte (140). Ferner kommt es ebenso zu einer Hemmung sowohl von der Phosphorylierung von pRB^{S795} als auch von pRB^{S807/S811}. Da nur eine Hyperphosphorylierung zur Inaktivität des Proteins führt (59), ist dies ein guter Hinweis, dass Inositol-C2-PAF in der Konsequenz höchstwahrscheinlich zu einer verbleibenden Aktivität des RB-Proteins beiträgt und somit den Zellzyklus beziehungsweise die Proliferation der Zelle hemmt (24). Diese Ergebnisse sind ein starker Hinweis darauf, dass Inositol-C2-PAF über den PI3K/AKT-Signalweg einen Hauptsignalweg hemmen kann, der normalerweise für die Proliferation der Zelle sorgen würde (52), was die hier erhobenen Ergebnisse auch auf zellulärer Ebene im Proliferationsassay bereits gezeigt haben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Einfluss durch Inositol-C2-PAF auf die Aktivität der p65-Untereinheit von NF-κB beobachtet werden, die als repräsentative Untereinheit der NF-κB-Aktivität gilt (62). Ein negativer Effekt wäre zunächst aufgrund der Aussage in der bekannten Literatur, dass die Aktivierung von AKT ebenso zu einer Aktivierung von NF-κB führt (54), naheliegend gewesen. Somit können allerdings die oben genannten Befunde von Lin et al. (2012), dass Perifosin zu einer Hemmung der Aktivität von NF-κB führt (62), mit Inositol-C2-PAF nicht bestätigt werden. Im Gegenteil kann jedoch auch die Studie von García et al. (2009), die von einer Aktivierung von NF-κB nach Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs spricht (63), damit nicht unterstützt werden. Somit bleibt die Datenlage in der Literatur weiterhin uneinheitlich. Möglicherweise spielen in der Aktivierung und Hemmung von NF-κB zu viele weitere Faktoren aus anderen Signalwegen mit, als dass eine genaue Erklärung dieser Ergebnisse geschweige denn eine Vorhersage, wie Ergebnisse mit anderen Zellen oder anderen ATLS aussehen könnten, gegeben werden kann. Ferner wurde in dieser Arbeit auch nur eine Untereinheit von NF-κB untersucht. Zukünftige Experimente sollten auch diesen Aspekt berücksichtigen und die weiteren relevanten Untereinheiten von NF-κB mit einschließen.

4.5.3 Darstellung eines möglichen Wirkmechanismus von Inositol-C2-PAF auf den PI3K/AKT- und den STAT3-Signalweg

Aufgrund der amphiphilen Struktur von Inositol-C2-PAF liegt die Vermutung nahe, dass die Verbindung in die Plasmamembran eingebaut wird (96,100). Dies wurde auch schon für andere ATLS wie Edelfosin beschrieben (73). Daher lässt sich die Hemmung der AKT-Aktivierung durch Inositol-C2-PAF, aber auch durch andere ATLS wie Perifosin, wie bereits in der Literatur vermutet, durch eine Hemmung der Bindung von AKT an PIP3 über seine PH-Domäne erklären (49). Da in dieser Arbeit eine Hemmung der Phosphorylierung von Ser473 an AKT durch Inositol-C2-PAF nachgewiesen werden konnte, die durch mTORC2 durchgeführt wird (52), welches ebenfalls über eine PH-Domäne an PIP3 binden kann (57), würde dies die genannte These unterstützen (49). Allerdings konnte eine Hemmung der Phosphorylierung an Thr308 von AKT durch Inositol-C2-PAF hier nicht nachgewiesen werden. Da auch die PDK1 über eine PH-Domäne an PIP3 binden kann, spricht dies der genannten These (49) jedoch eher entgegen. Der Einfluss von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung an Thr308 sollte daher in weiteren Studien auch in anderen Zelllinien überprüft werden. Die Arbeitshypothese zum Wirkmechanismus von Inositol-C2-PAF ist in Abb. 14 zusammengefasst. Wie eine in dieser Arbeit dargestellte Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 ausgelöst wird, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Auch hier wäre die Hemmung der membranahen JAK, die *upstream* von STAT3 agiert (36), durch Inositol-C2-PAF zumindest denkbar.

IL-6 führt, wie gezeigt, auch zu einer AKT-Aktivierung. Ein solcher Crosstalk zwischen den beiden Signalwegen wurde bereits in der Studie Abdelhamed et al. (2016) gezeigt. In deren Studie führte eine PI3K/AKT-Hemmung auch zu einer Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 (133). Somit könnte eine Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs durch Inositol-C2-PAF auch für die Hemmung des STAT3-Signalwegs verantwortlich sein, wie es in dieser Arbeit gezeigt wurde. Allerdings konnte IGF-1 als Aktivator des PI3K/AKT-Signalwegs in den MCF-7-Zellen STAT3 nicht aktivieren. Dies lässt wiederum eine Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs als Begründung der Hemmung des STAT3-Signalwegs durch Inositol-C2-PAF weniger plausibel erscheinen, wenn man hypothetisch davon ausginge, dass eine ‚zweigleisige‘ Aktivierung der beiden Signalwege in beide Richtungen erfolgt. In folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob und welche Moleküle des kanonischen STAT3-Signalweges durch Inositol-C2-PAF in den MCF-7-Zellen beeinflusst werden. Auch könnte zu einem Erkenntnisgewinn führen, ob die Hemmung von AKT durch einen spezifischen AKT-Inhibitor in den Zellen ebenfalls zu einer Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 führt. Außerdem könnte man die von Abdelhamed et al. (2016)

durchgeführte Studie mit den NSCLC-Zellen PC-9 aufgreifen, bei der durch Inhibition des PI3K/AKT-Signalwegs eine Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 beschrieben wird (133) und diese unter gleichen Bedingungen (und gegebenenfalls unter Stimulation mit IGF-1) mit dem Hemmstoff Inositol-C2-PAF durchführen um diese Studie zu erweitern und die Signalweg-Wirkung zu überprüfen.

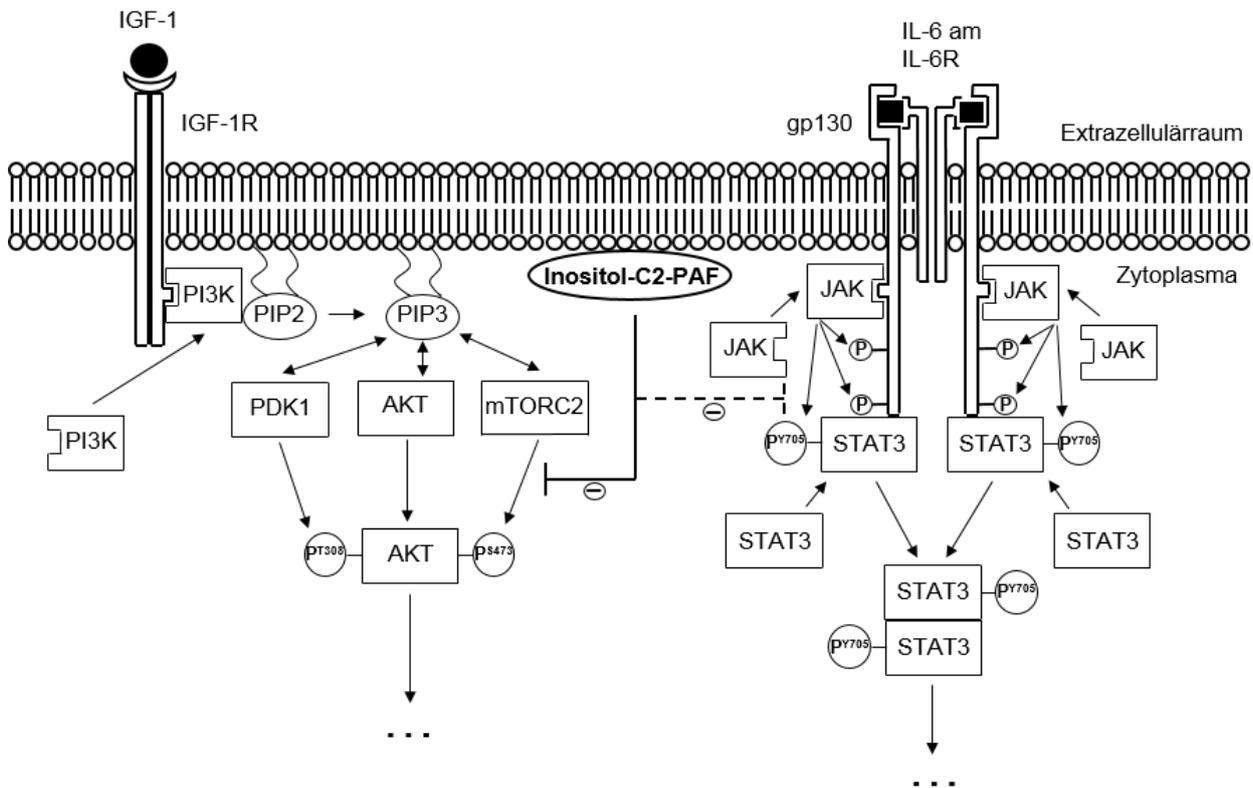


Abbildung 14: Vorgeschlagener Wirkmechanismus von Inositol-C2-PAF

Dargestellt sind links der PI3K/AKT-Signalweg nach Stimulation via IGF-1 (50) und rechts der IL-6-Signalweg über STAT3 (4). Beide Signalwege sind bereits in Abb. 1 und 2 detailliert vorgestellt. Hier sind Auszüge beider Signalwege wiedergegeben. Aufgrund seiner amphiphilen Struktur kann davon ausgegangen werden, dass Inositol-C2-PAF wie andere ATLS auch, z. B. Edelfosin (73), in die Zellmembran eingebaut wird und von dort aus seine Wirkung entfaltet (96). Wie die Abbildungen 10b und 11b zeigen, erscheint die hemmende Wirkung von Inositol-C2-PAF auf die Phosphorylierung von AKT stärker als auf die Phosphorylierung von STAT3, wobei AKT, wie in Abb. 13c erkennbar, nur in seiner Phosphorylierung an Ser473 von mTORC2 durch Inositol-C2-PAF gehemmt wird und nicht in seiner Phosphorylierung an Thr308 durch die PDK1.

Die Darstellung der Abbildung ist angelehnt an Abbildungen von Johnson et al. (2018) (36), Wang und Sun (2014) (44), Fan und Weiss (2011) (68) und Manning und Toker (2017) (52).

4.6 Neueinteilung der Antitumorlipide

4.6.1 Bisherige Einteilung der Antitumorlipide und deren Problematik in der Literatur

Während der Literaturrecherche für diese Arbeit kam die Idee auf, dass eine neue Einteilung und Nomenklatur der Antitumorlipide einige Vorteile hätte. Dies ist vor allem auf bislang bestehende uneinheitliche Klassifikationen und Namensbezeichnungen der Antitumorlipide zurückzuführen, aber auch darauf, dass bestimmte Vertreter in ihre Untergruppen der Antitumorlipide strukturell nicht hereinpassen (Beispiel Perifosin) oder in mehrere passen würden (Beispiel Edelfosin) (73) und dass andere Vertreter, obwohl sie strukturell den anderen Verbindungen sehr ähnlich sind (85), aufgrund der Beschränktheit der Untergruppenbezeichnungen keinen Zugang zu diesen Klassifikationen überhaupt finden (Beispiel Ohmlin). Dies soll im Folgenden näher erklärt und untermauert werden und zum Schluss zu einem neuen Vorschlag einer Unterteilung der Antitumorlipide führen, die die genannten Probleme berücksichtigt. Somit konnte die in dieser Arbeit in der Einleitung genutzte Unterteilung der Antitumorlipide auch nur ein Kompromiss dieser bislang genutzten, aber uneinheitlichen Einteilungen aus der Literatur sein.

Uneinigkeit in der Literatur herrscht bereits im Oberbegriff der Antitumorlipide. Die Gruppe Mollinedo et al. (2004) benutzt, wie auch in dieser Arbeit, den Begriff der Antitumorlipide (ATLs) als Oberbegriff. Von dort aus erfolgt eine Unterteilung in zwei große Untergruppen: die Alkyletherphospholipide (AEPs), die auch als Antitumoretherlipide (AELs) und oder Alkyllysophospholipid-Analoga (ALPs) bezeichnet werden (Hauptvertreter dieser Gruppe ist das Edelfosin) und die Alkylphosphocholine (APCs) mit dem Hauptvertreter Miltefosin (69). Dem entgegen werden von der Gruppe Rüter et al. (2003) alle genannten Derivate (Edelfosin, Perifosin und Miltefosin) einfach als Alkyllysophospholipide (ALPs), ohne eine weitere Unterteilung, bezeichnet (89). Von Haefen et al. (2011) wiederum bezeichnen alle Verbindungen (Edelfosin, Perifosin und Miltefosin sowie deren neu synthetisierten Moleküle Glc-PAF, Glc-PC und Inositol-C2-PAF) überbegrifflich als Alkylphospholipide (APLs) (98). Die Gruppe van Blitterswijk et al. (2012) bezeichnet alle Verbindungen (Edelfosin, Miltefosin, Perifosin, Erufosin, Erucylphosphocholin) wie Rüter et al. (2003) als ALPs, nutzt diese Abkürzung aber auch als Überbegriff der beiden großen Gruppen Alkylphosphocholine und Alkyllysophosphocholine (72). Hiermit wird auch klar, dass ebenso Uneinigkeit in der Bezeichnung der Untergruppen besteht. Auch Gajate und Mollinedo (2014) führen einen gemeinsamen Überbegriff an und fassen alle Moleküle (Edelfosin, Miltefosin, Perifosin und Erucylphosphocholin) als Alkylphospholipide (APLs) zusammen, die sie synonym auch als Alkyllysophospholipide (ALPs) und Antitumorlipide

(ATLs) bezeichnen (77). Im Gegensatz dazu werden in der Arbeit von Alam et al. (2012) alle Derivate (Edelfosin, Perifosin, Miltefosin, Erucylphosphocholin) zusammen als Alkylphosphocholine (APCs) benannt (141). Ähnlich wird es in der Arbeit von Vink et al. (2005) angegeben, in der Perifosin als Alkylphosphocholin (APC) bezeichnet wird und Edelfosin und Miltefosin als APC(-ähnliche) Verbindungen (142). Auch Jangir et al. (2014) folgen dieser Benennung und fassen alle Moleküle (Mildefosin, Perifosin, Erufosin und Edelfosin) als Alkylphosphocholine zusammen (APC) (143).

Eine Einteilung in zwei Gruppen wie oben genannt durch Mollinedo et al. (2004) (69) nehmen auch Jaffrès et al. (2016) vor: in Alkyletherlipide (AELs) mit Edelfosin und in Alkylphosphocholine (APCs) mit Miltefosin, Perifosin und Erufosin (73). Verheij et al. (2014) wiederum nehmen als Überbegriff die Alkylphospholipide (APLs) und führen eine weitere Unterteilung in Alkyllysophospholipide (ALPs) mit Edelfosin und Alkylphosphocholine (APCs) mit Miltefosin an und bezeichnen die modifizierten Verbindungen Perifosin und Erufosin als Vertreter neuer Subgruppen der APLs (74). Bagley et al. (2011) wiederum bezeichnen das Edelfosin als Vertreter der Alkylphospholipide (APLs) und die Alkylphosphocholine (APCs) als nächste Generation dieser Verbindungen, zu denen dann Miltefosin und Perifosin sowie Erucylphosphocholin und Erufosin als neuere Verbindungen gezählt werden (94). Ríos-Marco et al. (2017) führen die Alkylphospholipide (APLs) als Überbegriff ein und unterteilen in die beiden Subgruppen Alkyllysophospholipide (ALPs) mit Edelfosin als Hauptvertreter und die Alkylphosphocholine (APCs) mit Miltefosin als Hauptvertreter, Perifosin als verbessertes APC-Analogon und Erucylphosphocholin und Erufosin als APC der nächsten Generation (51). Dymond et al. (2008) nutzen ebenfalls diese Subgruppenklassifizierung mit den Alkyllysophospholipiden (ALPs) mit Edelfosin auf der einen und den Alkylphosphocholinen (APCs) mit Miltefosin auf der anderen Seite (144).

Zum Schluss führen Danker et al. (2010) an, dass die Antitumorlipide (ATLs) in zwei Subgruppen mit den Alkylphospholipiden (ALPs) mit dem Metaboliten Edelfosin und den Alkylphosphocholinen (APCs) mit der Verbindung Miltefosin unterteilt werden kann. Perifosin wird an dieser Stelle jedoch in die Gruppe der Alkylphospholipide verortet (76). Anders wiederum Semini et al. (2011), die darlegen, dass die Antitumorlipide (ATLs) auch Alkylphospholipide (ALPs) genannt werden und dass die Alkylphosphocholine (APCs) eine weitere Gruppe der ATLs sind und Miltefosin und Perifosin zu dieser Gruppe gehören (97).

Es wird hiermit also deutlich, dass viele dieser Arbeitsgruppen die ähnlichen oder gleichen Begrifflichkeiten benutzen, diese aber an unterschiedlichen Stellen gebrauchen oder aber gleichsetzen. Von einer einheitlichen Bezeichnung kann also an dieser Stelle keine Rede sein. Neben dieser Einteilungsproblematik gibt es aber auch strukturelle Ungereimtheiten. Perifosin beispielsweise wird von vielen Arbeitsgruppen (siehe oben) als Mitglied der Alkylphosphocholine

(APCs) bezeichnet (51,73,74,94,97,141–144). Geschichtlich ist es sicherlich von dem APC Miltefosin abgeleitet, aber es wurde die Cholin-Kopfgruppe des Miltefosin ersetzt durch eine Piperidin-Gruppe (73), womit es nun kein Phosphocholin mehr enthält und somit eigentlich auch nicht mehr als Alkylphosphocholin bezeichnet werden sollte. Dagegen wiederum wird Edelfosin von vielen Arbeitsgruppen als Alkyletherlipid (AEL) oder Alkyllysophospholipid (ALP) bezeichnet und der Gruppe der Alkylphosphocholine (APC) mit Miltefosin gegenübergestellt (51,69,73,74,144). Rein strukturell würde Edelfosin jedoch durchaus auch aufgrund seines Aufbaus (72) als Alkylphosphocholin (APC) bezeichnet werden können, da es alle namensgebenden Strukturelemente dieser Gruppe besitzt.

Ferner ist die neuere dem Edelfosin ähnelnde Verbindung Ohmlin (85), die im Gegensatz zum Edelfosin an der sn-1 Position statt einer 18-C Alkylkette eine 16-C Alkylkette und an der sn-3 Position anstatt des Phosphocholins ein Lactose-Molekül enthält (145), noch nicht in die oben aufgeführte Klassifikation aufgenommen worden, da sie sich aufgrund der fehlenden Phosphat-Gruppe nicht in die bislang existierenden Untergruppen einordnen lässt. Dementsprechend wurde es von den Autoren bislang vereinfacht als Alkyl-Lipid bezeichnet (145).

4.6.2 Vorschlag einer Neueinteilung der Antitumorlipide

Aufgrund der genannten Nomenklatur-Probleme wird an dieser Stelle eine neue vereinfachte Klassifikation vorgeschlagen, die viele der oben genannten Probleme beseitigt. Dargestellt ist diese Klassifikation in Abb. 15. Als einziger Oberbegriff soll dieser Klassifikation der Begriff der funktionellen Alkyl-Lipide (fAL, *functional alkyl lipids*) voranstehen, angelehnt an die Bezeichnung von Girault et al. (2011) (145). Dies erlaubt, auch strukturell, eine breite Anzahl an Verbindungen in diese Klassifikation mit aufzunehmen, so auch die Verbindung Ohmlin. Weiter unterteilt werden die fALs in die beiden Untergruppen Glycerol enthaltende fALs (G-fALs, *glycerol containing fALs*) zu denen das Edelfosin gehört und nicht-Glycerol enthaltende fALs (nG-fALs, *non-glycerol containing fALs*) in die Miltefosin eingruppiert werden kann. Damit wird der bisherigen von den meisten Autoren genutzten Einteilung Rechnung getragen. Edelfosin und Ilmofosin, das im Vergleich zu Edelfosin eine etwas verkürzte 16-C Alkylkette trägt, die über einen Thioether an das Glycerolgerüst geknüpft ist (74) (Abb. 3), sind damit Mitglieder der G-fALs. Die Verbindung Ohmlin würde demnach strukturgemäß auch den Zugang zu dieser Klassifikation finden und als G-fAL bezeichnet werden. Zudem würden auch die in dieser Arbeit vorgestellten glykosidierten Phospholipide in die Gruppe der G-fALs fallen. Jedoch wird aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der Inositol-Gruppe des Inositol-C2-PAF Moleküls um einen Zuckeralkohol handelt (24), eine neue Bezeichnung dieser Gruppe vorgeschlagen, die alle Verbindungen dieser

Klasse umfasst, und zwar die sn-2-Zucker(Alkohol) enthaltenden (sn-2-s(a)c, *sn-2-sugar(alcohol)-containing*) Moleküle. Damit würde auch Ohmlin nicht unter diese Gruppe fallen und könnte aufgrund seines durch einen Ether verknüpften Lactose-Moleküls an der sn-3 Position somit Teil einer neuen Untergruppe der G-fALs werden, beispielsweise gemeinsam mit den bereits bekannten Vertretern der sogenannten glykosylierten Antitumor-Etherlipide (GAEL, *glycosylated antitumor ether lipids*) α -GLN und β -GLN (GLN, 1-O-Hexadecyl-2-O-Methyl-3-O-(2'-Amino-2'-Deoxy- β -D-Glucopyranosyl)-sn-Glycerol). Die GAELs enthalten ein Glycerol-Grundgerüst mit Alkylkette an der sn-1 Position und einem an das Glycerol-Grundgerüst über eine Etherverbindung angeknüpften Zucker an der sn-3 Position (146–148).

Verbindungen wie Miltefosin, Perifosin, Erucylphosphocholin und Erufosin, die von vielen Autoren bislang als Alkylphosphocholine (APCs) zusammengefasst wurden (51,69,73,94,97,144), werden den G-fALs hier als nG-fALs gegenübergestellt. Aufgrund der veränderten Kopfgruppe des Perifosins gegenüber dem Miltefosin (73) wird an dieser Stelle vorgeschlagen, die nG-fALs weiter in Phosphocholin enthaltende (PCc, *phosphocholine containing*) Moleküle mit den Verbindungen Miltefosin, Erucylphosphocholin und Erufosin und in nicht-Phosphocholin-enthaltende (nPCc, *non-phosphocholine containing*) Moleküle mit der Verbindung Perifosin zu unterteilen.

Insgesamt ist diese empfohlene neue Einteilung also eine Verbindung aus den historisch gewachsenen alten Einteilungen und einem Lösungsvorschlag für die Probleme der uneinheitlichen Klassifikation in der Literatur sowie der Einteilung mancher Verbindungen aufgrund ihrer Struktur. Diese Einteilung kann darüber hinaus mit Blickrichtung auf neue Synthesewege innerhalb der fALs erweitert werden.

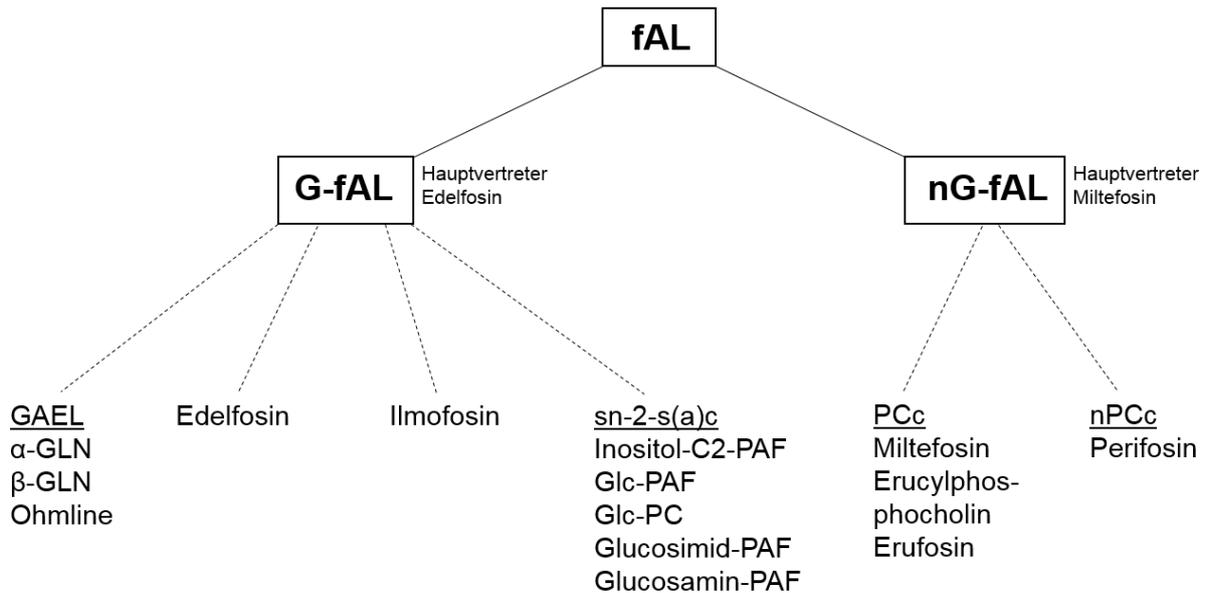


Abbildung 15: Vorschlag für eine neue Einteilung der Antitumorlipide - funktionelle Alkyl-Lipide (fALs)

Die sogenannten funktionellen Alkyl-Lipide (fALs, functional alkyl lipids) werden aufgrund ihrer Struktur in die beiden Untergruppen Glycerol enthaltende fALs (G-fALs, glycerol containing fALs) und nicht-Glycerol enthaltende fALs (nG fALs, non-glycerol containing fALs) unterteilt. Die G-fALs umfassen die bekannten Verbindungen Edelfosin und Ilmofosin. Eine Untergruppe der G-fALs stellt die Gruppe der sn-2-Zucker(Alkohol) enthaltenden (sn-2-s(a)c, sn-2 sugar(alcohol)-containing) Moleküle dar. Diese Gruppe soll die derzeit bestehende Gruppe unter dem Begriff der glykosidierten Phospholipide ersetzen und enthält u. a. die Vertreter Inositol-C2-PAF, Glc-PAF, Glc-PC, Glucosimid PAF und Glucosamin-PAF. Eine weitere Untergruppe umfasst die glykosylierten Antitumor-Etherlipide (GAEL, glycosylated antitumor ether lipids) mit den bekannten Vertretern α -GLN und β -GLN. Auch die Verbindung Ohmline kann strukturell in diese Gruppe eingeordnet werden. Die nG-fALs werden strukturell weiter unterteilt in die Phosphocholin enthaltenden (PCc, phosphocholine containing) und die nicht-Phosphocholin enthaltenden (nPCc, non phosphocholine containing) Moleküle. Zur Gruppe der PCc gehören Miltefosin, Erucylphosphocholin und Erufosin. Perifosin mit der Piperidin-Kopfgruppe anstatt des PC gehört zu den nPCc.

4.7 Ausblick

Im Rahmen der Diskussion sind bereits zahlreiche Hinweise auf mögliche weitere Untersuchungsfelder und konkrete Studienvorschläge gegeben worden. An dieser Stelle sollen daher noch einige relevante Forschungsfelder thematisiert werden, die über den derzeitigen Forschungsstand hinaus künftig von Interesse sein können.

Eine recht neue Gruppe von Tumormedikamenten sind die sogenannten Immun-Checkpoint-Inhibitoren, die beispielweise in der Therapie des fortgeschrittenen kleinzelligen Lungenkarzinoms inzwischen eine große Rolle spielen und als therapeutischer Durchbruch gelten (149). Der therapeutische Ansatz dieser Inhibitoren bezieht die Tatsache ein, dass zytotoxische T-Zellen tumorspezifische Antigene erkennen können und somit für die Eliminierung dieser Tumorzellen sorgen können. Bestimmte Rezeptoren auf den T-Zellen, die als Immun-Checkpoints bekannt sind, können diese Funktion der Zellen negativ regulieren. Dabei ist PD-1

(*programmed death-1*) einer der Bekanntesten dieser Immun-Checkpoints und negativer Regulator der T-Zell-Funktion. Es gibt einige Tumorarten, die den korrespondierenden Liganden PD-L1 (*programmed death ligand 1*) exprimieren und somit zu einer T-Zell-Inaktivierung führen und damit einer Immun-Überwachung entkommen können (133). Antikörper wie Nivolumab, das beim NSCLC eingesetzt wird (150), können durch ihre Bindung an den PD-1-Rezeptor die Interaktion von PD-1/PD-L1 stören und somit eine T-Zell-Aktivierung aufrechterhalten beziehungsweise wiedergewinnen, sodass eine Zerstörung der Krebszellen ermöglicht wird (133).

Zu den PD-L1 exprimierenden Entitäten gehören auch die soliden Tumorarten wie Lungenkarzinome und Brustkrebs. Es zeigte sich, dass bei Brustkrebspatientinnen beispielsweise eine PD-L1 Überexpression mit erhöhter Lymphknotenmetastasierung und ER-Negativität assoziiert ist (151). Unter den *triple*-negativen Mammakarzinomen exprimieren etwa 20 % PD-L1. Mittendorf et al. (2014) konnten zeigen, dass in der MDA-MB-468 Zelllinie, in der ein PTEN-Verlust und eine erhöhte PI3K/AKT-Signaltransduktionsrate besteht, unter Einsatz des AKT-Inhibitors MK-2206 und des mTOR-Inhibitors Rapamycin eine verminderte PD-L1 Expression dieser Zellen erreicht werden konnte (152). Auch Abdelhamed et al. (2016) konnten in ihrer Studie mit NSCLC-Zellen zeigen, dass durch Inhibition entweder des STAT3 oder des PI3K/AKT-Signalwegs die Expression von PD-L1 vermindert werden könnte (133). Anhand dieser Daten erscheint demnach der PI3K/AKT-Signalweg neben dem STAT3-Signalweg als durchaus vielversprechender Weg, um die Wirkung von anderen Therapeutika wie den oben genannten Antikörpern zu unterstützen beziehungsweise selbst für eine Verminderung der Expression von PD-L1 zu sorgen, zum Beispiel durch Inositol-C2-PAF. Eine versuchsweise Kombinationstherapie oder alleinige Therapie von Inositol-C2-PAF beispielsweise mit Nivolumab in PD-L1 exprimierenden Mammakarzinomzellen wie den MDA-MB-468 Zellen oder PD-L1-exprimierenden Lungenkarzinomzellen wäre somit zu erörtern.

Aznar et al. (2013) berichten, dass Edelfosin, einer der Prototypen der ATLs, sich zwar als effektives gegen verschiedene Tumorzellen gerichtetes Agens zeigte, jedoch präsentierten sich in klinischen Studien auch einige Nachteile wie zum Beispiel die Dosis-abhängige hämolytische Toxizität nach intravenöser Gabe, eine schlechte orale Bioverfügbarkeit und gastrointestinale Toxizität bei oraler Gabe. Sie konnten in ihrer Studie demonstrieren, dass Edelfosin unter Gabe und Einschluss von Lipid-Nanopartikeln (LN), kolloidalen Transportern aus einer Lipidmatrix mit guten Permeabilitätseigenschaften, die oral gegeben werden können, besser und in einer höheren Konzentration von Tumorzellen aufgenommen werden konnten und die Proliferation von MCF-7-Zellen nach 72 h signifikant 1,37 mal effektiver inhibieren konnte als freies Edelfosin (95). Estella-Hermoso de Mendoza et al. (2011) konnten in ihrer Studie mit Edelfosin-LN zudem zeigen, dass in einem Gliom-Modell der Maus die therapeutische Aktivität von Edelfosin-LN höher

war als von freiem Edelfosin und dass die Tumorlast von Edelfosin-LN behandelten Mäusen signifikant kleiner war als bei solchen, die mit freiem Edelfosin behandelt wurden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die LN dafür nützlich sein können, Edelfosin verbessert über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn zu befördern um bei neoplastischen Erkrankungen des Gehirns effektiver zu wirken (153). Ob sich dies auch mit Inositol-C2-PAF realisieren lässt, ist durch Untersuchungen mit LN und Inositol-C2-PAF in MCF-7-Zellen zu verifizieren, möglicherweise unter den von Aznar et al. (2013) beschriebenen Bedingungen. Jedoch ist es natürlich von Bedeutung, auch zu untersuchen, ob die hier genutzten LN nicht zusätzlich auch vermehrt von nicht-Tumorzellen aufgenommen werden, was Nebenwirkungen erhöhen würde.

Welche strukturellen Veränderungen der ATLs für welche Wirkung verantwortlich sind, steht derzeit noch zur Debatte. Ob das Glycerol-Grundgerüst wichtig für die negative Wirkung von Edelfosin und Ohmlin auf die Zellmigration ist, kann nur vermutet werden, aber Miltefosin, welches kein Glycerin-Gerüst enthält, zeigte sich im Effekt auf die Zellmigration dem Edelfosin unterlegen. Wiederum eine Variation an der sn-2 Position wie die Substitution der Methoxygruppe bei Edelfosin durch -OH bei Lyso-PAF oder dem Einbau von -OH an der sn-3 Position anstatt des Phosphocholins reduzierte zwar die Zelltoxizität, hob aber auch die Fähigkeit der Auswirkung auf die Zellmigration auf (145). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist auch bei Inositol-C2-PAF der negativ hemmende Effekt auf die Proliferation größer als auf die Migration. Ob und wie die einzelnen Gruppen dieser Verbindung Einfluss hierauf haben, bleibt zu erörtern. Daher sind direkte Vergleichsstudien erforderlich, die möglichst viele unterschiedliche ATLs in den Versuchen miteinschließen, um einerseits einen Effektivitätsvergleich insgesamt zwischen den ATLs zu bestimmen und um andererseits in Struktur-/Wirkungsbeziehungen herauszufinden, welche Anteile der Moleküle möglicherweise für welchen Aspekt der Wirkung der ATLs relevant sind.

4.8 Einschränkung und Schwächen der eigenen Arbeit sowie Fehlerdiskussion

Die Schwächen der hier vorliegenden Arbeit umfassen grundsätzlich zwei Aspekte, die die hier getätigten Aussagen aufgrund der Ergebnisse einschränken: konzeptionelle Beschränkungen (einer zeitlich und personell begrenzten medizinischen Dissertation) und direkte methodische Schwächen.

Zu den konzeptionellen Beschränkungen gehört zunächst, dass in dieser Arbeit alle Experimente an nur einer Mammakarzinom-Zelllinie, den MCF-7-Zellen, durchgeführt wurden. Für eine Bestätigung dieser hier gewonnenen Ergebnisse und gemachten Aussagen sollte eine weitere

Zelllinie unter gleichen Bedingungen getestet werden. Als Beispiel würde sich die Zelllinie MDA-MB-231 anbieten, eine *triple*-negative Mammakarzinom-Zelllinie (104), die im Verhältnis stärker invasiv ist als die MCF-7-Zellen (3) und sowohl IL-6 (16) als auch CCL2 (29) sowie die dazugehörigen Rezeptoren exprimiert (16,31).

Darüber hinaus wäre der Vergleich mit einer nicht-soliden Tumorzelllinie sinnvoll, beispielsweise den Jurkat-Zellen (T-ALL) oder BJAB-Zellen (Burkitt-Lymphom) für die eine Inhibition der Proliferation durch Inositol-C2-PAF sogar schon nachgewiesen werden konnte (2), und deren Beeinflussung durch Inositol-C2-PAF somit weitergehend hätte untersucht werden können. Zusätzlich gibt diese Arbeit im Zusammenspiel mit schon veröffentlichten Studien zwar schon einen guten Hinweis auf die Wirkungsweise und Effektivität von Inositol-C2-PAF *in vitro* auf die einzelne Zelle, ohne Zusammenspiel im gesamten Organismus auch mit anderen Zellen, jedoch ist damit eine folgende Überprüfung im tierexperimentellen Modell *in vivo* unumgänglich, wenn zum Beispiel genaue Wirkstoffkonzentrationen, Nebenwirkungen, Verstoffwechslung oder selektive Tumorzellaufnahme in soliden Tumorzellen beurteilt werden sollen. Diese Arbeit kann dies noch nicht bieten, aber erste Erkenntnisse bezüglich Inositol-C2-PAF sind bereits der Studie von Forkel et al. (2014) in einem Mausmodell mit Psoriasis zu entnehmen (102). Ferner konnten bestimmte Effekte, die in anderen Studien beschrieben worden sind, hier nicht bestätigt werden. Dazu gehört zum Beispiel die Auslösung der EMT in MCF-7-Zellen durch IGF-1, IL-6 und CCL2 (17,48). Es wurde versucht, einen Versuchsansatz aus den Bedingungen von verschiedenen Studien herzuleiten, die unterschiedliche Zellen (zum Beispiel NSCLC-Zellen (17)), Zellvergesellschaftungen (zum Beispiel MCF-7 als 3D-Modell (27)), Konzentrationen der Stimulanzen oder deren Inkubationszeiten nutzten (17,27,46,48). Es gab keine Studie, an der sich vollständig orientiert werden konnte. Das machte jedoch das hier angewandte Konzept dementsprechend nicht vollständig vergleichbar, sodass letztlich wie nachgewiesen hier eine EMT auch nicht ausgelöst werden konnte.

Zu den methodischen Schwächen gehört, dass einige der genutzten Methoden von der subjektiven Einschätzung des Untersuchers abhängig sind. Dazu gehören der Zellviabilitäts-Assay via Trypan-Blau-Färbung, der haptotaktische Migrationsassay über eine mit Kollagen I beschichtete Filtermembran und der Proliferationsassay über Hoechst-Zellkernfärbung und indirekte Immunfluoreszenz-Analyse, in denen Zellen direkt durch den Untersucher gezählt wurden. Zwar können durch Vereinheitlichung der Zählweise oder zum Beispiel der Anfertigung der Fotos in der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse die Fehler klein gehalten werden, trotzdem ist die subjektive Einschätzung zum Beispiel der Mitosephasen im Zellproliferationsassay methodenbedingt fehleranfällig.

Dies gilt auch für den Zellviabilitäts-Assay, in dem die Arbeitskonzentration für Inositol-C2-PAF festgestellt wurde und der somit Auswirkungen auf alle weiteren Untersuchungen hatte. Aufgrund

der im Zellviabilitätsassay erhaltenen Daten wurde in allen Experimenten die nicht-toxische Konzentration von 5 μM eingesetzt. Diese Konzentration zeigte sich allerdings auch bereits in anderen Zellen bei anderen Autoren effektiv (96,100,101). Eine Ausnahme stellten die Versuche der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse dar. Hier wurde in ersten Versuchsansätzen (Daten nicht gezeigt) festgestellt, dass die Nutzung einer Konzentration von 5 μM Inositol-C2-PAF in diesem in der Methodik beschriebenen Versuchsaufbau für einen verstärkten Zelltod der MCF-7-Zellen sorgten. Eine genaue Kausalität kann an dieser Stelle nicht genannt werden, jedoch kann vermutet werden, dass die Kombination aus dem Wachstum der Zellen auf den unbeschichteten Deckgläsern in Verbindung mit der Inkubation mit dem potentiell toxischen Inositol-C2-PAF als gemeinsame sich ergänzende Stressfaktoren für die Zellen den Zelltod auslösten. Daher wurden für die im Ergebnisteil dargestellten Versuche der indirekten Immunfluoreszenz-Analyse die nächstgeringere nicht signifikant toxische Konzentration von 2,5 μM Inositol-C2-PAF, genutzt. Hier zeigte sich, dass keine vermehrte Zelltodrate der MCF-7-Zellen unter den dargestellten Versuchsbedingungen auftrat.

Weiterhin gehört die Anzahl der durchgeführten Versuche in den Experimenten zu den Schwächen dieser Arbeit. Um die erhobenen Ergebnisse einer statistischen Datenanalyse zu unterziehen, wurden jeweils zweiseitige, unverbundene T-Tests durchgeführt. Die Durchführung eines T-Tests erfordert eine Normalverteilung der Stichproben und eine Homoskedastizität der Werte (111). Aufgrund der hier nur sehr kleinen Stichprobenzahl der Anzahl der durchgeführten Experimente pro Versuch von, in der Regel, drei erscheint eine Testung auf Normalverteilung und Homoskedastizität der Werte allerdings nicht sinnvoll. Aus formalen Gründen wurde jedoch zuvor für die untersuchten Stichproben der Levene-Test zur Prüfung auf Homoskedastizität und der Shapiro-Wilk-Test zur Prüfung auf Normalverteilung durchgeführt. Sollte eine Stichprobe nach Testung mit Shapiro-Wilk nicht normalverteilt gewesen sein, wurde dennoch der T-Test durchgeführt, sofern die Stichproben gleich groß waren und Varianzgleichheit herrschte, da der T-Test auf Verletzungen seiner Voraussetzungen sehr robust reagiert (111).

Alternativ wäre der U-Test nach Mann und Whitney aufgrund seiner Unabhängigkeit von der Normalverteilung infrage gekommen. Dieser erfordert aber bereits rechnerisch einen Stichprobenumfang $n > 3$ bei gleich großen Stichprobenumfängen, damit die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ möglich ist, und wurde daher verworfen (111).

Ferner wurden die Experimente zur indirekten Immunfluoreszenz-Analyse unter den jeweiligen dargestellten Bedingungen jeweils nur einmal durchgeführt (bis auf den Zellproliferationsassay, dieser wurde insgesamt viermal durchgeführt), was für statistische Zwecke unzureichend und somit kritisch wäre, jedoch dienen diese Abbildungen nur der Veranschaulichung bereits in anderer Form dargestellter Ergebnisse, weshalb dieser Fehler vernachlässigbar ist. Das Experiment der cIEF wurde insgesamt zweimal mit je zwei technischen Replikaten durchgeführt,

die statistisch unabhängig voneinander betrachtet wurden. Diese Herangehensweise ist insofern nicht ganz korrekt, da für eine statistische Analyse normalerweise nur die biologischen Replikate benutzt werden, womit die Ergebnisse dieses Versuchs dahingehend nur eingeschränkt zu bewerten sind.

Aufgrund all dieser zuvor genannten einschränkenden Charakteristika der Arbeit, vor deren Hintergrund die Ergebnisse zu betrachten sind, ist insgesamt eher von einem explorativen Forschungsdesign zu sprechen, auch wenn die Methodik eines konfirmatorischen Designs angewandt wird (113). Dabei führen die Ergebnisse zu bereits genannten neuen Fragestellungen und Hypothesen, die auch unter Nutzung größerer Stichprobenzahlen erörtert werden sollten.

Literaturverzeichnis

1. Pelz C, Häckel S, Semini G, Schrötter S, Bintig W, Stricker S, Mrawietz G, Klein A, Lucka L, Shmanai V, Eickholt B, Hildmann A, Danker K. Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells. *Cellular Oncology* [Internet]. 25. Juli 2018; Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0387-3>
2. Geo Semini, Annette Hildmann, Clarissa von Haefen and Kerstin Danker. Glycosidated Phospholipids – a Promising Group of Anti-Tumour Lipids. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2014;14(4):607–17.
3. Liu Z, Brattain MG, Appert H. Differential Display of Reticulocalbin in the Highly Invasive Cell Line, MDA-MB-435, versus the Poorly Invasive Cell Line, MCF-7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 13. Februar 1997;231(2):283–9.
4. Zhou N, Zhang Y, Zhang X, Lei Z, Hu R, Li H, Mao Y, Wang X, Irwin DM, Niu G, Tan H. Exposure of Tumor-Associated Macrophages to Apoptotic MCF-7 Cells Promotes Breast Cancer Growth and Metastasis. Cho WC, Herausgeber. *International Journal of Molecular Sciences*. Juni 2015;16(6):11966–82.
5. Yousefi M, Nosrati R, Salmaninejad A, Dehghani S, Shahryari A, Saberi A. Organ-specific metastasis of breast cancer: molecular and cellular mechanisms underlying lung metastasis. *Cellular Oncology*. 1. April 2018;41(2):123–40.
6. Christopoulos PF, Msaouel P, Koutsilieris M. The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. *Molecular Cancer*. 2015;14:43.
7. Statistisches Bundesamt (Destatis). Todesursachenstatistik in Deutschland 2020 [Internet]. 2022 [zitiert 3. März 2022]. Verfügbar unter: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23211-0002#abreadcrumb>
8. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 4. Februar 2015;65(2):87–108.
9. Gätje R, Eberle C, Scholz C, Lübke M, Solbach C, Muschel K, Kissler S, Siedentopf F, Weißenbacher T, Debus G, Schuhmacher I, Sängler N. *Kurzlehrbuch Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2011.
10. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009.
11. Lin NU, Winer EP. New targets for therapy in breast cancer: Small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Breast Cancer Research*. 2004;6(5):204–10.
12. Weil RJ, Palmieri DC, Bronder JL, Stark AM, Steeg PS. Breast Cancer Metastasis to the Central Nervous System. *The American Journal of Pathology*. Oktober 2005;167(4):913–20.
13. Emler DR, Schwartz R, Brown KA, Pollice AA, Smith CA, Shackney SE. HER2 expression as a potential marker for response to therapy targeted to the EGFR. *British Journal of Cancer*. 24. April 2006;94(8):1144–53.

14. Bohl CR, Harihar S, Denning WL, Sharma R, Welch DR. Metastasis suppressors in breast cancers: mechanistic insights and clinical potential. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. Januar 2014;92(1):13–30.
15. Gunasinghe NPAD, Wells A, Thompson EW, Hugo HJ. Mesenchymal–epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 1. Dezember 2012;31(3):469–78.
16. Dethlefsen C, Højfeldt G, Hojman P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1. April 2013;138(3):657–64.
17. Chen W, Gao Q, Han S, Pan F, Fan W. The CCL2/CCR2 axis enhances IL-6-induced epithelial–mesenchymal transition by cooperatively activating STAT3–Twist signaling. *Tumor Biology*. 2015;36(2):973–81.
18. Jamora C, Fuchs E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biology*. 1. April 2002;4:E101.
19. Leong C-M, Hibma MH. A flow cytometry-based assay for the measurement of protein regulation of E-cadherin-mediated adhesion. *Journal of Immunological Methods*. 1. Juli 2005;302(1):116–24.
20. Guttilla IK, Phoenix KN, Hong X, Tirnauer JS, Claffey KP, White BA. Prolonged mammosphere culture of MCF-7 cells induces an EMT and repression of the estrogen receptor by microRNAs. *Breast Cancer Research and Treatment*. 1. Februar 2012;132(1):75–85.
21. Lebrecht A, Grimm C, Lantsch T, Ludwig E, Hefler L, Ulbrich E, Koelbl H. Monocyte Chemoattractant Protein-1 Serum Levels in Patients with Breast Cancer. *Tumor Biology*. 2004;25(1–2):14–7.
22. Panganiban RP, Vonakis BM, Ishmael FT, Stellato C. Coordinated Post-Transcriptional Regulation of the Chemokine System: Messages from CCL2. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 1. April 2014;34(4):255–66.
23. BAUER D, MAZZIO E, SOLIMAN KF, TAKA E, ORIAKU E, WOMBLE T, DARLING-REED S. Diallyl Disulfide Inhibits TNF α -induced CCL2 Release by MDA-MB-231 Cells. *Anticancer research*. Juni 2014;34(6):2763–70.
24. Horn F, Armbruster M, Berghold S, Blaeschke F, Grillhösl C, Helferich S, Moc I, Pritsch M, Schneider N, Ziegler P. *Biochemie des Menschen*. 4. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009.
25. Rose-John S. IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1237–47.
26. Cahill CM, Rogers JT. Interleukin (IL) 1 β Induction of IL-6 Is Mediated by a Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent AKT/I κ B Kinase α Pathway Targeting Activator Protein-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 19. September 2008;283(38):25900–12.
27. Sullivan N, Sasser A, Axel A, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, Oberyszyn T, Hall B. Interleukin-6 induces an epithelial–mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*. 20. August 2009;28(33):2940–7.
28. Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Letters*. 28. August 2008;267(2):271–85.

29. Mestdagt M, Polette M, Buttice G, Noël A, Ueda A, Foidart J-M, Gilles C. Transactivation of MCP-1/CCL2 by beta-catenin/TCF-4 in human breast cancer cells. *International journal of cancer*. Januar 2006;118(1):35–42.
30. Youngs SJ, Ali SA, Taub DD, Rees RC. Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer*. 6. Dezember 1998;71(2):257–66.
31. Alva AS, Varsos Z, Roca H, Pienta K. Effect of CCL2 on survival of breast cancer MDA-MB-231 cells via inhibition of apoptosis. *JCO*. 20. Mai 2009;27(15_suppl):e22176–e22176.
32. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 1. Juli 2000;96(1):34–40.
33. Wake MS, Watson CJ. STAT3 the oncogene – still eluding therapy? *The FEBS Journal*. 1. Juli 2015;282(14):2600–11.
34. Srivastava J, DiGiovanni J. Non-canonical Stat3 signaling in cancer. *Molecular Carcinogenesis*. 1. Dezember 2016;55(12):1889–98.
35. Jarnicki A, Putoczki T, Ernst M. Stat3: linking inflammation to epithelial cancer - more than a „gut“ feeling? *Cell Division*. 2010;5:14–14.
36. Johnson DE, O’Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. April 2018;15(4):234–48.
37. Fleming JD, Giresi PG, Lindahl-Allen M, Krall EB, Lieb JD, Struhl K. STAT3 acts through pre-existing nucleosome-depleted regions bound by FOS during an epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Epigenetics & Chromatin*. 2015;8:7.
38. Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, Itami S, Nickoloff BJ, DiGiovanni J. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nature Medicine*. 12. Dezember 2004;11:43.
39. Coulombe G, Rivard N. New and Unexpected Biological Functions for the Src-Homology 2 Domain-Containing Phosphatase SHP-2 in the Gastrointestinal Tract. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 1. Januar 2016;2(1):11–21.
40. Kondaveeti Y, Guttilla Reed IK, White BA. Epithelial–mesenchymal transition induces similar metabolic alterations in two independent breast cancer cell lines. *Cancer Letters*. 1. August 2015;364(1):44–58.
41. Lee J, Hahm E-R, Singh SV. Withaferin A inhibits activation of signal transducer and activator of transcription 3 in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. November 2010;31(11):1991–8.
42. Cheng GZ, Zhang W, Sun M, Wang Q, Coppola D, Mansour M, Xu L, Costanzo C, Cheng JQ, Wang L-H. Twist Is Transcriptionally Induced by Activation of STAT3 and Mediates STAT3 Oncogenic Function. *The Journal of Biological Chemistry*. 23. Mai 2008;283(21):14665–73.
43. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang L-H. Twist Transcriptionally Up-regulates AKT2 in Breast Cancer Cells Leading to Increased Migration, Invasion, and Resistance to Paclitaxel. *Cancer Research*. 1. März 2007;67(5):1979–87.
44. Wang S-W, Sun Y-M. The IL-6/JAK/STAT3 pathway: Potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review). *Bd*. 44. 2014.

45. Farabaugh SM, Boone DN, Lee AV. Role of IGF1R in Breast Cancer Subtypes, Stemness, and Lineage Differentiation. *Frontiers in Endocrinology* [Internet]. 2015;6. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2015.00059>
46. Sarkissyan S, Sarkissyan M, Wu Y, Cardenas J, Koeffler HP, Vadgama JV. IGF-1 Regulates Cyr61 Induced Breast Cancer Cell Proliferation and Invasion. *Li J, Herausgeber. PLoS ONE.* 2014;9(7):e103534.
47. Walsh LA, Damjanovski S. IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF- β 1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. *Cell Communication and Signaling : CCS.* 2011;9:10–10.
48. Liao G, Wang M, Ou Y, Zhao Y. IGF-1-induced epithelial–mesenchymal transition in MCF-7 cells is mediated by MUC1. *Cellular Signalling.* 1. Oktober 2014;26(10):2131–7.
49. Amancio Carnero, Carmen Blanco-Aparicio, Oliver Renner, Wolfgang Link and Juan F.M. Leal. The PTEN/PI3K/AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications. *Current Cancer Drug Targets.* 2008;8(3):187–98.
50. Lee JJ, Loh K, Yap Y-S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biology & Medicine.* Dezember 2015;12(4):342–54.
51. Ríos-Marco P, Marco C, Gálvez X, Jiménez-López JM, Carrasco MP. Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1. September 2017;1859(9, Part B):1657–67.
52. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell.* 20. April 2017;169(3):381–405.
53. Schrötter S, Leondaritis G, Eickholt BJ. Capillary Isoelectric Focusing of Akt Isoforms Identifies Highly Dynamic Phosphorylation in Neuronal Cells and Brain Tissue. *The Journal of Biological Chemistry.* 6. Mai 2016;291(19):10239–51.
54. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell.* 29. Juni 2007;129(7):1261–74.
55. Bhaskar PT, Hay N. The Two TORCs and Akt. *Developmental Cell.* 1. April 2007;12(4):487–502.
56. Meuillet E. Novel Inhibitors of AKT: Assessment of a Different Approach Targeting the Pleckstrin Homology Domain. *Current medicinal chemistry.* 2011;18(18):2727–42.
57. Yuan H-X, Guan K-L. The SIN1-PH Domain Connects mTORC2 to PI3K. *Cancer discovery.* November 2015;5(11):1127–9.
58. RAJAH TT, PEINE KJ, DU N, SERRET CA, DREWS NR. Physiological Concentrations of Genistein and 17 β -Estradiol Inhibit MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Growth by Increasing BAX/BCL-2 and Reducing pERK1/2. *Anticancer Research.* 1. April 2012;32(4):1181–91.
59. Connell-Crowley L, Harper JW, Goodrich DW. Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell.* Februar 1997;8(2):287–301.
60. Wang R, Brattain MG. AKT can be activated in the nucleus. *Cellular Signalling.* 1. Oktober 2006;18(10):1722–31.

61. Ruvolo PP. GSK-3 as a novel prognostic indicator in leukemia. *Advances in Biological Regulation*. 1. August 2017;65:26–35.
62. Lin X, Zhang X, Wang Q, Li J, Zhang P, Zhao M, Li X. Perifosine downregulates MDR1 gene expression and reverses multidrug-resistant phenotype by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway in a human breast cancer cell line. *Bd*. 59. 2012. 248 S.
63. García MG, Alaniz LD, Cordo Russo RI, Alvarez E, Hajos SE. PI3K/Akt inhibition modulates multidrug resistance and activates NF- κ B in murine lymphoma cell lines. *Leukemia Research*. 1. Februar 2009;33(2):288–96.
64. Feldman ME, Shokat KM. New Inhibitors of the PI3K-Akt-mTOR Pathway: Insights into mTOR Signaling from a New Generation of Tor Kinase Domain Inhibitors (TORKinibs). In: Rommel C, Vanhaesebroeck B, Vogt PK, Herausgeber. *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease: Volume 2* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. S. 241–62. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/82_2010_64
65. Su B, Jacinto E. Mammalian TOR signaling to the AGC kinases. *null*. 1. Dezember 2011;46(6):527–47.
66. Iacovides DC, Johnson AB, Wang N, Boddapati S, Korkola J, Gray JW. Identification and Quantification of AKT Isoforms and Phosphoforms in Breast Cancer Using a Novel Nanofluidic Immunoassay. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. November 2013;12(11):3210–20.
67. Alkhalaf M, El-Mowafy A, Karam S. Growth inhibition of MCF-7 human breast cancer cells by progesterone is associated with cell differentiation and phosphorylation of Akt protein. *European Journal of Cancer Prevention* [Internet]. 2002;11(5). Verfügbar unter: https://journals.lww.com/eurjcancerprev/Fulltext/2002/10000/Growth_inhibition_of_MCF_7_human_breast_cancer.11.aspx
68. Fan Q-W, Weiss WA. Targeting the RTK-PI3K-mTOR Axis in Malignant Glioma: Overcoming Resistance. In: Rommel C, Vanhaesebroeck B, Vogt PK, Herausgeber. *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease: Volume 2* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. S. 279–96. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/82_2010_67
69. Faustino Mollinedo, Consuelo Gajate, Sonsoles Martin-Santamaria and Federico Gago. ET-18-OCH3 (Edelfosine): A Selective Antitumour Lipid Targeting Apoptosis Through Intracellular Activation of Fas / CD95 Death Receptor. *Current Medicinal Chemistry*. 2004;11(24):3163–84.
70. Welch EJ, Naikawadi RP, Li Z, Lin P, Ishii S, Shimizu T, Tiruppathi C, Du X, Subbaiah PV, Ye RD. Opposing Effects of Platelet-Activating Factor and Lyso-Platelet-Activating Factor on Neutrophil and Platelet Activation. *Molecular Pharmacology*. Januar 2009;75(1):227–34.
71. Bartolmäs T, Heyn T, Mickleit M, Fischer A, Reutter W, Danker K. Glucosamine-glycerophospholipids That Activate Cell-Matrix Adhesion and Migration. *J Med Chem*. 1. Oktober 2005;48(21):6750–5.
72. van Blitterswijk W, Verheij M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Bd*. 1831. 2012.
73. Jaffrès P-A, Gajate C, Bouchet AM, Couthon-Gourvès H, Chantôme A, Potier-Cartreau M, Besson P, Bougnoux P, Mollinedo F, Vandier C. Alkyl ether lipids, ion channels and lipid raft reorganization in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. 1. September 2016;165:114–31.

74. Marcel Verheij, Wouter H. Moolenaar and Wim J. van Blitterswijk. Combining Anti-tumor Alkyl-Phospholipid Analogs and Radiotherapy: Rationale and Clinical Outlook. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2014;14(4):618–28.
75. Chantôme A, Potier-Cartereau M, Clarysse L, Fromont G, Marionneau-Lambot S, Guéguinou M, Pagès J-C, Collin C, Oullier T, Girault A, Arbion F, Haelters J-P, Jaffrès P-A, Pinault M, Besson P, Joulin V, Bougnoux P, Vandier C. Pivotal Role of the Lipid Raft SK3–Orai1 Complex in Human Cancer Cell Migration and Bone Metastases. *Cancer Res*. 1. August 2013;73(15):4852.
76. Danker K, Reutter W, Semini G. Glycosidated phospholipids: uncoupling of signalling pathways at the plasma membrane. *British Journal of Pharmacology*. Mai 2010;160(1):36–47.
77. Consuelo Gajate and Faustino Mollinedo. Lipid Rafts, Endoplasmic Reticulum and Mitochondria in the Antitumor Action of the Alkylphospholipid Analog Edelfosine. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2014;14(4):509–27.
78. Gajate C, Mollinedo F. Lipid raft-mediated Fas/CD95 apoptotic signaling in leukemic cells and normal leukocytes and therapeutic implications. *Journal of Leukocyte Biology*. 5. August 2015;98(5):739–59.
79. Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, Campanero MA, Blanco-Prieto MJ. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene*. 26. April 2010;29:3748.
80. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death And Differentiation*. 19. Dezember 2003;11:381.
81. Nishina H, Wada T, Katada T. Physiological Roles of SAPK/JNK Signaling Pathway. *The Journal of Biochemistry*. 2004;136(2):123–6.
82. Guéguinou M, Harnois T, Crottes D, Uguen A, Deliot N, Gambade A, Chantôme A, Haelters JP, Jaffrès PA, Jourdan ML, Weber G, Soriani O, Bougnoux P, Mignen O, Bourmeyster N, Constantin B, Lecomte T, Vandier C, Potier-Cartereau M. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline. *Oncotarget*. 14. Juni 2016;7(24):36168–84.
83. Prasad VV, Gopalan RO. Continued use of MDA-MB-435, a melanoma cell line, as a model for human breast cancer, even in year, 2014. *NPJ breast cancer*. 2. Juni 2015;1:15002–15002.
84. Potier M, Chantome A, Joulin V, Girault A, Roger S, Besson P, Jourdan M-L, LeGuennec J-Y, Bougnoux P, Vandier C. The SK3/K(Ca)2.3 potassium channel is a new cellular target for edelfosine. *British Journal of Pharmacology*. Januar 2011;162(2):464–79.
85. Herrera FE, Sevrain CM, Jaffrès P-A, Couthon H, Grélard A, Dufourc EJ, Chantôme A, Potier-Cartereau M, Vandier C, Bouchet AM. Singular Interaction between an Antimetastatic Agent and the Lipid Bilayer: The Ohmline Case. *ACS omega*. 31. Oktober 2017;2(10):6361–70.
86. Slaton JW, Hampton JA, Selman SH. Exposure to Alkyllysophospholipids Inhibits in Vitro Invasion of Transitional Cell Carcinoma. *The Journal of Urology*. 1. November 1994;152(5, Part 1):1594–8.
87. Steelant WFA, Goeman JL, Philippé J, Oomen LCJM, Hilkens J, Krzewinski-Recchi M-A, Huet G, Van der Eycken J, Delannoy P, Bruyneel EA, Mareel MM. Alkyl-lysophospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl- glycerophosphocholine induces invasion through episialin-mediated neutralization of E-cadherin in human mammary MCF-7 cells in vitro. *International Journal of Cancer*. 9. April 2001;92(4):527–36.

88. van Slambrouck S, Steelant WFA. Clustering of monosialyl-Gb5 initiates downstream signalling events leading to invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical Journal*. 1. Februar 2007;401(Pt 3):689–99.
89. Rüter GA, Zerp SF, Bartelink H, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anti-cancer alkyllysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt/PKB survival pathway. *Anti-Cancer Drugs* [Internet]. 2003;14(2). Verfügbar unter: https://journals.lww.com/anti-cancerdrugs/Fulltext/2003/02000/Anti_cancer_alkyl_lysophospholipids_inhibit_the.11.aspx
90. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. *Cancer*. 15. November 2014;120(22):3446–56.
91. Snyder F, Wood R. The Occurrence and Metabolism of Alkyl and Alk-1-enyl Ethers of Glycerol in Transplantable Rat and Mouse Tumors. *Cancer Res*. 1. Mai 1968;28(5):972.
92. Snyder F, Wood R. Alkyl and Alk-1-enyl Ethers of Glycerol in Lipids from Normal and Neoplastic Human Tissues. *Cancer Res*. 1. Januar 1969;29(1):251.
93. Danker K, Fischer A, Reutter W. Modified and Modifying Sugars as a New Tool for the Development of Therapeutic Agents – Glycosidated Phospholipids as a New Type of Antiproliferative Agents. In: *Carbohydrate-Based Drug Discovery* [Internet]. Wiley-Blackwell; 2005. S. 875–82. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/3527602437.ch33>
94. Bagley RG, Kurtzberg L, Rouleau C, Yao M, Teicher BA. Erufosine, an alkylphosphocholine, with differential toxicity to human cancer cells and bone marrow cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1. Dezember 2011;68(6):1537–46.
95. Aznar MÁ, Lasa-Saracibar B, Estella-Hermoso de Mendoza A, Blanco-Prieto MJ. Efficacy of edelfosine lipid nanoparticles in breast cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 1. Oktober 2013;454(2):720–6.
96. Fischer A, Müller D, Zimmermann-Kordmann M, Kleuser B, Mickleit M, Laabs S, Löwe W, Cantagrel F, Reutter W, Danker K. The Ether Lipid Inositol-C2-PAF is a Potent Inhibitor of Cell Proliferation in HaCaT Cells. *ChemBioChem*. 1. März 2006;7(3):441–9.
97. Semini G, Klein A, Danker K. Impact of alkylphospholipids on the gene expression profile of HaCaT cells. *Pharmacogenetics and Genomics* [Internet]. 2011;21(7). Verfügbar unter: https://journals.lww.com/jpharmacogenetics/Fulltext/2011/07000/Impact_of_alkylphospholipids_on_the_gene.3.aspx
98. von Haefen C, Wendt J, Semini G, Sifringer M, Belka C, Radetzki S, Reutter W, Daniel PT, Danker K. Synthetic glycosidated phospholipids induce apoptosis through activation of FADD, caspase-8 and the mitochondrial death pathway. *Apoptosis*. 25. März 2011;16(6):636.
99. Tornin J, Hermida-Prado F, Padda RS, Gonzalez MV, Alvarez-Fernandez C, Rey V, Martinez-Cruzado L, Estupiñan O, Menendez ST, Fernandez-Nevado L, Astudillo A, Rodrigo JP, Lucien F, Kim Y, Leong HS, Garcia-Pedrero JM, Rodriguez R. FUS-CHOP Promotes Invasion in Myxoid Liposarcoma through a SRC/FAK/RHO/ROCK-Dependent Pathway. *Neoplasia (New York, NY)*. 28. November 2017;20(1):44–56.
100. Semini G, Hildmann A, Reissig H-U, Reutter W, Danker K. The novel synthetic ether lipid inositol-C2-PAF inhibits phosphorylation of the tyrosine kinases Src and FAK independent of integrin activation in transformed skin cells. *Biochemical Pharmacology*. 15. April 2011;81(8):985–95.

101. Semini G, Hildmann A, Klein A, Lucka L, Schön M, Schön MP, Shmanai V, Danker K. Inositol-C2-PAF down-regulates components of the antigen presentation machinery in a 2D-model of epidermal inflammation. *Biochemical Pharmacology*. 1. Februar 2014;87(3):477–88.
102. Forkel S, Schön M, Hildmann A, Claßen A, John S-M, Danker K, Schön MP. Inositolated Platelet-Activating Factor (Ino-C2-PAF) Modulates Dynamic Lymphocyte–Endothelial Cell Interactions and Alleviates Psoriasis-Like Skin Inflammation in Two Complementary Mouse Models. *Journal of Investigative Dermatology*. 1. Oktober 2014;134(10):2510–20.
103. Brandt I. Untersuchung der Proliferationshemmung von Brustkrebszellen durch das Bioflavonid Quercetin in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus (RAD001) [Inaugural-Dissertation]. [Erlangen]: Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg; 2011.
104. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research : BCR*. 2011;13(4):215–215.
105. Ahmed N, Salsman VS, Yvon E, Louis CU, Perlaky L, Wels WS, Dishop MK, Kleinerman EE, Pule M, Rooney CM, Heslop HE, Gottschalk S. Immunotherapy for osteosarcoma: genetic modification of T cells overcomes low levels of tumor antigen expression. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. Oktober 2009;17(10):1779–87.
106. Marienfeld. Gebrauchsanweisung Zählkammern [Internet]. Lauda-Königshofen, Deutschland; 2019 [zitiert 5. März 2022]. Verfügbar unter: https://marienfeld-superior.com/anleitungen.html?file=files/Medien/PDFs/Anleitungen/Deutsche_Seite/2019-Gebrauchsanweisung_Zaehlkammern_DE.pdf
107. Kurreck J, Engels JW, Lottspeich F. *Bioanalytik*. 4. Auflage. Berlin: Springer-Verlag GmbH Deutschland; 2022.
108. PerkinElmer. Western Lightning Plus Gebrauchsanweisung [Internet]. Waltham, USA; 2015 [zitiert 13. März 2022]. Verfügbar unter: https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/MAN_Western_Lightning_Plus_2015.pdf
109. ProteinSimple. Nano Pro 100 System User Guide. Santa Clara, USA; 2011.
110. O'Neill RA, Bhamidipati A, Bi X, Deb-Basu D, Cahill L, Ferrante J, Gentalen E, Glazer M, Gossett J, Hacker K, Kirby C, Knittle J, Loder R, Mastroieni C, MacLaren M, Mills T, Nguyen U, Parker N, Rice A, Roach D, Suich D, Voehringer D, Voss K, Yang J, Yang T, Vander Horn PB. Isoelectric focusing technology quantifies protein signaling in 25 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 31. Oktober 2006;103(44):16153–8.
111. Bortz J, Schuster C. *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 7. Auflage. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag GmbH Deutschland; 2010.
112. Microsoft. Standardabweichung - Funktion und Erläuterung [Internet]. 2014 [zitiert 5. März 2022]. Verfügbar unter: <https://support.microsoft.com/de-de/office/stabw-s-funktion-7d69cf97-0c1f-4acf-be27-f3e83904cc23?ui=de-de&rs=de-de&ad=de>
113. Hedderich J, Sachs L. *Angewandte Statistik*. 17. Auflage. Berlin: Springer-Verlag GmbH Deutschland; 2020.
114. Kinoshita E. Ladekontrollen für Western Blotting [Internet]. Antikörper-online; 2013 [zitiert 6. März 2022]. Verfügbar unter: <https://www.antikoerper-online.de/resources/17/1217/ladekontrollen/>

115. Boon Yin K. The Mesenchymal-Like Phenotype of the MDA-MB-231 Cell Line. 2011.
116. Dietzel S. Zellzyklusstadien [Internet]. Wikipedia; 2007 [zitiert 6. März 2022]. Verfügbar unter: <https://de.wikipedia.org/wiki/Mitose#/media/Datei:Mitosepanel.jpg>
117. Schrötter S. Specificity of developmental- and growth factor-dependent phosphorylation of Akt isoforms in neurons [Inaugural-Dissertation]. [Berlin]: Humboldt-Universität zu Berlin; 2016.
118. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1. Mai 2012;13(5):283–96.
119. Casamayor A, Morrice NA, Alessi DR. Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem J*. 1. September 1999;342 (Pt 2)(Pt 2):287–92.
120. Gradziel CS, Jordan PA, Jewel D, Dufort FJ, Miller SJ, Chiles TC, Roberts MF. D-3-deoxy-dioctanoylphosphatidylinositol Induces Cytotoxicity in Human MCF-7 Breast Cancer Cells via a Mechanism that Involves Downregulation of the D-type Cyclin-Retinoblastoma Pathway. *Biochimica et biophysica acta*. November 2016;1861(11):1808–15.
121. Alam MdM, Joh E-H, Park H, Kim B, Kim D-H, Lee YS. Synthesis, characterization and Akt phosphorylation inhibitory activity of cyclopentanecarboxylate-substituted alkylphosphocholines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1. April 2013;21(7):2018–24.
122. Korpis K. Apoptose und Autophagozytose in Krebszellen: Mechanismen des Zelltodes, verursacht durch σ -Rezeptor-Liganden und photoaktivierbare PtIV-Komplexe [Inaugural-Dissertation]. [Greifswald]: Ernst-Moritz-Arndt Universität; 2013.
123. Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW, Hendey LF, Axel AE, Hall BM. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER- α -positive human breast cancer. *The FASEB Journal*. 1. November 2007;21(13):3763–70.
124. Luteolin Inhibits Proliferation Induced by IGF-1 Pathway Dependent ER in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012;13(4):1431–7.
125. Zhang CZ, Liu L-L, Li L-Z, Lu S-X, Zhou X, Peng Y-H, Yang Y-Z, Zhang Z-J, Yun J-P, Yi C. miR-720 inhibits tumor invasion and migration in breast cancer by targeting TWIST1. *Carcinogenesis*. 1. Oktober 2013;35(2):469–78.
126. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*. 21. September 2001;20:5991.
127. Kaneshiro S, Ebina K, Shi K, Higuchi C, Hirao M, Okamoto M, Koizumi K, Morimoto T, Yoshikawa H, Hashimoto J. IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 1. Juli 2014;32(4):378–92.
128. Tu Y, Gardner A, Lichtenstein A. The Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Kinase Pathway in Multiple Myeloma Plasma Cells: Roles in Cytokine-dependent Survival and Proliferative Responses. *Cancer Res*. 1. Dezember 2000;60(23):6763.
129. Chung TDK, Yu JJ, Kong TA, Spiotto MT, Lin JM. Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. *The Prostate*. 1. Januar 2000;42(1):1–7.

130. Chen R-H, Chang M-C, Su Y-H, Tsai Y-T, Kuo M-L. Interleukin-6 Inhibits Transforming Growth Factor- β -induced Apoptosis through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 13. August 1999;274(33):23013–9.
131. Loberg RD, Day LL, Harwood J, Ying C, St John LN, Giles R, Neeley CK, Pienta KJ. CCL2 is a potent regulator of prostate cancer cell migration and proliferation. *Neoplasia (New York, NY)*. Juli 2006;8(7):578–86.
132. Bian C, Liu Z, Li D, Zhen L. PI3K/AKT inhibition induces compensatory activation of the MET/STAT3 pathway in non-small cell lung cancer. *Oncology letters*. Juni 2018;15(6):9655–62.
133. Abdelhamed S, Ogura K, Yokoyama S, Saiki I, Hayakawa Y. AKT-STAT3 Pathway as a Downstream Target of EGFR Signaling to Regulate PD-L1 Expression on NSCLC cells. *Journal of Cancer*. 18. Juli 2016;7(12):1579–86.
134. Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current Biology*. 1. Januar 2000;10(1):47–50.
135. Zhu F, Kai J, Chen L, Wu M, Dong J, Wang Q, Zeng L-H. Akt Inhibitor Perifosine Prevents Epileptogenesis in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Neurosci Bull*. 2017/08/07 Aufl. April 2018;34(2):283–90.
136. Hideshima T, Catley L, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Chauhan D, Richardson PG, Anderson KC. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood*. 15. Mai 2006;107(10):4053–62.
137. Sabnis H, Bradley HL, Bunting ST, Cooper TM, Bunting KD. Capillary nano-immunoassay for Akt 1/2/3 and 4EBP1 phosphorylation in acute myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12:166–166.
138. Chiarini F, Del Sole M, Mongiorgi S, Gaboardi GC, Cappellini A, Mantovani I, Follo MY, McCubrey JA, Martelli AM. The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism. *Leukemia*. 3. April 2008;22:1106.
139. Reis-Sobreiro M, Roué G, Moros A, Gajate C, de la Iglesia-Vicente J, Colomer D, Mollinedo F. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer Journal*. 1. Mai 2013;3(5):e118–e118.
140. Chen L-M, Song T-J, Xiao J-H, Huang Z-H, Li Y, Lin T-Y. Tripchlorolide induces autophagy in lung cancer cells by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway and improves cisplatin sensitivity in A549/DDP cells. *Oncotarget*. 12. Juli 2017;8(38):63911–22.
141. Alam MdM, Joh E-H, Kim Y, Oh YI, Hong J, Kim B, Kim D-H, Lee YS. Synthesis and biological evaluation of cyclopentane-linked alkyl phosphocholines as potential anticancer agents that act by inhibiting Akt phosphorylation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1. Januar 2012;47:485–92.
142. Vink SR, Schellens JHM, van Blitterswijk WJ, Verheij M. Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid. *Investigational New Drugs*. 1. August 2005;23(4):279–86.

143. Jangir S, Bala V, Lal N, Kumar L, Sarswat A, Kumar A, Hamidullah, Saini KS, Sharma V, Verma V, Maikhuri JP, Konwar R, Gupta G, Sharma VL. Novel alkylphospholipid-DTC hybrids as promising agents against endocrine related cancers acting via modulation of Akt-pathway. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 6. Oktober 2014;85:638–47.
144. Dymond M, Attard G, Postle AD. Testing the hypothesis that amphiphilic antineoplastic lipid analogues act through reduction of membrane curvature elastic stress. *Journal of the Royal Society Interface*. 6. November 2008;5(28):1371–86.
145. A. Girault, J.-P. Haelters, M. Potier-Cartereau, A. Chantome, M. Pinault, S. Marionneau-Lambot, T. Oullier, G. Simon, H. Couthon-Gourves, P.-A. Jaffres, B. Corbel, P. Bougnoux, V. Joulin and C. Vandier. New Alkyl-Lipid Blockers of SK3 Channels Reduce Cancer Cell Migration and Occurrence of Metastasis. *Current Cancer Drug Targets*. 2011;11(9):1111–25.
146. Ogunsina M, Samadder P, Idowu T, Arthur G, Schweizer F. Design, synthesis and evaluation of cytotoxic properties of bisamino glucosylated antitumor ether lipids against cancer cells and cancer stem cells. *Med Chem Commun*. 2016;7(11):2100–10.
147. Idowu T, Samadder P, Arthur G, Schweizer F. Design, synthesis and antitumor properties of glycosylated antitumor ether lipid (GAEL)- chlorambucil-hybrids. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1. Januar 2016;194:139–48.
148. SAMADDER P, BYUN H-S, BITTMAN R, ARTHUR G. An Active Endocytosis Pathway Is Required for the Cytotoxic Effects of Glycosylated Antitumor Ether Lipids. *Anticancer Res*. 1. November 2011;31(11):3809.
149. Pistamaltzian NF, Georgoulis V, Kotsakis A. The role of immune checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 4. Mai 2019;13(5):435–47.
150. Hakozaki T, Okuma Y, Omori M, Hosomi Y. Impact of prior antibiotic use on the efficacy of nivolumab for non-small cell lung cancer. *Oncology letters*. März 2019;17(3):2946–52.
151. Zhang M, Sun H, Zhao S, Wang Y, Pu H, Wang Y, Zhang Q. Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 20. Februar 2017;8(19):31347–54.
152. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, Su X, Wang Y, Gonzalez-Angulo AM, Akcakanat A, Chawla A, Curran M, Hwu P, Sharma P, Litton JK, Molldrem JJ, Alatrash G. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer immunology research*. April 2014;2(4):361–70.
153. Estella-Hermoso de Mendoza A, Pr eat V, Mollinedo F, Blanco-Prieto MJ. In vitro and in vivo efficacy of edelfosine-loaded lipid nanoparticles against glioma. *Journal of Controlled Release*. 20. Dezember 2011;156(3):421–5.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Carsten Andreas Pelz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Einfluss des Antitumorlipids Inositol-C2-PAF auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 unter migrations- und proliferationsfördernden Bedingungen/The effect of the anti-tumor lipid Inositol-C2-PAF on the mammary carcinoma cell line MCF-7 under migration and proliferation stimulating conditions* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Carsten Andreas Pelz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Pelz C, Häckel S, Semini G, Schrötter S, Bintig W, Stricker S, Mrawietz G, Klein A, Lucka L, Shmanai V, Eickholt B, Hildmann A, Danker K. Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells. Cellular oncology. 25. Juli 2018.

Beitrag im Einzelnen:

Aus der vorliegenden Forschungsarbeit und der statistischen Auswertung dieser sind die Abb. 3e, f und g sowie die kompletten Abb. 4 und 5 entstanden. Dies entspricht aus den Abb. 3e, f und g den erhobenen Daten aus dem Immunfluoreszenz-Assay, dem Western-Blot und der kapillaren isoelektrischen Fokussierung, in dem mit IGF-1 stimulierte MCF-7-Zellen in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF verglichen wurden. Ferner entspricht dies der Datenerhebung der Expression verschiedener Moleküle *up-* und *downstream* von AKT in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF und/oder IGF-1 (Abb. 4) und einem Proliferationsassay und Migrationsassay von mit IGF-1 behandelten MCF-7-Zellen in An- und Abwesenheit von Inositol-C2-PAF (Abb. 5).

Aus dem Methodenteil der Publikation sind folgende Unterkapitel an die genannten Ergebnisse gebunden: 2.1 (*Cell cultures and compounds*), 2.5 (*Cell migration assay*), 2.6 (*Western blotting*), 2.7 (*NanoPro100™ assay*), 2.8 (*Immunfluorescence microscopy*), 2.9 (*Statistical analyses*). Dabei sind die Punkte 2.6, 2.7 und 2.8 vollständig vom Promovenden verfasst und die Punkte 2.1, 2.5 und 2.9 in enger Zusammenarbeit mit der Erstbetreuerin entstanden.

Aus dem Ergebnisteil sind die Abschnitte 3.4 (*Ino-C2-PAF inhibits phosphorylation downstream of Akt while phosphorylation upstream of Akt remains unaffected*) und 3.5 (*Ino-C2-PAF distinctly inhibits IGF-1-induced proliferation in MCF-7 cells*) vollständig und der Abschnitt 3.3 (*Phosphorylation of Akt, but not of Erk1/2, FAK and Src, is inhibited by Ino-C2-PAF in MCF-7 and MDA-MB-231 cells*) teilweise vom Promovenden verfasst.

Im Diskussionsteil der Publikation wurden die oben genannten erhobenen Ergebnisse durch den Promovenden ausgewertet und eingeordnet, wobei dies in enger Absprache mit der Erstbetreuerin erfolgte.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

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

Publikationsliste

Pelz C, Häckel S, Semini G, Schrötter S, Bintig W, Stricker S, Mrawietz G, Klein A, Lucka L, Shmanai V, Eickholt B, Hildmann A, Danker K. Inositol-C2-PAF acts as a biological response modifier and antagonizes cancer-relevant processes in mammary carcinoma cells. Cellular oncology. 25. Juli 2018.

Stolte KN, Pelz C, Yapto CV, Raguse J-D, Dommisch H, Danker K. IL-1 β strengthens the physical barrier in gingival epithelial cells. Tissue Barriers. 2. Juli 2020;8(3):1804249.

Parczyk J, Ruhnau J, Pelz C, Schilling M, Wu H, Piaskowski NN, Eickholt B, Kühn H, Danker K, Klein A. Dichloroacetate and PX-478 exhibit strong synergistic effects in a various number of cancer cell lines. BMC Cancer. 30. April 2021;21(1):481.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Zunächst natürlich bei Kerstin Danker, in deren Arbeitsgruppe ich diese Doktorarbeit schreiben durfte und die für das Grundkonzept dieser Arbeit verantwortlich ist. Häufige und konstruktive Gesprächsrunden haben unseren Weg gezeichnet und diese Arbeit nun zu diesem tollen Ergebnis gemacht, das sie nun ist. Danke, dass Du mich so lange in deiner Arbeitsgruppe ausgehalten und gefördert hast.

Ferner Frau Gudrun Mrawietz, die gute Fee im Labor, die ich während der experimentellen Phase mit zahlreichen Fragen löchern konnte und die nie müde wurde, mir all die kleinen Schwierigkeiten des Laboralltags zu erklären.

Weiterhin gilt mein Dank Annette Hildmann, Sandra Schrötter, Willem Bintig und Mayur Vadhwani, die mich in der Einarbeitung in die verschiedenen in dieser Arbeit genutzten Labormethoden unterstützt haben und die immer ein offenes Ohr für mich hatten, teilweise sogar spät abends und am Wochenende.

Zudem möchte ich auch meinen Kommilitonen und Mitdoktoranden Adrian Schulz, Juliane Jäger, Kim Stolte, Jonas Parczyk und Jerome Ruhnau danken, mit denen ich meine Zeit im Labor verbringen durfte und mit denen ich manche Stunde länger als geplant geschuftet, aber auch gelacht habe, sowie Andreas Klein und Lothar Lucka, die ich insbesondere mit meinen technischen Fragen bestimmt vor die eine oder andere schwierige Aufgabe gestellt habe, die sie aber immer mit Geduld und Fachwissen beantworten konnten.

Für die finanzielle Hilfe danke ich dem Team des Deutschlandstipendiums sowie meinem Förderer, der Marburger Bund Stiftung, die mich auch über die Regelstudienzeit hinaus unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken. Vielen lieben Dank für die so lange andauernde finanzielle, aber auch emotionale Hilfe während meines Studiums und meiner Dissertation. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Ich bin froh, euch zu haben und dass Ihr die Geduld aufgebracht habt, mich über diesen langen Zeitraum des Studiums bis zu diesem Punkt am Schluss zu begleiten. Meinem Vater möchte ich zusätzlich insbesondere für die zahlreichen Male Korrekturlesen danken; wahrscheinlich kennt er meine Dissertation inzwischen fast so gut wie ich.

Alle genannten mögen sich mit diesem Satz einmal ordentlich gedrückt fühlen.

Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie (iBIKE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Pelz Carsten
Emailadresse: carsten.pelz@charite.de
Matrikelnummer: 215556
PromotionsbetreuerIn: PD Dr. Kerstin Danker
Promotionsinstitution / Klinik: Institut für Biochemie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Carsten Pelz innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBIKE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 19.10.2016
- Termin 2: 20.01.2022

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Explorative Studie
- Darstellung metrischer Variablen mit Mittelwert und Standardabweichung
- Verwendete grafische Darstellungen sind angemessen

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 9.2.2022

Name des Beraters/der Beraterin: Alice Schneider

CHARITÉ
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie
Campus Charité
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | D-10117 Berlin

Unterschrift Beraterin, Institutsstempel

