

**Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden
als molekulare Schnittstelle zwischen Melanomzellen
und Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Trophologin Christin Neuber
geboren am 16. April 1985 in Freital

Eingereicht am 20. Februar 2013

Die Dissertation wurde in der Zeit von Februar 2009 bis Februar 2013
im Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung
am Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf angefertigt.

Eingereicht am: 20. Februar 2013

Verteidigt am: 07. Juni 2013

Gutachter:

Prof. Dr. Jörg Steinbach, Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung,
Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf

Prof. Dr. Thomas Henle, Professur für Lebensmittelchemie,
Technische Universität Dresden

Für meinen einzig(artig)en Onkel Gerd.

I INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Bedeutung des Tumor-Mikromilieus bei der Entstehung des malignen Melanoms	1
1.2	Die Metastasierung des malignen Melanoms als limitierender Einflussfaktor auf die Tumorthherapie	5
1.3	Die Rolle des Eph-Ephrin-Systems bei der Tumorprogression und Metastasierung	9
1.4	Zielstellung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material	19
2.1.1	Eukaryotische Zellen	19
2.1.2	Prokaryotische Zellen	19
2.1.3	Versuchstiere	19
2.1.4	Plasmide	19
2.1.5	Kits	20
2.1.6	Antikörper	20
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.8	Chemikalien, Medien und Enzyme	21
2.1.9	Puffer und Lösungen	24
2.1.10	Geräte	27
2.2	Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1	RNA-Isolierung aus Zellen	29
2.2.2	DNase-Behandlung	29
2.2.3	Quantitative Echtzeit RT-PCR (qRT-PCR)	29
2.2.4	Klonierung von humanem EphB4, EphB6 und EphrinB2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1	31
2.2.4.1	<i>Prinzip</i>	31
2.2.4.2	<i>Restriktionshydrolyse</i>	32
2.2.4.3	<i>Dephosphorylierung und Glättung der cDNA mittels Alkalischer Phosphatase und Klenow-Fragment</i>	33
2.2.4.4	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	34
2.2.4.5	<i>Gelextraktion</i>	34
2.2.4.6	<i>Ligation</i>	35
2.2.4.7	<i>Herstellung Transformations-kompetenter E. coli</i>	36
2.2.4.8	<i>Transformation kompetenter E. coli</i>	36
2.2.4.9	<i>Plasmid-Isolierung</i>	37
2.2.5	Klonierung von humanem sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2B	38
2.2.5.1	<i>Prinzip</i>	38
2.2.5.2	<i>PCR zur Gewinnung der cDNA für sEphrinB2, sEphB4 und sEphB6</i>	40
2.2.5.3	<i>Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion</i>	41
2.2.5.4	<i>TOPO-TA-Klonierung, Transformation und Plasmid-Isolierung</i>	42
2.2.5.5	<i>Restriktionshydrolyse, Ligation, Transformation und Plasmid-Isolierung</i>	43
2.3	Zellbiologische Methoden	44
2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	44
2.3.2	Kontrolle von Zellkulturen auf Mykoplasmen-Kontamination	45

2.3.3	Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen.....	45
2.3.4	Transfektion und Antibiotikaselektion von COS-7-Zellen.....	45
2.3.5	Transfektion und Antibiotika-Selektion von A375-Zellen.....	46
2.3.6	Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse und -sortierung (FACS) von transfizierten A375-Zellen	48
2.3.7	Fluoreszenzmikroskopie von transfizierten A375-Zellen.....	48
2.3.8	Bestimmung der Zellproliferation und Zellvitalität mittels Wachstumskurve ...	49
2.3.9	Differenzierung humaner THP-1-Leukämiezellen zu Makrophagen-artigen Zellen (THP-1(M))	49
2.3.10	Differenzierung humaner HL-60-Leukämiezellen zu Makrophagen-artigen (HL-60(M)) und Granulozyten-artigen (HL-60(G)) Zellen.....	49
2.3.11	Kokultivierung humaner Melanomzellen mit HL-60(M) und anschließende Trennung mittels Magnet-aktivierter Zell-Separierung (MACS).....	50
2.3.12	Adhäsionsassay	52
2.3.12.1	<i>Adhäsion an Fibronektin</i>	52
2.3.12.2	<i>Adhäsion an HL-60(M)-Zellen</i>	52
2.3.13	Migrationsassay	53
2.3.13.1	<i>Boyden-Kammer-Assay</i>	53
2.3.13.2	<i>Wundheilungsassay</i>	55
2.4	Proteinbiochemische Methoden	56
2.4.1	Proteinisolierung aus Zellkulturen	56
2.4.2	Proteinisolierung aus Gewebeprobe.....	56
2.4.3	Proteinbestimmung	56
2.4.4	SDS-PAGE	57
2.4.5	Western Blotting und Immundetektion.....	57
2.4.6	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionsassay (ELISA).....	58
2.4.6.1	<i>IL-6-ELISA</i>	58
2.4.6.2	<i>pEphB4-ELISA</i>	59
2.4.7	Gewinnung und Reinigung der rekombinanten, löslichen Eph-Rezeptoren sEphB4 und sEphB6	60
2.4.7.1	<i>Gewinnung von COS-7-Zellkulturüberständen</i>	60
2.4.7.2	<i>Reinigung von sEphB4 und sEphB6 aus den COS-7-Zellkulturüberständen mittels Ni^{2+}-Affinitätschromatographie</i>	60
2.4.7.3	<i>Regeneration der Ni^{2+}-NTA-Agarose</i>	62
2.4.7.4	<i>Entfernung von Salzen und Imidazol mittels Schneller Protein- Flüssigkeitschromatographie (FPLC)</i>	63
2.4.7.5	<i>Entfernung von Salzen und Imidazol mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren</i>	63
2.4.7.6	<i>Gefriertrocknung</i>	64
2.5	Tierexperimentelle Arbeiten	65
2.5.1	Etablierung eines murinen Tumor-Xenograft-Modells mit subkutanen A375-pIRES/EphB4-Tumoren	65
2.5.2	Fluoreszenz-Bildgebung.....	66
2.5.3	Magnet-Resonanz-Tomographie.....	66
2.5.4	Untersuchung der Tumorperfusion mittels Hoechst 33342	67
2.6	Radiochemische und Radiopharmakologische Methoden.....	68
2.6.1	Darstellung und Radiomarkierung von EphB4-Kinaseinhibitoren.....	68
2.6.2	Untersuchung des Einflusses der Verbindungen 2 auf die Zellproliferation und Zellvitalität mittels MTT-Test.....	70
2.6.3	Untersuchung der zellulären Bindung und Aufnahme der Verbindung [^{18}F]2.	70
2.6.4	Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie.....	72
2.6.5	Bioverteilung	73
2.6.6	Metabolitenanalyse	73
2.6.7	Autoradiographie.....	74

2.7	Histologische Methoden	74
2.7.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	74
2.7.2	Nachweis von Hoechst 33342 in Gefrierschnitten	75
2.7.3	Anfertigung von Paraffinschnitten.....	75
2.7.4	Nachweis von EphB4 in Paraffinschnitten	76
2.8	Statistische Auswertung	76
3	ERGEBNISSE	77
3.1	Genexpression von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei humanen Leukämie- und Melanomzellen	77
3.2	Proteinbiosynthese von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei humanen Leukämie- und Melanomzellen	79
3.3	Kokultivierung humaner Melanomzellen mit HL-60(M)	80
3.3.1	Etablierung eines Kokultur-Modells mit anschließender Trennung der humanen Melanomzellen von den HL-60(M)-Zellen	80
3.3.2	Einfluss der Kokultur auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten der humanen Melanomzellen	82
3.3.2.1	<i>Adhäsionsassay</i>	82
3.3.2.2	<i>Migrationsassay</i>	83
3.3.3	Einfluss der Kokultur auf die Sekretion von Interleukin-6 durch die humanen Leukämie- und Melanomzellen	84
3.4	Überexpression von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei A375-Melanomzellen	86
3.4.1	Fluoreszenzmikroskopie und FACS	86
3.4.2	mRNA-Expression von EphB4, EphB6 und EphrinB2	88
3.4.3	Proteinbiosynthese von EphB4, EphB6 und EphrinB2.....	89
3.4.4	Proliferationsverhalten.....	89
3.5	Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten von A375-Melanomzellen	90
3.5.1	Einfluss auf die Adhäsion	90
3.5.1.1	<i>Adhäsion an Fibronektin</i>	90
3.5.1.2	<i>Adhäsion an HL-60(M)-Zellen</i>	90
3.5.2	Einfluss auf die Migration	91
3.5.2.1	<i>Boyden-Kammer-Assay</i>	91
3.5.2.2	<i>Wundheilungsassay</i>	92
3.5.3	Einfluss der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten der A375-Melanomzellen.....	94
3.6	Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf das inflammatorische Potential von A375-Melanomzellen und HL-60(M)-Zellen	95
3.7	Charakterisierung eines murinen Tumor-Xenograft-Modells mit subkutanen A375-pIRES/EphB4-Tumoren	96
3.7.1	Charakterisierung des Tumorwachstums	96
3.7.2	Nachweis der EphB4-Proteinbiosynthese.....	98
3.7.3	Charakterisierung des Tumormetabolismus und der Tumorperfusion mit [¹⁸ F]FDG	99
3.7.4	Charakterisierung der Tumorperfusion mit Hoechst 33342.....	102
3.7.5	Charakterisierung der CD31-Proteinbiosynthese.....	103
3.7.6	Charakterisierung hypoxischer Areale mit [¹⁸ F]FMISO	104

3.8	Charakterisierung eines neuen, ¹⁸F-radiomarkierten EphB4-Kinaseinhibitors als Radiotracer zur Bildgebung von EphB4 mittels Kleintier-PET	106
3.8.1	Einfluss von Verbindung 2 auf die Zellproliferation und Zellvitalität	106
3.8.2	Einfluss von Verbindung 2 auf die EphB4-Phosphorylierung	107
3.8.3	Charakterisierung der Zellaufnahme von Verbindung [¹⁸ F]2	108
3.8.4	Charakterisierung des In-vivo-Metabolismus von Verbindung [¹⁸ F]2 im A375-pIRES/EphB4-Tumor-Xenograft-Modell	110
3.8.4.1	<i>Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie</i>	110
3.8.4.2	<i>Autoradiographie</i>	111
3.8.4.3	<i>Bioverteilung</i>	112
3.8.4.4	<i>Metabolitenanalyse</i>	113
3.9	Reinigung und Charakterisierung rekombinanter, löslicher Eph-Rezeptoren	114
3.9.1	Proteinbiosynthese und Sekretion von sEphB4 und sEphB6	114
3.9.2	Reinigung von rekombinantem sEphB4 und sEphB6 aus COS-7-Zellkulturüberständen	115
4	DISKUSSION	118
4.1	Therapiemöglichkeiten und Bedeutung von Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen beim malignen Melanom	118
4.2	Vorkommen von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei humanen Melanomzellen und inflammatorischen Zellen	120
4.3	Einfluss der Kokultur von Melanomzellen mit HL-60(M) auf die metastatischen und inflammatorischen Eigenschaften der Zellen	125
4.4	Einfluss von EphB4 auf das Wachstum und die Vaskularisierung von A375-Tumoren in vivo	135
4.5	Kinaseinhibitoren als potentielle Radiotracer für die In-vivo-Bildgebung von Eph-Rezeptoren	138
4.6	Entwicklung löslicher Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden als Grundlage für die In-vivo-Bildgebung des Eph-Ephrin-Systems	148
5	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	151
6	ZUSAMMENFASSUNG	154
7	LITERATURVERZEICHNIS	158
8	DANKSAGUNG	172
9	VERÖFFENTLICHUNGEN UND KONFERENZBEITRÄGE	173

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
AE	Arbiträre Einheit
Akt	<i>Active human protein kinase</i>
AMF	Autokriner Motilitätsfaktor
AmpR	Ampicillin-Resistenz
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
Calcein-AM	Calcein-Azetoxymethylester
CamR	Chloramphenicol-Resistenz
c-Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma c</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA (engl.: <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CIP	Intestinale Kälberphosphatase (engl.: <i>calf intestinal phosphatase</i>)
CMV	Zytomegalievirus
C _t	Schwellenwert-Zyklus (engl.: <i>cycle threshold</i>)
Cy7	Cyanin 7
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Da	1 Da entspricht 1 u
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle-Medium</i>
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
E-Cadherin	Epitheliales Cadherin
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: <i>epidermal growth factor</i>)
EGFR	EGF-Rezeptor

ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionsassay (engl.: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
Eph	<i>Erythropoietin producing human hepatocellular carcinoma</i>
Ephrin	<i>Eph family receptor interacting proteins</i>
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse und –sortierung
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FKS	Fetales Kälberserum
FOV	Sichtfeld (engl.: <i>field of view</i>)
FPLC	Schnelle Protein-Flüssigchromatographie (engl.: <i>fast protein liquid chromatography</i>)
Fc	Konstante Domäne von Antikörpern (engl.: <i>fragment crystallizable region</i>)
Fwd	Vorwärts (engl.: <i>forward</i>)
Fyn	Protoonkogen wirkende Src-Kinase
G1/G0	Ruhephasen des Zellzyklus
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HL-60(M)	HL-60-Makrophagen
HLA-DR	Humanes MHC-Klasse-II-Protein
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
HSA	Humanes Serumalbumin
ID	Injizierte Dosis
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRES	Interne, ribosomale Eintrittsstelle
KanR	Kanamycin-Resistenz
K _d	Dissoziationskonstante
Lck	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
Log P	Dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen n-Octanol und Wasser
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
Mel-CAM	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: <i>major histocompatibility complex</i>)

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N-Cadherin	Neuronales Cadherin
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NeoR	Neomycin-Resistenz
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
P _{CMV}	Zytomegalievirus-Promotor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ	<i>Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, zonula occludens protein</i>
PE	Phycoerythrin
pEphB4	Phosphorylierter EphB4-Rezeptor
PFA	Paraformaldehyd
Pgp	P-Glykoprotein
pIRES	pIRES2-AcGFP1-Plasmid
POD	Meerrettichperoxidase
pUC ori	Replikationsursprung des Plasmides pUC
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	Protein-Familie von proto-onkogen-wirkenden Serin/Threonin-Kinasen (engl.: <i>rat fibrosarcoma</i>)
Ras	Protein-Familie von proto-onkogen wirkenden, kleinen GTPasen (engl.: <i>rat sarcoma</i>)
Rev	Rückwärts (engl.: <i>reverse</i>)
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase
Rho	<i>Ras homolog</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SAM	Steriles α -Motiv (engl.: <i>steril α-motif</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH2	<i>Src-homology 2</i>
siRNA	Kleine interferierende RNA (engl.: <i>small interfering RNA</i>)

SPR	Oberflächenplasmonresonanz (engl.: <i>surface plasmon resonance</i>)
Src	Sarkom-Kinase (engl.: <i>sarcoma</i>)
SUV	Standardisierte Aufnahmewerte (engl.: <i>standard uptake value</i>)
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (engl.: <i>transforming growth factor</i>)
TIL	Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten
T _m	Schmelztemperatur (engl.: <i>melting temperature</i>)
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U	Einheit (engl.: <i>unit</i>)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ZeoR	Zeocin TM -Resistenz

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung des Tumor-Mikromilieus bei der Entstehung des malignen Melanoms

Das maligne Melanom, welches auch als schwarzer Hautkrebs bezeichnet wird, ist eine der aggressivsten Tumorentitäten und geht auf Veränderungen in den Pigmenttragenden Zellen der Haut, den Melanozyten, zurück. Die Ursachen für die Entwicklung eines Melanoms können sowohl in der Umwelt, dem individuellen Lebensstil als auch im Geno- und Phänotyp eines Menschen liegen. Den größten Risikofaktor für die Entstehung des malignen Melanoms stellt die Exposition gegenüber UV-Licht, vorrangig in Form von Sonnenlicht, dar. In Abhängigkeit vom Hauttyp haben Menschen mit episodisch auftretenden, starken Sonnenbränden, insbesondere im Kindesalter, ein deutlich erhöhtes Risiko, an schwarzem Hautkrebs zu erkranken [1, 2]. Als phänotypischer Risikofaktor für das Auftreten eines Melanoms gilt die Anzahl an Nävi. Bei einem Nävus handelt es sich um eine gutartige, häufig von Melanozyten ausgehende Haut- oder Schleimhautfehlbildung, die umgangssprachlich auch als Leberfleck oder Muttermal bezeichnet wird. Zu den genotypischen Risikofaktoren zählen Mutationen im Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor 2A- und im Melanocortin-1-Rezeptor-Gen. Die Mutationen im Melanocortin-1-Rezeptor-Gen beispielsweise führen zur Produktion von Pheomelanin anstatt des UV-protectiven Eumelanins. Dies resultiert in einer erhöhten Sonnenempfindlichkeit, dem Auftreten von Sommersprossen und roten Haaren sowie einem erhöhten Hautkrebsrisiko [3]. Ein höheres Melanomrisiko liegt außerdem vor, wenn mindestens drei Verwandte ersten Grades an einem Melanom erkrankt sind [4].

Melanomentstehung

Anhand von klinischen und histopathologischen Faktoren wird die Melanomentstehung und -progression in fünf Stufen unterteilt. Wie in **Abbildung 1-1** dargestellt, kann sich ein gewöhnlich erworbener oder angeborener Nävus mit normalen Melanozyten aufgrund von strukturellen Veränderungen zu einem unregelmäßig geformten Nävus entwickeln. Das darauf folgende, frühe primäre Melanom ist durch eine radiale Wachstumsphase gekennzeichnet und wird daher auch als *radial growth phase*-Melanom bezeichnet. Mit dem Übergang in die vertikale Wachstumsphase (*vertical growth phase*-Melanom) erhöht sich die Fähigkeit der Melanomzellen zur

Metastasierung dramatisch, so dass es schließlich zur Bildung von viszeralen und nicht-viszeralen Melanom-Metastasen kommen kann [5, 6].

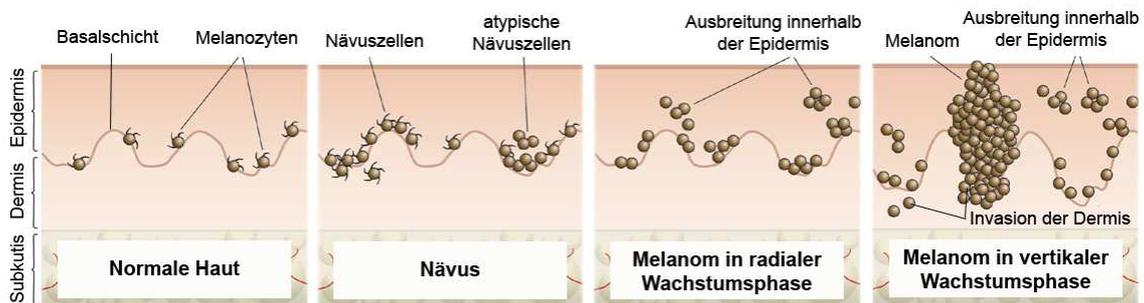


Abbildung 1-1: Phasen der Melanomentstehung und -progression Während die Melanozyten der normalen Haut vereinzelt und in der Basalschicht der Epidermis lokalisiert vorliegen, kommt es in Nävi bzw. atypischen Nävi vermehrt zur Kolokalisation von normalen bzw. strukturell bereits veränderten Melanozyten, den sogenannten Nävuszellen. Solange sich die Nävuszellen nur innerhalb der Epidermis ausbreiten, spricht man von einem Melanom in der radialen Wachstumsphase. Sobald Nävuszellen die Basalmembran durchdringen und sich auch in der Dermis ausbreiten, handelt es sich um ein Melanom in der vertikalen Wachstumsphase. Letzteres geht mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko einher (modifiziert nach [7]).

Bedeutung des Tumor-Mikromilieus

Die Entstehung und Progression des Melanoms wird durch verschiedene zelluläre und lösliche Faktoren beeinflusst. Beispielsweise sind Keratinozyten der Haut für die Melanomentstehung von zentraler Bedeutung. Sie regulieren in der gesunden Haut über den durch epitheliales Cadherin (E-Cadherin) vermittelten direkten Zell-Zell-Kontakt das Wachstum, die Morphologie und die Proteinbiosynthese von Melanozyten der Epidermis [8, 9]. Bereits in frühen Stadien des Nävus kommt es jedoch zu einer Reduktion der E-Cadherin-Expression bis hin zum vollständigen Verlust bei den meisten Melanomen. Dies kann zur Melanomentstehung beitragen [10].

Ein weiterer bedeutender Einflussfaktor auf die Melanomentstehung und -progression ist die Infiltration des Tumors mit hämatopoetischen und im Speziellen mit inflammatorischen Zellen. Bereits im Jahr 1863 beschrieb Rudolf Virchow Leukozyten im und am Rand von Tumoren und postulierte daraufhin erstmalig einen Zusammenhang zwischen chronisch entzündlichen Prozessen und der Entstehung von Tumorerkrankungen [11]. Bei fast allen soliden Tumoren sind infiltrierte Leukozyten nachweisbar. Deren Menge, Zusammensetzung und Verteilung variiert jedoch stark. Das Leukozyteninfiltrat ist durch verschiedene immunologische Regulator- und Effektorzellen, vorrangig jedoch durch Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) und Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten (TIL), charakterisiert. Des Weiteren wurden auch dendritische Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen nachgewiesen [12-14]. Alle diese Zellen sezernieren eine Reihe von zytotoxischen

Mediatoren und können mit Hilfe dieser Einfluss auf die Entstehung, Progression und Metastasierung des malignen Melanoms nehmen. Beispiele für derartige Mediatoren sind reaktive Sauerstoffspezies, Serin-, Cystein- und Metalloproteasen sowie Interleukine (IL), Interferone (IFN) und der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α [13]. Zytokine, wie z.B. TNF- α , IL-1 und IL-6, können zu einer verstärkten Gewebsinvasion und Metastasierung führen [15].

Inflammatorische Zellen sollten Tumorzellen als Antigene erkennen und diese bekämpfen. Ungeachtet dessen gibt es immer mehr präklinische und klinische Hinweise darauf, dass insbesondere TAM in verschiedenen Tumorentitäten protumorigen wirken und ein vermehrtes Auftreten dieser Zellen mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht [16, 17]. Auch neutrophile Granulozyten, Mastzellen und aktivierte T-Lymphozyten können durch die Freisetzung von Proteasen, Chemokinen und angiogenen Faktoren zur Tumorangiogenese und -progression beitragen [13, 18-20]. Beim Melanom wurde eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an Mastzellen und der Anzahl an Mikrogefäßen im Tumor gefunden, was wiederum mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert war [21].

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM)

TAM stellen die wichtigsten Effektorzellen der angeborenen oder unspezifischen Immunabwehr, beispielsweise gegenüber Tumorzellen, dar [22]. Ihre Wirkung kann sowohl anti- als auch protumorigen sein, was wahrscheinlich, wie beim Melanom gezeigt wurde, von der Anzahl und Art der Makrophagen im Tumor abhängt [23, 24]. Durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren fördern TAM die Proliferation von Tumorzellen. Des Weiteren sezernieren sie eine Vielzahl von Zytokinen und proteolytischen Enzymen, die zum Um- und Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) führen und so die Invasion von Tumorzellen sowie die Tumorangiogenese begünstigen [25].

Die Untersuchung von 37 Melanom-Patienten ergab eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß des Makrophagen-Infiltrats, der Vaskularisierung und der Malignität der Tumoren [19]. Aufgrund der Freisetzung von TNF- α durch die TAM kam es zur verstärkten Expression von angiogenen Faktoren, wie z.B. IL-8, *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und vaskulärem endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) in Endothelzellen, Tumorzellen und anderen Zellen des Tumorstromas. Dies führte zur Induktion der Hämangiogenese in den Tumoren [19, 26]. Durch die Ausschüttung von VEGF-C durch TAM und Melanomzellen kam es außerdem zu einer verstärkten Lymphangiogenese, was wiederum das Risiko für die Bildung von Metastasen in nahe gelegenen Lymphknoten erhöht [27, 28]. Darüber hinaus sezernieren TAM

immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und den transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β). Dadurch wird die Proliferation und Aktivierung von T-Lymphozyten gehemmt und die Differenzierung zu immunsuppressiv wirkenden, regulatorischen T-Lymphozyten verstärkt. Auf diese Weise kommt es zur Dysregulation des Immunsystems und der Tumor entgeht der Immunabwehr [20, 25]. Die immunhistologische Untersuchung der Tumoren von über 100 Melanom-Patienten zeigte, dass mit zunehmender Tumorprogression bis hin zur Metastasierung die Zahl der reifen TAM zunahm, während die Menge der Langerhans-Zellen in der Haut abnahm. Ersteres war mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden [12].

Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten (TIL)

TIL sind ein wichtiger Bestandteil der adaptiven oder spezifischen Immunabwehr, beispielsweise gegenüber Tumorzellen. Die in der Haut befindlichen Langerhans-Zellen übernehmen die Aufgabe der Antigen-Präsentation und führen somit zur Induktion der Immunabwehr. Nach der Phagozytose von Tumorzellen werden diese prozessiert und die entsprechenden Antigene zusammen mit Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Proteinen auf der Oberfläche der Langerhans-Zellen präsentiert. Letztere migrieren TNF- α - und IL-1 β -vermittelt in drainierende Lymphknoten und führen dort zur Aktivierung und Differenzierung naiver T-Lymphozyten. Letztere zirkulieren bis zur ihrer antigenspezifischen Aktivierung zwar über das Blut zwischen den sekundären lymphatischen Organen, was als *homing* bezeichnet wird, können aber nicht in extralymphatische Gewebe gelangen. Somit würden die T-Lymphozyten ohne die Antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen nicht oder nur sehr langsam auf die Tumorzellen und deren Antigene in der Haut aufmerksam werden. Erst während der Aktivierung und Differenzierung der naiven T-Lymphozyten durch die Langerhans-Zellen kommt es zu einer veränderten Expression von *homing*-Rezeptoren, wodurch die T-Lymphozyten in die Haut gelangen und eine spezifische Immunantwort gegen die Tumorzellen auslösen können [29].

Das Ausmaß der Infiltration mit T-Lymphozyten ist ein signifikanter und unabhängiger, positiver prognostischer Faktor für die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Melanom-Patienten. Von prognostischer Relevanz ist jedoch nur die Infiltration des Tumors selbst und nicht die der Tumorumgebung [30, 31]. Im Rahmen der immunhistologischen Untersuchung der Tumoren von mehr als 100 Melanom-Patienten wurde gezeigt, dass das inflammatorische Tumoringfiltrat im Verlauf der Melanomprogression Veränderungen unterliegt. Während primäre Melanome mit einer Dicke von weniger als 0,75 mm meist durch eine peritumorale Anreicherung von T-Lymphozyten, welche auf ihrer Oberfläche durch die *cluster of differentiation* (CD)

drei und vier gekennzeichnet waren ($CD3^+CD4^+$, T-Helferzellen), kam es mit fortschreitender Invasion der Tumorzellen ins umliegende Gewebe zu einer erhöhten Menge an intratumoralen, vorrangig $CD8^+$ -T-Lymphozyten (T-Suppressorzellen). Diese Veränderung in der T-Zell-Population war mit einer verstärkten Expression des humanen MHC-Klasse II-Glykoproteins HLA-DR in den Tumorzellen assoziiert. HLA-DR spielt eine wichtige Rolle in der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Aufgrund dessen könnte dies einen möglichen Mechanismus für die Hemmung der lokalen Anti-Tumor-Immunantwort darstellen, denn TIL sind oftmals nicht hinreichend aktiviert und können somit ihre zytotoxische Funktion nicht erfüllen [12, 32, 33]. Eine Studie mit über 800 Melanom-Patienten ergab eine Korrelation zwischen dem Fehlen von TIL im Primärtumor und dem Auftreten von Metastasen [34].

1.2 Die Metastasierung des malignen Melanoms als limitierender Einflussfaktor auf die Tumorthherapie

Trotz der Verbesserung der Diagnose und Therapie von Tumoren stellten Krebserkrankungen auch im Jahr 2010 nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar [35]. Dies ist durch die Fähigkeit der Tumorzellen zur Metastasierung und die häufige und zum Teil während der Therapie erworbene Resistenz der Tumorzellen gegenüber den bisher bekannten Therapien begründet [36-38]. Aufgrund dessen stellt die Aufklärung der zellulären und molekularen Mechanismen der Metastasierung von Tumorzellen ein zentrales Ziel der Krebsforschung dar.

Metastasierung des malignen Melanoms

Das maligne Melanom ist eine Tumorentität, die schon sehr früh zu Metastasen führt. Darüber hinaus ist die Inzidenz des malignen Melanoms in den letzten 30 Jahren dramatisch und schneller als bei jedem anderen soliden Tumor gestiegen [3, 29]. Während die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit einem Primärtumor von weniger als 1 mm Dicke nach dessen chirurgischer Entfernung mit etwa 93% gut ist, ändert sich dies dramatisch, sobald es zur Metastasierung des Melanoms kommt. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit metastasierendem Melanom sinkt auf etwa 10% und die mittlere Überlebenszeit beträgt gerade einmal sechs bis neun Monate.

Die mittlere Überlebenszeit hängt dabei vom Ort der ersten Metastasierung ab. Während Patienten mit nicht-viszeralen Metastasen, beispielsweise in der Haut, den Lymphknoten und der Lunge durchschnittlich 12 bis 15 Monate überleben, versterben

Patienten mit Leber-, Knochen- und Gehirnmastasen (viszerale Mastasen) im Mittel schon nach drei bis vier Monaten [3, 4, 29, 39]. Aufgrund der Resistenz der Melanomzellen gegenüber der Chemotherapie führen die Mastasen zunehmend zu Raumforderungen und infolgedessen zu Einschränkungen lebenswichtiger Prozesse.

Therapie des malignen Melanoms

Seit seiner Markteinführung im Jahr 1975 ist Dacarbazin (Detimedac®, medac GmbH, 5-(3,3-Dimethyl-1-triazenyl)imidazol-4-carboxamid) bis heute das am häufigsten verabreichte Chemotherapeutikum bei Patienten mit malignem Melanom, da bisher keine besser wirksamen Alternativen mit vertretbaren Nebenwirkungen gefunden wurden. Die Wirkung von Dacarbazin ist jedoch begrenzt. Während es bei etwa 20% der Patienten eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit um fünf bis sechs Monate bewirkt, können nur weniger als 5% der Patienten vollständig geheilt werden [3, 39].

Im Februar 2012 wurde Vemurafenib (Zelboraf™, F. Hoffmann-La Roche AG und Plexxikon) zur Behandlung des malignen Melanoms in Deutschland zugelassen. Vemurafenib ist ein selektiver Inhibitor der Isoform B der Serin/Threonin-Kinase *rat fibrosarcoma* (B-Raf), welche bei circa 60% aller Melanom-Patienten mutiert und infolgedessen permanent aktiviert ist. Im Rahmen einer Studie mit 675 Melanom-Patienten mit einer B-Raf-V600E-Mutation war die Ansprechrate etwa neunmal höher ist als bei Dacarbazin und die Überlebenszeit der Patienten wurde signifikant verlängert. Da die Tumorzellen nach einer gewissen Zeit eine Resistenz gegenüber dem Therapeutikum entwickeln, bewirkt jedoch auch Vemurafenib nur ein zeitlich begrenztes Ansprechen der Tumoren und keine Heilung [38].

Aufgrund dessen sind neue Strategien zur Früherkennung und Therapie des malignen Melanoms dringend notwendig. Dazu ist die Identifizierung der molekularen Mechanismen, die zur Metastasierung und zur Resistenz der Melanomzellen gegenüber den bisher bekannten Therapiemöglichkeiten führen, erforderlich.

Allgemeine Mechanismen der Metastasierung solider Tumoren

Bereits im Jahr 1889 veröffentlichte der englische Chirurg Stephen Paget seine *seed and soil*-Hypothese zur Metastasierung von soliden Tumoren. Er stellte fest, dass Tumorzellen nicht willkürlich metastasieren, sondern eine Präferenz für bestimmte Organe zeigen. Diese ist sowohl durch mechanische Faktoren im Kapillarbett als auch durch lösliche und zelluläre Faktoren im Mikromilieu der Zielorgane bedingt [40]. Die moderne Definition der *seed and soil*-Hypothese gilt prinzipiell für alle soliden Tumoren und umfasst die folgenden drei Prinzipien [37]:

1. Primärtumoren und Metastasen bestehen aus Tumorzellen und Stromazellen, wie z.B. Epithelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten und eingewanderten Leukozyten. Auch innerhalb der Tumorzellen gibt es geno- und phänotypisch verschiedene Subpopulationen, die mehr oder weniger das Potential zur Metastasierung besitzen und zur Heterogenität der Tumoren beitragen.
2. Nur Tumorzellen, die aufgrund ihres Geno- und Phänotyps alle für die Metastasierung erforderlichen Schritte, wie Invasion, Embolisierung, Überleben im Blutgefäßsystem, Anhaftung im Kapillarbett eines Organs, Extravasation und Wachstum zu einem Sekundärtumor (**Abbildung 1-2**) erfolgreich absolvieren, verursachen Metastasen.
3. Metastasen können sich dabei nur in bestimmten Organen bilden, in denen das Mikromilieu des Organs (*soil*) geeignete Bedingungen für die Tumorzellen (*seed*) bereitstellt. Hierbei kommt es zu komplexen Wechselwirkungen zwischen den Tumor- und Stromazellen. Beispielsweise ermöglichen Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen die Anlagerung von Tumorzellen an das Gefäßendothel. Darüber hinaus fördern durch Endothelzellen sezernierte Wachstumsfaktoren die Proliferation der Tumorzellen am Ort der Metastasierung.

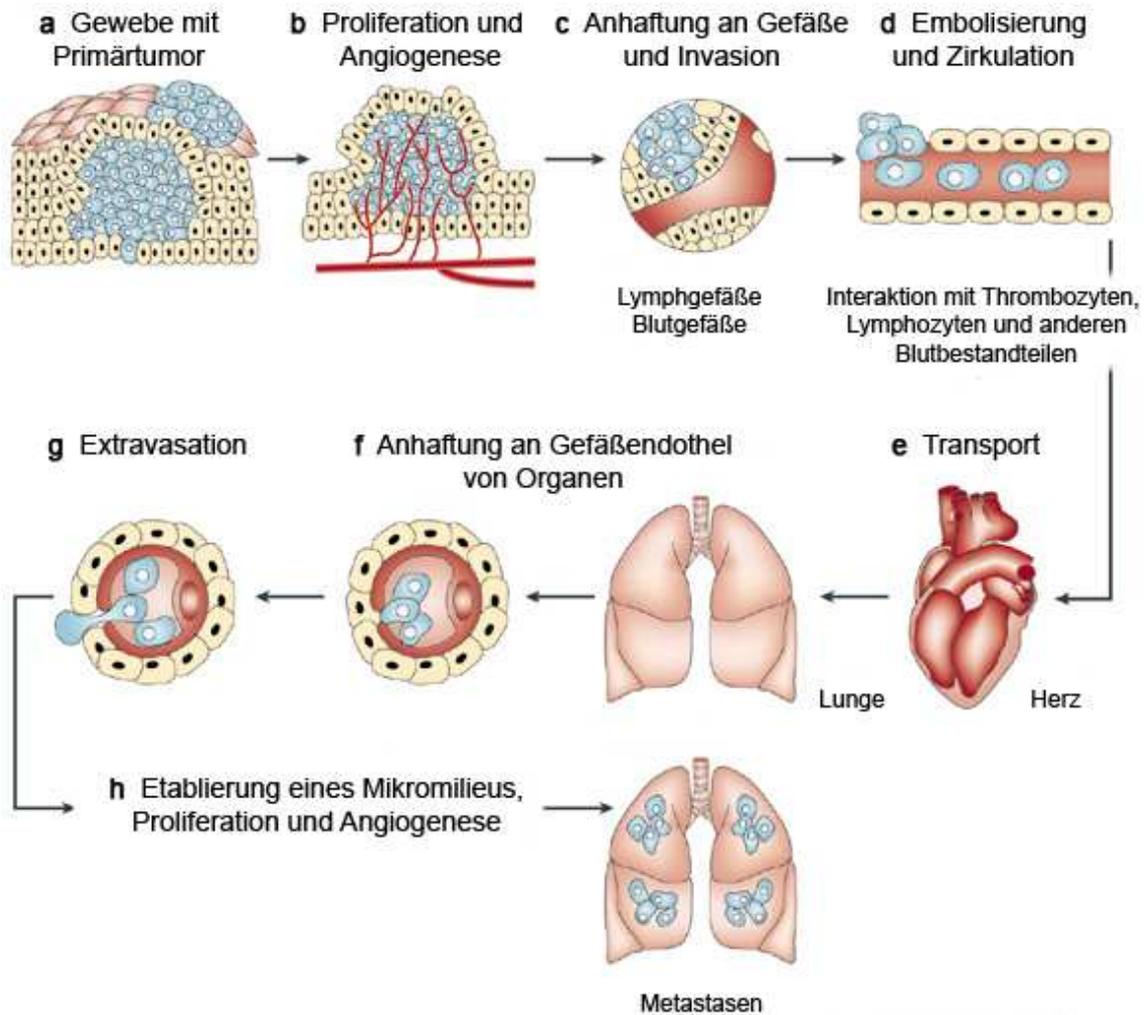


Abbildung 1-2: Allgemeine Darstellung der Metastasierung von Tumorzellen aus soliden Tumoren
 Um ein weiteres Wachstum zu ermöglichen, müssen Primärtumoren (a, Tumorzellen sind blau dargestellt) ab einem Durchmesser von 1 - 2 mm durch die Ausschüttung von angiogenen Faktoren, wie z.B. VEGF, umliegende Endothelzellen zur Ausbildung von Blutgefäßen anregen (b). Darüber hinaus sind einige Tumorzellen in der Lage, natürliche Gewebsbarrieren wie Bindegewebe und die Gefäßwand zu durchdringen und gelangen so bevorzugt über Lymphgefäße, Venen, Arterien und Kapillaren in das Blutgefäßsystem (c, d). Nur etwa 0,01% der Tumorzellen überleben die Zirkulation im Blutkreislauf und gelangen in das Kapillarbett entfernt gelegener Organe. Dort werden sie aufgrund der Interaktion mit Endothelzellen oder der subendothelialen Basalmembran zurückgehalten (e, f). Das Auswandern der Tumorzellen aus den Blutgefäßen (g) wird durch ähnliche Mechanismen wie bei der Invasion ermöglicht. Der Prozess der Metastasierung ist jedoch erst abgeschlossen, wenn es den Tumorzellen gelingt, im entsprechenden Organ ein für sie günstiges Mikromilieu zu schaffen, welches ihnen die Proliferation und die Angiogenese ermöglicht. Die daraus resultierenden Sekundärtumoren bezeichnet man als Metastasen (modifiziert nach [37]).

1.3 Die Rolle des Eph-Ephrin-Systems bei der Tumorprogression und Metastasierung

Die Eph (*Erythropoietin producing human hepatocellular carcinoma*)-Rezeptoren und deren Liganden, die Ephrine (*Eph family receptor interacting proteins*), sind membranständige Proteine und bilden die größte Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) [41].

Im Gegensatz zu anderen RTK, wie dem EGF-Rezeptor (EGFR), regulieren Eph-Rezeptoren und Ephrine nicht vorrangig zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung. Vielmehr nehmen sie durch die Auslösung adhäsiver und repulsiver Reaktionen Einfluss auf die gerichtete Bewegung von neuronalen, endothelialen und inflammatorischen Zellen sowie von Tumorzellen. Dabei scheint möglicherweise die Signalstärke oder -dauer darüber zu entscheiden, ob es zur Abstoßung oder Anziehung der beteiligten Zellen kommt [42, 43]. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität zwischen Rezeptor und Ligand kommt es bei der Repulsion zweier Zellen wahrscheinlich nicht zur Dissoziation des Rezeptor-Ligand-Komplexes, sondern zur Endozytose des gesamten Eph-Ephrin-Komplexes (Trans-Endozytose) oder aber zur proteolytischen Spaltung des Ephrins (*ectodomain shedding*), beispielsweise durch *a disintegrin and metalloprotease* (ADAM) 10 [42, 44, 45].

Eph-Rezeptoren

Bei Wirbeltieren unterscheidet man aufgrund von Sequenzunterschieden in der Ligand-Bindungsdomäne und der damit einhergehenden Ligand-Bindungspräferenz zehn Eph-Rezeptoren der Klasse A (EphA1-10) von sechs Eph-Rezeptoren der Klasse B (EphB1-6).

Die Struktur der Eph-Rezeptoren ist stark konserviert und zeichnet sich extrazellulär, wie in **Abbildung 1-3 (A)** dargestellt, durch eine globuläre Ephrin-Bindungsdomäne, eine Cystein-reiche Domäne mit einem dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähnlichen Motiv sowie durch zwei Fibronectin Typ III-Domänen aus. Neben der hochaffinen N-terminalen Ephrin-Bindungsstelle verfügen die Eph-Rezeptoren über zwei weitere Ephrin-Bindungsstellen, die sich in der Ephrin-Bindungsdomäne sowie der Cystein-reichen Domäne befinden (**Abbildung 1-3 (B)**). Interessanterweise bewirken gerade diese niedrigaffinen Bindungsstellen aufgrund einer sogenannten Klassenspezifischen Schleife das klasseninterne Bindungsverhalten der Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden. Des Weiteren sind die niedrigaffinen Bindungsstellen, wie in **Abbildung 1-3 (C)** gezeigt, für die Zusammenlagerung verschiedener Eph-Ephrin-Komplexe von Bedeutung. Der extrazelluläre Teil des Eph-Rezeptors ist über eine

transmembrane Domäne mit dem intrazellulären Teil des Proteins verbunden. Letzterer ist durch eine Juxtamembran-, eine Tyrosinkinase- sowie durch eine *steril α -motif* (SAM)-Domäne und ein C-terminales *post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, zonula occludens protein* (PDZ)-bindendes Motiv charakterisiert [42, 46-48].

Ephrine

Aufgrund von strukturellen Unterschieden werden auch die Ephrin-Liganden in eine Klasse A und B unterteilt. Im Gegensatz zu den sechs Ephrinen der Klasse A (EphrinA1-6), welche über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Rest in der Zellmembran verankert sind, verfügen die drei Ephrine der Klasse B (EphrinB1-3) über eine transmembrane Domäne sowie eine konservierte, intrazelluläre Domäne mit einem PDZ-bindenden Motiv [42, 49].

Eph-Ephrin-Interaktion und -Signalgebung

Im Allgemeinen binden Ephrine der Klasse A an Eph-Rezeptoren der Klasse A, während Ephrine der Klasse B von Eph-Rezeptoren der Klasse B erkannt werden. Ausnahmen hiervon sind EphA4 (Bindung von B-Ephrinen) und EphB2 (Bindung von EphrinA5) [50, 51].

Da sowohl die Eph-Rezeptoren als auch die Ephrine, mit Ausnahme weniger löslicher Isoformen, Membran-gebunden vorliegen, erfolgt die Rezeptor-Aktivierung in der Regel nur bei direktem Zell-Zell-Kontakt von Rezeptor- und Ligand-exprimierender Zelle [50]. Infolgedessen kommt es zu Konformationsänderungen im Liganden und im Rezeptor, was die Phosphorylierung von Tyrosin-Resten in der Juxtamembran- und im weiteren Verlauf in der Kinasedomäne des Eph-Rezeptors bewirkt. In Abhängigkeit von der Eph- und Ephrin-Dichte auf der Zelloberfläche kann es zur Tetra- und Oligomerisierung der Rezeptor-Ligand-Dimere kommen. Dies beeinflusst möglicherweise das Ausmaß der Rezeptoraktivierung.

Die Tyrosin-Phosphorylierung ermöglicht die Interaktion mit zytoplasmatischen Signalproteinen, die beispielsweise über eine *sarcoma* (Src) *homology 2* (SH2)-Domäne verfügen (**Abbildung 1-3 (C)**). In seltenen Fällen ist auch eine von der Tyrosin-Phosphorylierung unabhängige Signalweiterleitung möglich, die auf der Interaktion von zytoplasmatischen Signalproteinen mit der SAM-Domäne oder dem PDZ-Bindungsmotiv der Eph-Rezeptoren beruht [42, 43, 45].

Eine Besonderheit des Eph-Ephrin-Systems ist, dass es infolge der Rezeptor-Ligand-Interaktionen zu einer bidirektionalen Signalauslösung kommt, die in Richtung der Eph-Rezeptor-exprimierenden Zelle als Vorwärts-Signalgebung und in Richtung der Ephrin-exprimierenden Zelle als Rückwärts-Signalgebung bezeichnet wird. Die Aktivierung der Eph-Rezeptoren aufgrund einer Rezeptor-Ligand-Interaktion führt zur Autophosphorylierung dieser. Im Gegensatz dazu erfolgt die Phosphorylierung der B-Ephrine nach der Interaktion mit einem Rezeptor beispielsweise durch Sarkom (Src)-Kinasen [52]. Trotz des Fehlens einer intrazellulären Domäne sind auch Ephrine der Klasse A zur Rückwärts-Signalgebung befähigt, was infolge der Aggregation mit transmembranen Proteinen, z.B. in *lipid rafts*, erfolgt. Darüber hinaus ist auch die Interaktion von Eph-Rezeptoren und Ephrinen auf einer Zelle möglich. Dies führt zu keiner Signalauslösung und könnte stattdessen zur Abschwächung des bidirektionalen Signals zwischen zwei Zellen beitragen [48].

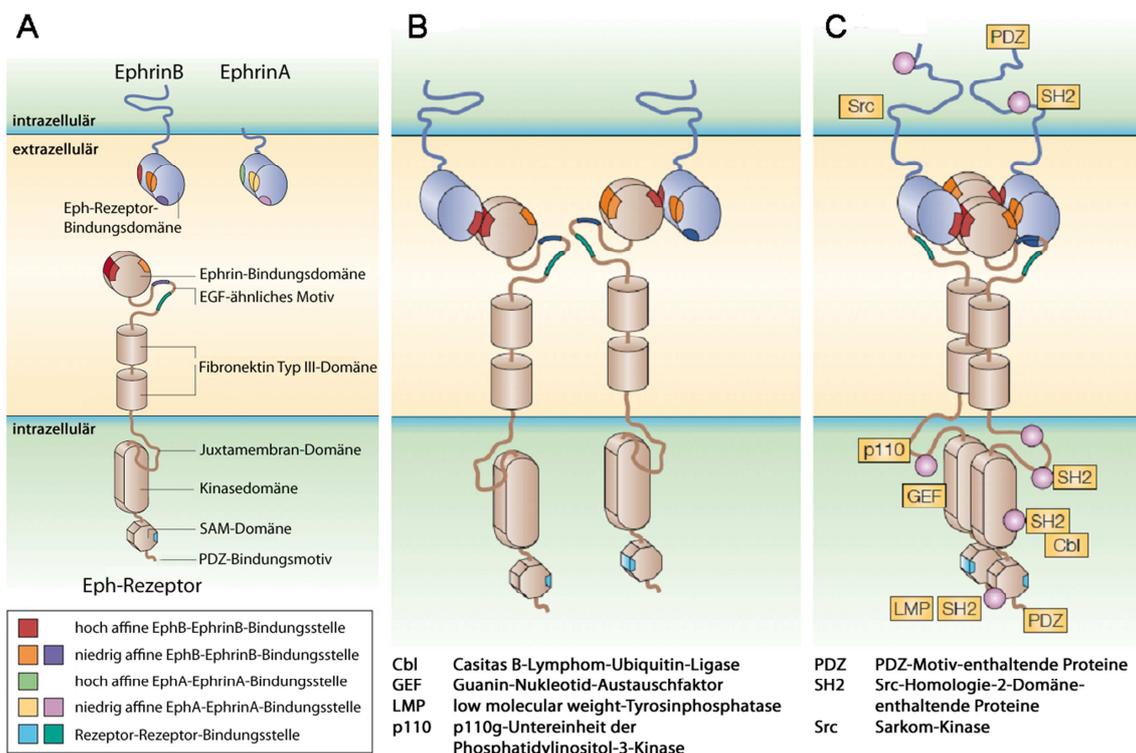


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Eph-Rezeptoren und Ephrinen (A), der Rezeptor-Dimerisierung (B) und der Rezeptor-Tetramerisierung nach erfolgter Rezeptor-Ligand-Interaktion (C) In der Abbildung sind die für die Di- und Tetramerisierung notwendigen Bindungsstellen und die daraufhin bindenden Domänen von Signalmolekülen dargestellt (modifiziert nach [42]).

EphB4-Rezeptor

Der EphB4-Rezeptor wurde erstmalig 1994 beschrieben. Er besteht aus 987 Aminosäuren und hat eine Molmasse von 108 kDa. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors ist nach der Abspaltung eines 15 Aminosäuren langen Signalpeptids (Aminosäuren (AS) 1-15) durch eine Ligand-Bindungsdomäne (AS 29 - 196) und zwei Fibronectin Typ III-Domänen (AS 321-425 und 435-526) charakterisiert. Von der Ligand-Bindungsdomäne bis zur ersten Fibronectin Typ III-Domäne erstreckt sich eine Cystein-reiche Region (AS 61-373) mit 20 konservierten Cysteinresten. Die Asparaginreste an Position 208, 340 und 431 stellen potentielle Stellen für eine N-Glykosylierung dar. Der extrazelluläre Teil des EphB4 wird durch die Transmembran-Domäne (AS 538-563) vom intrazellulären Teil des Rezeptors, welcher die charakteristische Kinasedomäne (AS 613-881) trägt, getrennt. Dabei erstreckt sich das ATP-Bindungsmotiv (Gly-X-Gly-X-X-Gly) über die Aminosäuren 622 bis 627 in der Subdomäne I der Kinasedomäne. Der Lysinrest an Position 647 der Subdomäne II, welcher dem innerhalb der Tyrosinkinase konservierten Lysinrest entspricht, ist für den Phosphattransfer essentiell. Als potentielle Phosphorylierungsstellen stehen die Tyrosinreste an Position 601, 619 und 741 zur Verfügung, wobei nur der phosphorylierte Tyrosinrest an Position 601 das entsprechende Motiv für die Erkennung durch SH2-Domänen-tragende Signalproteine bereitstellt [53].

EphB4 unterscheidet sich von anderen Eph-Rezeptoren durch seine erhöhte Ligandselektivität gegenüber EphrinB2. Die Ursache hierfür ist die Substitution eines innerhalb der Eph-Rezeptoren stark konservierten Argininrestes durch ein Lysin an Position 95 des EphB4-Rezeptors. Die mittels isothermaler Titrationskalorimetrie bestimmte Bindungsaffinität (K_d) von EphrinB2 an EphB4 lag bei 40 ± 20 nM [54]. Trotz der relativ hohen Sequenzhomologie zwischen EphrinB2 und EphrinB1 (46%) bzw. EphrinB3 (40%) zeigt EphB4 eine deutlich niedrigere Affinität gegenüber EphrinB1 und EphrinB3. Die Bindung von EphrinB2 an EphB4 erfolgt durch die Interaktion der hydrophoben Tasche des Rezeptors mit der sogenannten G-H-Schleife des Ephrins, in welcher insbesondere der Phenylalaninrest an Position 120 für die Rezeptor-Bindung essentiell ist. Darüber hinaus können sich EphB4-EphrinB2-Dimere zu Tetrameren zusammenlagern (siehe **Abbildung 1-3 (C)**) [54, 55].

Die Bedeutung des EphB4-Rezeptors für die Tumorentstehung und -progression wird kontrovers diskutiert. Bei Karzinomen von Gebärmutter, Brust, Ovarien, Prostata, Blase, Mesothel, Kolon und dem Plattenepithel des Kopf-Hals-Bereiches konnte eine positive Korrelation zwischen der EphB4-Proteinbiosynthese und dem klinischen Fortschreiten der Erkrankung verzeichnet werden [56-63]. Gleichzeitig wurde jedoch bei einem Teil von Patienten mit Mamma- und kolorektalem Karzinom festgestellt, dass

diese eine schwache EphB4-Expression aufweisen, was wiederum mit einer schlechten Prognose für den Patienten und mit einem hohen Rezidivrisiko einherging [64-66].

Auch beim Melanom ist die Bedeutung des EphB4-Rezeptors nicht hinreichend geklärt. Die Arbeitsgruppe um Huang zeigte, dass EphB4-transfizierte B16-Melanomzellen nach der Injektion in Mäuse signifikant kleinere Tumoren bilden als native B16-Zellen. Übereinstimmend führte die Herunterregulierung der natürlichen EphB4-Expression in den B16-Zellen zu größeren Tumoren. Die durch EphB4 verminderte Tumorgroße ging mit einer signifikant reduzierten Gefäßdichte einher, wobei aufgrund von apoptotischen Prozessen die Anzahl der EphrinB2-positiven Endothelzellen reduziert war. Betroffen waren insbesondere die arteriellen Blutgefäße, da EphrinB2 von arteriellen, nicht aber von venösen Endothelzellen exprimiert wird. Die B16-Melanomzellen selbst exprimierten kein EphrinB2 [67]. Im Gegensatz dazu stellten Yang und Kollegen bei einer Reihe von murinen Melanom-Zelllinien einen positiven Zusammenhang zwischen der EphB4-Proteinbiosynthese und der Malignität der Zellen fest. SW1-Melanomzellen, die sowohl EphrinB2 als auch EphB4 auf ihrer Oberfläche aufweisen, zeigten ein stärkeres Migrationsverhalten als C19-Melanomzellen, die sich von den SW1-Zellen nur durch ihre niedrigere EphB4-Synthese unterscheiden. Das erhöhte Migrationsverhalten der SW1-Melanomzellen war von der EphrinB2-induzierten Kinaseaktivität des EphB4-Rezeptors abhängig und wurde durch eine *rat sarcoma (Ras) homolog* (Rho)-Genfamilien-Mitglied A-induzierte Veränderung des Aktin-Zytoskeletts vermittelt [68]. In weiterführenden Untersuchungen stellte die Arbeitsgruppe um Yang fest, dass die C19-Melanomzellen nach der Transfektion mit EphB4 zu ebenso großen Tumoren wie SW1-Zellen führen, im Gegensatz zu den SW1-Tumoren jedoch nicht metastasierten. Hinsichtlich ihrer Gefäßdichte unterschieden sich die SW1- und C19-EphB4-Tumoren nicht von den C19-Tumoren, wohl aber durch ihre Gefäßgröße. Als Mechanismen hierfür wurden die Aktivierung der *extracellular signal-regulated kinases* (Erk) 1/2, der *active human protein kinase* (Akt) und des anti-apoptotischen Proteins *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) durch EphB4-nachgeschaltete Signalwege diskutiert [69].

EphB4 kann also, möglicherweise in Abhängigkeit vom zellulären Mikromilieu und der Koexpression seines bevorzugten Liganden EphrinB2 oder anderer EphB-Rezeptoren, sowohl pro- als auch antitumorigen wirken [67, 70]. In diesem Zusammenhang weisen Untersuchungen mit löslichem EphB4 (sEphB4), welches zwar an EphrinB2 bindet, aufgrund seiner fehlenden intrazellulären Domäne aber keine Signalkaskade in der Rezeptor-tragenden Zelle auslöst, auf die Bedeutung von EphrinB2-vermittelten Signalwegen hin [62].

EphB6-Rezeptor

Der EphB6-Rezeptor wurde erstmalig 1997 beschrieben. Er besteht aus 1006 Aminosäuren und hat eine Molmasse von 109 kDa. Beim EphB6 wurden in den Subdomänen II, III VI und VII der sonst stark konservierten Kinasedomäne im Vergleich zu allen anderen Eph-Rezeptoren der Klasse B sechs veränderte Aminosäuren identifiziert. Diese führen zu einem Verlust der katalytischen Aktivität des Rezeptors. Darüber hinaus fehlt im EphB6-Protein ein 14 Aminosäuren langer Abschnitt der Kinasesubdomäne VII, welcher eine wichtige Autophosphorylierungs- und Bindungsstelle für intrazelluläre Signalproteine darstellt. Trotz seines Kinase-Defekts kann EphB6 im heterooligomeren Komplex mit anderen EphB-Rezeptoren nach der Interaktion mit Ephrinen der Klasse B an seinen Tyrosinresten phosphoryliert werden. Infolgedessen ist eine Interaktion mit intrazellulären Signalproteinen, wie z.B. dem *casitas B-lineage lymphoma c* (c-Cbl) oder der Src-Kinase Fyn möglich. Diese regulieren die Ubiquitin-abhängige Proteindegradation sowie die Migration und Adhäsion von Zellen [71].

Im Gegensatz zu anderen Kinase-defizienten RTK wird EphB6 in fast allen Geweben, insbesondere in Thymus, Haut, Gehirn und Pankreas exprimiert, was auf eine Bedeutung für die Physiologie dieser Gewebe hinweist [72-74]. In der menschlichen Haut, in welcher zugleich vergleichsweise hohe Mengen an B-Ephrinen exprimiert werden, wurde nach dem Thymus die zweitstärkste EphB6-mRNA-Expression gefunden [72]. Im Vergleich zu gutartigen Nävi kommt es beim malignen Melanom zu einer verminderten EphB6-Expression bis hin zum Verlust von EphB6 in Metastasen [75]. Für andere Tumorentitäten, wie z.B. Brustkrebs, Neuroblastom und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, wurde ebenfalls eine inverse Korrelation zwischen der EphB6-Expression und dem Stadium bzw. der Invasivität des Tumors festgestellt [75, 76]. Dies führt zu der Hypothese, dass EphB6 bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen eine Rolle als negativer Regulator spielt. Als Mechanismen hierfür werden die Inhibierung der Expression bzw. der Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen 3, 7 und 19 sowie die Verstärkung der zellulären Adhäsion an Proteine der ECM diskutiert. Da EphB6 in T-Lymphozyten stark exprimiert wird und für deren Aktivierung von Bedeutung ist, könnte der Verlust von EphB6 beim malignen Melanom zu dem häufig beobachteten Verlust der Anti-Tumor-Immunantwort beitragen [45, 75, 77, 78]. Eine verkürzte, lösliche Form des EphB6-Rezeptors wurde bisher nur von der Arbeitsgruppe um Yamada beschrieben. Dieses Protein war beim Astrozytom, beim Glioblastom und beim Gliosarkom mit einer verstärkten Tumorprogression assoziiert, was möglicherweise auf die Konkurrenz mit EphB6 um die Bindung von Ephrinen der Klasse B zurückzuführen ist [79, 80].

EphrinB2-Ligand

Beim EphrinB2 handelt es sich um ein 333 Aminosäuren umfassendes Protein mit einer Molmasse von 37 kDa. EphrinB2 stellt den bevorzugten Liganden für EphB4 und EphB6 dar [55, 81].

Beim Melanom wurde eine positive Korrelation zwischen der EphrinB2-Expression und den prometastatischen Eigenschaften von Melanom-Zelllinien sowie dem klinischen Fortschreiten beim Patienten festgestellt [82]. *In vitro* führte die Überexpression von EphrinB2 in B16-Melanomzellen, die im Gegensatz zu A375-Melanomzellen nativ kein EphrinB2 exprimieren, wahrscheinlich β 1-Integrin-vermittelt, zu einer verstärkten Adhäsion an die ECM-Proteine Fibronectin und Laminin V sowie zu einer erhöhten Migration der Melanomzellen [83]. Somit stellt EphrinB2 einen potentiellen diagnostischen und prognostischen Marker dar.

Die höchste EphrinB2-Proteinsynthese wurde in Tumor- und Endothelzellen der invasiven Front des sich ausbreitenden, primären Melanoms identifiziert [82, 83]. Augustin und Kollegen konnten zeigen, dass endotheliales EphrinB2 *in vivo* für die Metastasierung von Tumorzellen von Bedeutung ist. Nach der intrakardialen Injektion von EphB4-überexprimierenden A375-Melanomzellen adhärten diese im Vergleich zu den mock-transfizierten A375-Melanomzellen verstärkt in Mikrogefäßen der Lunge, der Leber und den Nieren, in denen EphrinB2 synthetisiert wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Interaktion zwischen EphB4-exprimierenden Tumorzellen und EphrinB2 auf der Oberfläche von Endothelzellen zur Organ-spezifischen Metastasierung von Melanomzellen beiträgt [70]. Darüber hinaus reguliert die Interaktion von endothelialelem EphrinB2 mit EphB4 auf der Oberfläche von Monozyten die Adhäsion und Transmigration der Monozyten [84] und könnte somit Einfluss auf die Tumor-assoziierte Entzündung nehmen.

Zusammenfassend betrachtet verdeutlicht Kapitel 1.3 die sehr kontroverse Diskussion der Wirkung von Eph-Rezeptoren und Ephrinen, insbesondere bei der Tumorentstehung und -progression (siehe **Tabelle 1-1**). Aufgrund dessen lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine allgemein gültige Aussage treffen, ob ein Eph-Rezeptor oder eine Ephrin pro- oder antitumorigen wirkt. Da es sowohl in der Klasse A als auch in der Klasse B einen Kinase-defizienten Eph-Rezeptor (EphA10, EphB6) gibt, lässt sich vermuten, dass diese zur Komplexität der Eph-Ephrin-Interaktionen und der daraus resultierenden Effekte beitragen [45].

Tabelle 1-1: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf die Progression des malignen Melanoms und anderer Tumorentitäten

Protumorigene Wirkung	Antitumorigene Wirkung
EphB4	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Positive Korrelation zwischen EphB4-Proteinbiosynthese und Tumorprogression bei Gebärmutter-, Brust-, Ovarien-, Prostata-, Blase-, Mesothel-, Kolon- und Plattenepithel-Tumoren des Kopf-Hals-Bereich [56-63] ○ EphB4-Proteinbiosynthese verschiedener Melanom-Zelllinien korreliert mit deren Migrationsverhalten und Malignität [68] ○ SW1-Melanomzellen mit natürlich hoher EphB4-Proteinbiosynthese bilden größere Tumoren als C19-Melanomzellen mit wenig EphB4 [69] ○ Nach Überexpression von EphB4 bilden C19-Melanomzellen ebenso große Tumoren wie SW1-Zellen [69] 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Negative Korrelation zwischen EphB4-Proteinbiosynthese und Tumorprogression bei Tumoren von Brust und Kolon [64-66] ○ EphB4-überexprimierende B16-Zellen bilden <i>in vivo</i> kleinere Tumoren mit signifikant reduzierter Gefäßdichte (Apoptose EphrinB2-positiver, arterieller Endothelzellen) [67] ○ Herunterregulierung der natürlichen EphB4-Expression in B16-Zellen führt zu größeren Tumoren [67]
EphB6	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Positive Korrelation zwischen sEphB6-Expression und Tumorprogression beim Astrozytom, Glioblastom und Gliosarkom [79, 80]. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Negative Korrelation zwischen EphB6-Expression und Tumorprogression bei Brust-Tumoren, Neuroblastom, nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom und Melanom (vollständiger Verlust von EphB6 in Melanom-Metastasen) [75, 76]
EphrinB2	
<ul style="list-style-type: none"> ○ Höchste EphrinB2-Proteinsynthese in Tumor- und Endothelzellen der invasiven Front des sich ausbreitenden, primären Melanoms identifiziert [82, 83]. ○ Interaktion zwischen EphB4-exprimierenden Tumorzellen und EphrinB2 auf der Oberfläche von Endothelzellen trägt zur Organ-spezifischen Metastasierung von Melanomzellen bei [70] 	

1.4 Zielstellung

Das maligne Melanom stellt aufgrund seiner frühen Metastasierung und der damit einhergehenden Resistenz gegenüber den bisher bekannten Therapiemöglichkeiten eine der aggressivsten Tumorentitäten dar. Aufgrund dessen sind neue Strategien zur Früherkennung und Therapie des malignen Melanoms dringend notwendig. Hierfür ist es erforderlich, die Proteine und Signalmoleküle, die zur Metastasierung der Melanomzellen und zur Resistenz dieser gegenüber chemo- und strahlentherapeutischen Maßnahmen führen, zu identifizieren.

Die Interaktion von Melanomzellen mit Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen des Tumorstromas ist ein wichtiger Einflussfaktor auf die Tumorprogression und die damit verbundene Sterblichkeitsrate der Patienten. Bisher sind die molekularen Mechanismen, die der Interaktion dieser Zellen zugrunde liegen, jedoch nur unzureichend geklärt.

Die Proteinbiosynthese von Eph-Rezeptoren und deren Ephrin-Liganden unterliegt bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen, so auch beim malignen Melanom, einer teils starken Regulation. Dabei kann das Fortschreiten einer Tumorerkrankung je nach Tumorentität sowohl mit einer erhöhten als auch mit einer verminderten Proteinbiosynthese einhergehen. Aufgrund dessen stellen Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden potentielle Zielmoleküle für die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen, wie dem malignen Melanom, dar.

Ausgehend von diesem Hintergrund wird folgende Hypothese formuliert:

Die Eph-Ephrin-vermittelte Interaktion von Melanomzellen und Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen beeinflusst die Progression und Metastasierung des malignen Melanoms. Dabei fördert die Rezeptor-Tyrosinkinase EphB4 im Zusammenspiel mit ihrem Liganden EphrinB2 die Progression und Metastasierung des malignen Melanoms, während der Kinase-defiziente Rezeptor EphB6, welcher ebenfalls zur Bindung von EphrinB2 fähig ist, als negativer Regulator fungiert und daher möglicherweise antitumorigen wirkt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von EphB4, EphB6 und deren Ligand EphrinB2 bei der Interaktion von Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen, insbesondere von TAM, mit Melanomzellen zu charakterisieren.

Des Weiteren sollte ein bisher in der Literatur nicht beschriebener EphB4-Kinase-Inhibitor, der nach der Radiomarkierung mit ^{18}F einen potentiellen Radiotracer zur Bildgebung mittels PET darstellt, hinsichtlich seiner biologischen und

radiopharmakologischen Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* beurteilt werden. Darüber hinaus sollten die löslichen, extrazellulären Domänen von EphB4, EphB6 und EphrinB2 generiert werden, um deren Eignung als Radiotracer für die In-vivo-Bildgebung des Eph-Ephrin-Systems prüfen zu können.

Daraus ergaben sich folgende konkrete Fragestellungen:

- Wie stark wird EphB4, EphB6 und EphrinB2 von Melanomzellen und inflammatorischen Zellen exprimiert bzw. synthetisiert?
- Beeinflusst die Interaktion von Melanomzellen mit TAM Metastasierungs-relevante Eigenschaften der Melanomzellen, wie z.B. Adhäsion und Migration, und die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6?
- Beeinflussen EphB4, EphB6 oder EphrinB2 die Metastasierungs-relevanten Eigenschaften der Melanomzellen und die IL-6-Sekretion? Welchen Einfluss hat die Kokultur mit Makrophagen darauf?
- Beeinflusst EphB4 das Wachstum und die Vaskularisierung von Melanom-Tumoren im A375-Tumor-Xenograft-Modell?
- Ermöglicht der Einsatz eines ^{18}F -radiomarkierten EphB4-Kinase-Inhibitors die funktionelle Bildgebung einer erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese in Tumoren mittels PET?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Eukaryotische Zellen

	Ursprung	Zellkulturmedium
THP-1	Junge (1 Jahr) mit akuter monozytischer Leukämie [85]	RPMI
HL-60	Frau (36 Jahre) mit akuter promyelozytischer Leukämie [86]	DMEM
Mel-Juso	Frau (58 Jahre) mit malignem Melanom (Primärtumor) [87]	DMEM
A375	Frau (54 Jahre) mit malignem Melanom (Primärtumor) [88]	DMEM
A2058	Mann (43 Jahre) mit malignem Melanom (Hirn-Metastase) [89]	DMEM
COS-7	Grüne Meerkatze (Fibroblasten der Niere) [90]	DMEM

2.1.2 Prokaryotische Zellen

	Firma	Zellkulturmedium
<i>E.coli</i> K12 Top10	Invitrogen, Karlsruhe	LB-Medium
<i>E.coli</i> K12 DH5 α	Invitrogen, Karlsruhe	LB-Medium

2.1.3 Versuchstiere

	Firma
NMRI (<i>nu/nu</i>)-Maus (Nacktmaus)	Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden
Wistar-Ratte	Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon

2.1.4 Plasmide

	Firma	Resistenz
pOTB7-EphB4	ImaGenes GmbH, Berlin	Chloramphenicol
pCR-BluntII-TOPO-EphB6	ImaGenes GmbH, Berlin	Kanamycin, Zeocin™
pCR4-TOPO-EphrinB2	ImaGenes GmbH, Berlin	Kanamycin, Ampicillin
pCR4-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe	Kanamycin, Ampicillin
pSecTag2B	Invitrogen, Karlsruhe	Ampicillin, Zeocin™
pIRES2-AcGFP1	Clontech, Mountain View (USA)	Kanamycin, Neomycin

2.1.5 Kits

	Firma
Amaya® Cell Line Nucleofector® Kit V	Lonza Cologne AG, Köln
BCA-Protein-Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)
FastPlasmid™ Mini Kit	5Prime GmbH, Hamburg
GelElute Extraction Kit	5Prime GmbH, Hamburg
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe
VenorGeM®-Mykoplasmen-Detektionskit	Minerva Biolabs, Berlin

2.1.6 Antikörper

Name und Bestellnummer	Firma
<i>primäre Antikörper</i>	
Kaninchen anti-CD31 (ab28364)	Abcam, Cambridge (UK)
Maus anti-CD45-PE (130-080-201)	Milteny Biotec, Auburn (USA)
Maus anti-Melanom (MCSP)-PE/-APC (130-091-225/ -252)	Milteny Biotec, Auburn (USA)
Maus anti-EphB4 (37-1800)	Invitrogen, Darmstadt
Ziege anti-EphB4 (AF3038)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Kaninchen anti-EphB4 (H-200, sc-5536)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen anti-EphB6 (H-90, sc-25461)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ziege anti-EphB6 (N-19, sc-7282)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Ziege anti-EphrinB2 (C-20, sc-19227)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen anti-EphrinB2 (H-83, sc-15397)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen anti-EphrinB2 (P-20, sc-1010)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen anti-EphrinB2 (NBP1-48551)	Novus Biologicals, Cambridge (UK)
Kaninchen anti-Aktin (A5060)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Maus anti-β-Aktin (A5316)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<i>sekundäre Antikörper</i>	
Ziege anti-Kaninchen IgG-Peroxidase (A0545)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kaninchen anti-Ziege IgG-Peroxidase (A5420)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kaninchen anti-Maus IgG-Peroxidase (A9044)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

	Firma
Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glas-Objektträger SuperFrost®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glas-Objektträger mit Polystyrol-8-Kammer-Aufsatz	BD Biosciences, Bedford (USA)
HiTrap™ Desalting-Säule	GE Healthcare, München
HisTrap™ FF crude-Säule	GE Healthcare, München
Klonierungszylinder	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Insulinspritze DISPOMED® U-100	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Einfrierröhrchen Cryo.s™ 1 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellfilter (40 µm) für 50 ml-Röhrchen	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
MaxiSorp™ 96well-Platten	Nunc, Langenselbold
MS-Säule	Milteny Biotec, Auburn (USA)
Nitrozellulosemembran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Rotilabo®-Spritzenfilter (PVDF; 0,22 µm bzw. 0,45 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Superdex™ 75 10/300 GL-Gelfiltrationssäule	GE Healthcare, München
ThinCert™ Zellkultureinsatz	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Vivaspin-6-Zentrifugalkonzentratoren	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturflaschen 25/75/175 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatten 6/12/24/96well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen 10 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.8 Chemikalien, Medien und Enzyme

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) und VWR International GmbH (Darmstadt) bezogen.

	Firma
Agarose UltraPure	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Ammoniumpersulfat (APS)	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Bisbenzimid Hoechst 33342	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
BSA (10-prozentige Lösung für ELISA)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Calcein AM	BD Biosciences, Bedford (USA)
Carboxymethylcellulose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Casy-Ton	Schärfe-System GmbH, Reutlingen
Coomassie Brilliantblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DNA Polymerase I, Klenow-Fragment	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
DNase I	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
dNTP	5Prime GmbH, Hamburg
<i>Dulbecco's modified Eagle-Medium</i> (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
<i>Easy A® High Fidelity PCR Cloning-Enzym</i>	Agilent Technologies, Böblingen
EcoRI-HF (20.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Elektrolyt-Infusionslösung 153	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Ethanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Eosin B	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Geneticin (G418)	Biochrom AG, Berlin
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylin-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt
HincII (10.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
HindIII (20.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Immunglobulin G (IgG, human)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Kanamycin-Sulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kochsalzlösung, isotonische	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Leupeptin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Lipofectamin™ und Plus-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	J. M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG, Obergünzburg

Matrigel™	BD Biosciences, Bedford (USA)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Metafecten® Pro	Biontex, Martinsried/Planegg
Methylbenzoat	Merck KGaA, Darmstadt
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Mol bio grade-Wasser	5Prime GmbH, Hamburg
Natriumazid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumdesoxycholat	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
NEB-Puffer 1-4	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
NiCl ₂ -Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nonidet™ P 40 Substitut	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
NotI (10.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
O'GeneRuler™DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Paraffin (42-44°C)	VWR International GmbH, Darmstadt
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Paraffin (58-60°C)	VWR International GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin-Gemisch (PenStrep)	Biochrom AG, Berlin
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	VWR International GmbH, Darmstadt
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (10×) pH 7,4 ohne CaCl ₂ und MgCl ₂	Biochrom AG, Berlin
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Proteinstandard BSA 400 µg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
PstI (20.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Qiazol-Lyse- Reagenz	Qiagen, Hilden
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Roti®-Histokitt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamidlösung 30% (w/v))	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i> -Medium (RPMI)	Biochrom AG, Berlin
Sbfl-HF (20.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Suprane (Wirkstoff: Desfluran)	Baxter Deutschland GmbH, Heidelberg
T4-DNA-Ligase (400.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris PUFFERAN®)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim
Trypsin (0,5%)/ EDTA (0,2%) Lösung (10×) in 10× PBS ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin
TurboFect™	Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Tween 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Verapamil	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30%)	Merck KGaA, Darmstadt
Xhol (20.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Xylencyanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zell Shield™	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Zeocin™	InvivoGen, San Diego (USA)

2.1.9 Puffer und Lösungen

Zusammensetzung	
Bindungspuffer für Ni ²⁺ -NTA-Matrix (pH 8,0)	500 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄ 5 mM Imidazol 0,003% Natriumazid (w/v) in bidestilliertem Wasser <u>frisch dazu:</u> 10 µg/ml Leupeptin 1 mM PMSF
Blockpuffer Western Blot	5% Magermilchpulver (w/v) 0,05% Tween-20 in TBS
Blockpuffer Immunhistochemie	2% BSA (w/v) 0,3% Magermilchpulver (w/v) 0,1% Gelatine (w/v) 0,05% Tween 20 (v/v) in TBS (pH 7,4)
Carboxymethylcellulose	5% in bidestilliertem Wasser (w/v)
Coomassie-Färbelösung	50% Methanol (v/v) 10% Eisessig (v/v) 0,1% Coomassie Brilliantblau (G250) (w/v) in bidestilliertem Wasser
Coomassie-Entfärbelösung I	50% Methanol (v/v) 10% Eisessig (v/v) in bidestilliertem Wasser
Coomassie-Entfärbelösung II	10% Methanol (v/v) 5% Eisessig (v/v) in bidestilliertem Wasser

DAB-Färbelösung	0,4 mg/ml DAB 0,015% H ₂ O ₂ (v/v) in TBS (pH 7,4)
Einfriermedium	10% DMSO (v/v) in FKS
Elutionspuffer für Ni ²⁺ -NTA-Matrix (pH 8,0)	500 mM NaCl 20 mM NaH ₂ PO ₄ 100 mM Imidazol 0,003% Natriumazid (w/v) in bidestilliertem Wasser <u>frisch dazu:</u> 10 µg/ml Leupeptin 1 mM PMSF
Ethidiumbromidfärbelösung	0,25% Ethidiumbromid in bidestilliertem Wasser
Kristallviolett-Färbelösung	20% Methanol (v/v) 0,5% Kristallviolett (w/v)
Ladepuffer für Agarose-Gele (6 ×)	50% Glycerol 0,2% Xylencyanol 0,2% Bromphenolblau 2 mM Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O in bidestilliertem Wasser
LB-Medium (pH 7,4)	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl in bidestilliertem Wasser, autoklavieren
Lysepuffer für pEphB4-ELISA	137 mM NaCl 20 mM Tris 2 mM EDTA 10% Glycerol (v/v) 1% Nonidet™ P 40 Substitut (v/v) in bidestilliertem Wasser (pH 8,0) <u>frisch dazu:</u> 10 µg/ml Leupeptin 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM PMSF
Lysepuffer (RIPA)	150 mM NaCl 50 mM Tris 1% Triton X-100 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS in bidestilliertem Wasser (pH 8,0) <u>frisch dazu:</u> 100 µg/ml PMSF 2 µg/ml Leupeptin 10 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM DTT
MACS-Puffer	2 mM EDTA 0,5% BSA in PBS
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS, steril filtrieren
NaOH-SDS	0,1 M NaOH 1% SDS in bidestilliertem Wasser

NiCl ₂ -Lösung für Ni ²⁺ -NTA-Matrix	100 mM NiCl ₂ in bidestilliertem Wasser
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in bidestilliertem Wasser
Probenpuffer für SDS-PAGE (5 ×)	312,5 mM Tris 50% Glycerol 25% β-Mercaptoethanol 10% SDS 0,05% Bromphenolblau in bidestilliertem Wasser
SDS-Blotpuffer	48,2 mM Tris 38,8 mM Glycerol 20% Methanol (v/v) 0,004% SDS (w/v) in bidestilliertem Wasser
SDS-Laufpuffer	192 mM Glycerol 25 mM Tris 0,1% SDS (w/v) in bidestilliertem Wasser
SOB-Medium (pH 6,7 - 7,0)	20 mM Glukose 10 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 2,5 mM KCl 2% Pepton 0,5% Hefeextrakt in bidestilliertem Wasser, steril filtrieren
Sortpuffer	2 mM EDTA 2% FKS in PBS
Stripping-Puffer für Western Blot (pH 6,7)	50 mM Tris 2% SDS (v/v) in bidestilliertem Wasser <u>frisch dazu:</u> 0,7% Mercaptoethanol
Stripping-Puffer für Ni ²⁺ -NTA-Agarose (pH 7,4)	50 mM EDTA 20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl in bidestilliertem Wasser
TAE-Puffer (pH 8,5)	40 mM Tris 1,3 mM EDTA 0,35 mM Eisessig in bidestilliertem Wasser
TB-Puffer (pH 6,7)	250 mM KCl 55 mM MnCl ₂ 15 mM CaCl ₂ 10 mM PIPES in bidestilliertem Wasser
TBS-T	0,05% Tween 20 in TBS

Tris-Puffer (pH 9,5)	500 mM Tris in bidestilliertem Wasser
Trypsinneutralisator	10% FKS in PBS

2.1.10 Geräte

	Firma
Aktivimeter Isomed 2000	Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH, Dresden
Äkta-System P-900, INV-907, Frac-950, pH/C-300, UV-900	GE Healthcare Life Science, München
Analysenwaage LA 230S	Sartorius AG, Göttingen
Brutschrank HeraCell	Heraeus/ Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
FACSAria™ II	BD Biosciences, Bedford (USA)
FACSCalibur	BD Biosciences, Bedford (USA)
Folienschweißgerät Severin Folio	SEVERIN Elektrogeräte GmbH, Sundern
Gamma-Radioaktivitätszähler Cobra II	Canberra-Packard GmbH, Dreieich
Gamma-Radioaktivitätszähler Wizard™3"	PerkinElmer, Waltham (USA)
Kryostat Leica CM 1850	Leica, Wetzlar
Kryotom Leica Jung Cryopolyt	Leica, Wetzlar
Gelelektrophoresekammer mit Stromversorgung	BioRad, München
Gelelektrophoresekammer Multiphor II	Amersham Biosciences, Buckinghamshire (UK)
Geldokumentationssystem GeneFlash mit Pulnix Kamera 8-48 mm	Syngene Bio Imaging, Cambridge (UK)
Hybridisierungsofen 6/12 V	UniEquip GmbH, Martinsried
Inkubationsschüttler MaxQ 4000	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Inkubator Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Inkubator Hera Cell	Hera Cell, Niederwiesa
In-vivo-Imaging-System FX PRO	Carestream, Woodbridge (USA)
Kleintier-MRT BioSpec 70/30 (7 T)	Bruker, Ettlingen
Kleintier-PET Primate P4	Siemens (USA)
Lyophilisator	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
Sublimator 400	Zirbus Technologie GmbH, Bad Grund/Harz
Mikroskop AxioImager.A1	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop AxioVert 40 CFL	Carl Zeiss, Jena
Mikrom HM 340 E mit Ausgießstation und Kühleinheit Mikrom EC 350-1/2	MICROM International GmbH, Walldorf
MiniMACS™ Separator	Milteny Biotec, Auburn (USA)
Nalgene™Cryo 1°C-Einfriergefäß	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Nucleofector® I	Lonza Cologne AG, Köln
OctoMACS™ Separator	Milteny Biotec, Auburn (USA)

Spritzenpumpe Modell 11	Harvard Apparatus, Holliston (USA)
Sterilbank Steril Gard II A/B3	Baker Company, Sanford (USA)
pH-Meter 827 pH Lab	Metrohm AG, Herisau (Schweiz)
Photometer Bio	Eppendorf, Hamburg-Eppendorf
Photometer Synergy HT	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Pipettierhilfe Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences AG, Zizers (Schweiz)
Radioluminographie-Scanner BAS 5000	Fujifilm Europe, Düsseldorf
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg-Eppendorf
Thermozykler MJ Research PTC-200	Global Medical Instrumentation, Ramsey (USA)
Thermozykler Realplex ²	Eppendorf, Hamburg-Eppendorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg-Eppendorf
TissueLyser	Qiagen, Hilden
Ultraschallbad Sonorex RK 100	Bandelin Electronic, Berlin
Ultraschallstab UW 2200	Bandelin Electronic, Berlin
Vortexer IKA® Vortex Genius 3	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zellzählgerät CASY® Modell TT	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus/ Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung aus Zellen

Zur Isolierung der zellulären RNA wurden adhärenente Zellen in 6well-Platten kultiviert und Suspensionszellen aus dem entsprechenden Kulturgefäß in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Alle Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 700 µl Qiazol-Lyse-Reagenz lysiert. Die Isolierung der zellulären RNA erfolgte mit Hilfe des miRNeasy Mini-Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben. Abschließend wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA-Lösung wurde die optische Dichte bei 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) photometrisch bestimmt. Die OD_{260} gibt Auskunft über die Nukleinsäurekonzentration, wobei eine $OD_{260} = 1$ 40 µg/ml RNA, 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNA entspricht. Die Bestimmung der OD_{280} erlaubt eine Aussage über mögliche Kontaminationen mit Proteinen, da aromatische Aminosäurereste in Proteinen ein Absorptionsmaximum von 280 nm aufweisen. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} beträgt für reine RNA-Lösungen 2, für reine DNA-Lösungen 1,8 und sinkt jeweils mit zunehmender Kontamination durch Proteine. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -70°C .

2.2.2 DNase-Behandlung

Mögliche genomische DNA-Kontaminationen in den RNA-Proben wurden durch eine 30-minütige Inkubation mit DNase I (2 Einheiten (U)/2 µg RNA in 20 µl Reaktionspuffer) bei 37°C eliminiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl einer 25 mM EDTA-Lösung und eine 10-minütige Inkubation bei 65°C gestoppt. Nach der DNase-Behandlung wurde die RNA-Konzentration und -Reinheit erneut durch die photometrische Bestimmung der OD_{260} und OD_{280} ermittelt.

2.2.3 Quantitative Echtzeit RT-PCR (qRT-PCR)

Die relative Quantifizierung der mRNA-Konzentration für EphB4 (NM_004444), EphB6 (NM_004445) und EphrinB2 (NM_004093) im Vergleich zum Referenzgen β -Aktin (NM_001101) erfolgte mit Hilfe des QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit (Qiagen). Dabei wurde die mRNA in einer Einschritt-Reaktion mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben und diese unter Verwendung der in **Tabelle 2-1** dargestellten Primer in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt.

Die Sequenzen für alle in diesem und den folgenden Kapiteln beschriebenen Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) und den vom Nationalen Zentrum für Biotechnologie-Informationen veröffentlichten mRNA-Sequenzen für die oben genannten Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/>) ermittelt. Um eine Amplifikation genomischer DNA auszuschließen, wurden die Primer so gewählt, dass sich die komplementären Basen der verwendeten Vorwärts (Fwd-) und Rückwärts (Rev-)Primer auf zwei verschiedenen Exons des jeweiligen Gens befanden, das heißt Intron-überspannend waren. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Metabion GmbH (Martinsried).

Tabelle 2-1: Sequenz, Schmelztemperatur (T_m) und erwartete Produktgröße der für die qRT-PCR verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	T_m	Produkt
h β -Aktin Fwd	GGAAGTTCGACAACAAGTCC	60°C	214 bp
h β -Aktin Rev	TTCAGCAAGAGGACCACCAGCGT	60°C	
h EphB4 Fwd	GACTTTCGAGCAAGAGATGG	58°C	200 bp
h EphB4 Rev	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	58°C	
h EphB6 Fwd	GTTCTGGACGACCAGCGACG	60°C	408 bp
h EphB6 Rev	GACGTTTCAGTTGCAGTCCAG	60°C	
h EphrinB2 Fwd	GGAAGAAGTTCGACAACAAGTCC	58°C	182 bp
h EphrinB2 Rev	TTCAGCAAGAGGACCACCAGCGT	58°C	

Die qRT-PCR wurde mit Hilfe des QuantiTect® SYBR® Green RT-PCR Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei 100 ng RNA mit jeweils 1 μ l Fwd- und 1 μ l Rev-Primer (10 μ M) sowie 0,15 μ l QuantiTect in 20 μ l Reaktionspuffer nach dem in **Tabelle 2-2** beschriebenen Temperaturprogramm inkubiert wurden. Die DNA-Amplifikation wurde durch die Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR® Green I in die entstehende DNA-Doppelhelix quantifiziert. Mit Hilfe der Software realplex 1.5 (Eppendorf) wurde der sogenannte Schwellenwert-Zyklus (Ct) für das jeweilige Zielgen (EphB4, EphB6 oder EphrinB2) und das Referenzgen β -Aktin ermittelt. Diese fließen in die Berechnung der relativen mRNA-Expression nach **Gleichung 1** ein.

$$\text{relative mRNA-Expression} = 2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$$

(1)

Tabelle 2-2: Temperaturprogramm zur Durchführung der qRT-PCR

Reaktionsschritt		Zeit	Temperatur
Reverse Transkription		30 min	50°C
Initiale Denaturierung		15 min	95°C
40 PCR-Zyklen	Denaturierung	15 s	95°C
	Primer-Hybridisierung	30 s	T_m
	Primer-Elongation	30 s	72°C
Schmelzkurvenanalyse	Schmelzpunktbestimmung	15 s	55°C
		20 min	55°C → 95°C
		15 s	95°C
Kühlung		bis Ende	4°C

2.2.4 Klonierung von humanem EphB4, EphB6 und EphrinB2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1

2.2.4.1 Prinzip

Zur Generierung von A375-Melanomzellen mit einer erhöhten EphB4-, EphB6- oder EphrinB2-mRNA-Expression und -Proteinbiosynthese wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen, wie in **Abbildung 2-1** gezeigt, in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1 kloniert. Neben dem Plasmid-Replikationsursprung (pUC ori) und dem Zytomegalievirus (CMV)-Promotor (P_{CMV}) verfügt der pIRES2-AcGFP1-Vektor über die Sequenz für eine interne, ribosomale Eintrittsstellen (IRES). Diese führt zur polycistronischen Expression der mRNA für das eingefügte Eph bzw. Ephrin und das vom Plasmid codierte, grün fluoreszierende Protein AcGFP1. Die cDNA-Sequenzen für EphB4, EphB6 und EphrinB2 wurden mit Hilfe geeigneter Restriktionsendonukleasen aus kommerziell erhältlichen Plasmiden freigesetzt und zum Teil, wie im Folgenden ausführlicher beschrieben, modifiziert. Parallel dazu wurde der Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1 mit EcoRI hydrolysiert und ebenfalls modifiziert, so dass die Eph- bzw. Ephrin-cDNA und der Vektor im Anschluss ligiert werden konnten. Die entstandenen Plasmide wurden im weiteren Verlauf zur Transfektion von A375-Zellen verwendet.

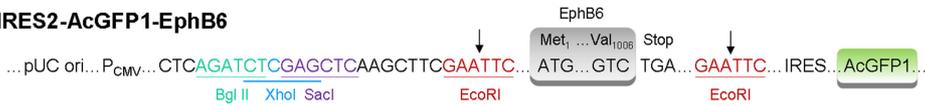
pIRES2-AcGFP1**pIRES2-AcGFP1-EphB4****pIRES2-AcGFP1-EphB6****pIRES2-AcGFP1-EphrinB2**

Abbildung 2-1: Klonierung von humanem EphB4, EphB6 und EphrinB2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pIRES2-AcGFP1 Gezeigt sind Ausschnitte der Plasmide mit den wichtigsten Eigenschaften, wie dem pUC ori, dem P_{CMV} und der IRES-Sequenz. An der mit einem Pfeil gekennzeichneten Stelle kommt es zur Restriktionshydrolyse durch EcoRI, was die Ligation des pIRES2-AcGFP1-Vektors mit der cDNA für EphB4, EphB6 bzw. EphrinB2 ermöglicht.

2.2.4.2 Restriktionshydrolyse

Die für EphB4, EphB6 und EphrinB2 codierende cDNA besteht aus etwa 3000 bp (EphB4, EphB6) bzw. 1000 bp (EphrinB2). Da jede DNA-Polymerase mit einer bestimmten Fehlerrate arbeitet, ist die Wahrscheinlichkeit relativ groß, dass es bei der Gewinnung der cDNA für die Eph-Rezeptoren mittels PCR zu Mutationen in der Eph-codierenden Sequenz kommt. Aufgrund dessen wurden die kommerziell erhältlichen Vektoren pOTB7-EphB4, pCR-BluntII-TOPO-EphB6 und pCR4-TOPO-EphrinB2 als Ausgangsmaterial für die Klonierung verwendet. Die in **Abbildung 2-2** dargestellten Ausgangsvektoren und der Zielvektor pIRES2-AcGFP1 wurden mit Hilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB) hydrolysiert (pOTB7-EphB4: EcoRI, NotI und SbfI; pCR-BluntII-TOPO-EphB6: EcoRI und HincII; pCR4-TOPO-EphrinB2: PstI und NotI; pIRES2-AcGFP1: EcoRI).

In einem 20 µl-Ansatz wurden 1 µg (Kontroll-Restriktionshydrolyse) bzw. 10 µg (Restriktionshydrolyse für Klonierung) Plasmid-DNA mit 2 µl 10-fach konzentriertem Restriktionspuffer (Enzym-abhängig NEB-Puffer 1-4), 2 µl 10-prozentiger Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung und 0,4 µl (Kontroll-Restriktionshydrolyse) bzw. 2 µl (Restriktionshydrolyse für Klonierung) Restriktionsenzym bei 37°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Restriktionsenzyme durch eine 20-minütige Inkubation des Restriktionsansatzes bei 65°C inaktiviert.

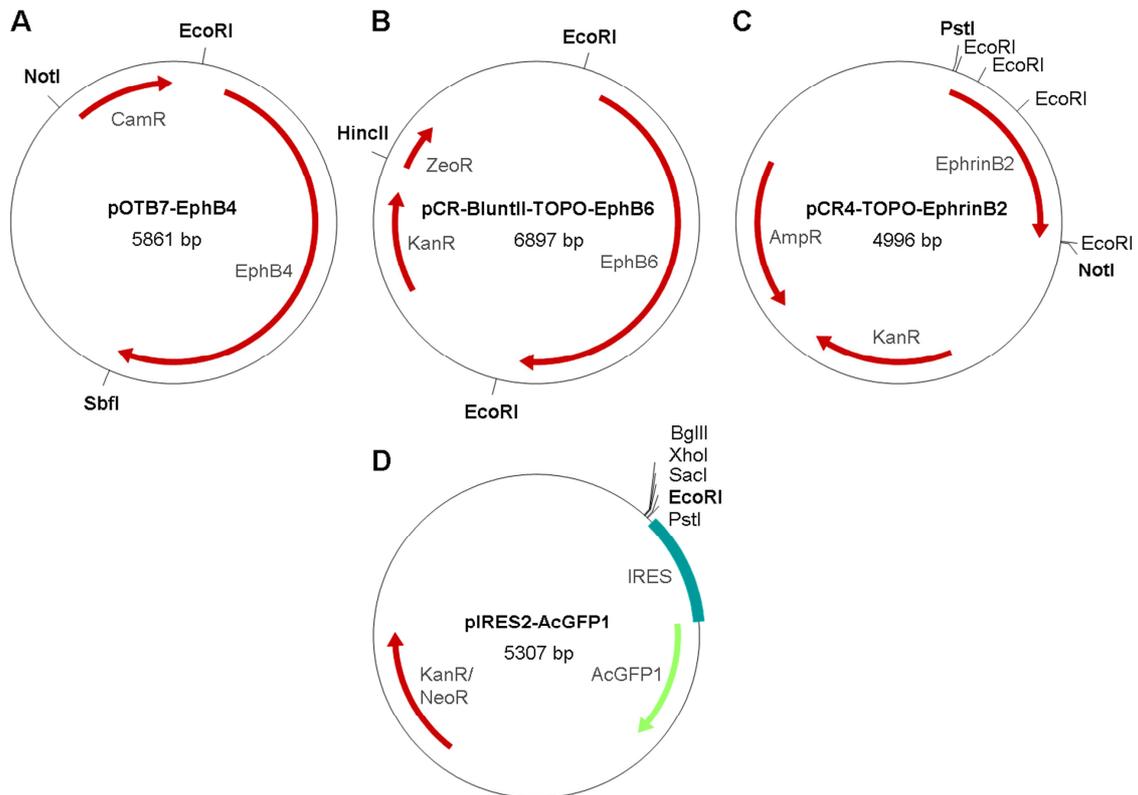


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Ausgangsvektoren pOTB7-EphB4 (A), pCR-BIuntII-TOPO-EphB6 (B) und pCR4-TOPO-EphrinB2 (C) sowie des Zielvektors pIRES2-AcGFP1 (D) Dargestellt sind die in den Vektoren enthaltenen Gene für EphB4, EphB6, EphrinB2 und für die Resistenz gegenüber Chloramphenicol (CamR), Zeocin™ (ZeoR), Kanamycin (KanR), Ampicillin (AmpR) sowie Neomycin (NeoR). Darüber hinaus sind für die Klonierung wichtige Restriktionsendonuklease-Schnittstellen und die IRES-Sequenz gekennzeichnet.

2.2.4.3 Dephosphorylierung und Glättung der cDNA mittels Alkalischer Phosphatase und Klenow-Fragment

Um eine Ligation des EcoRI-hydrolysierten pIRES2-AcGFP1 mit sich selbst zu verhindern, wurden dessen Enden mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurde 1 µl intestinale Kälberphosphatase (CIP, 10 U/µl) direkt zu 20 µl Restriktionansatz gegeben und dieser 1 h bei 37°C inkubiert. Aufgrund der Eigenschaften der CIP war eine anschließende Hitze-Inaktivierung des Enzyms nicht möglich.

Da EphrinB2 selbst EcoRI-Schnittstellen enthält und der pOTB7-EphB4-Vektor am Ende der multiplen Klonierungsstelle keine EcoRI-Schnittstelle aufweist, konnten die Ausgangsvektoren pCR4-TOPO-EphrinB2 und pOTB7-EphB4 nicht bzw. nicht an beiden Enden der Eph- bzw. Ephrin-codierenden Sequenz mit EcoRI hydrolysiert werden (**Abbildung 2-2**). Aufgrund dessen wurden die überhängenden Enden der cDNA für EphB4, EphrinB2 und pIRES2-AcGFP1 zunächst mit Hilfe des Klenow-

Fragments geglättet und anschließend ligiert (*Blunt End-Ligation*). Das Klenow-Fragment ist das große Fragment der DNA Polymerase I und verfügt über eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität, jedoch nicht über eine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität. Dies führt dazu, dass in DNA-Doppelsträngen 5'-Überhänge mit komplementären Basen versehen werden, während die Basen von 3'-Überhängen entfernt werden. Für die Glättung der überhängenden Enden der EphB4-, EphrinB2- und pIRES2-AcGFP1-cDNA wurden 0,2 µl Klenow-Fragment (5 U/µl) sowie 0,5 µl eines Gemisches aus Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP, 10 mM) direkt zu 20 µl Restriktionsansatz gegeben und dieser für 15 min bei 25°C inkubiert. Die Inaktivierung des Klenow-Fragmentes erfolgte durch Zugabe von 2 µl einer 100 mM EDTA-Lösung und Inkubation für 20 min bei 75°C.

Im Gegensatz zu den Ausgangsvektoren pOTB7-EphB4 und pCR4-TOPO-EphrinB2 konnte der pCR-BluntII-TOPO-EphB6-Vektor an beiden Enden der EphB6-codierenden Sequenz mit EcoRI hydrolysiert werden. Aufgrund dessen war eine Ligation mit dem ebenfalls EcoRI-hydrolysierten Zielvektor pIRES2-AcGFP1 ohne vorherige Modifikation der cDNA möglich (*Sticky End-Ligation*).

2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die unveränderten bzw. mittels CIP oder Klenow-Fragment modifizierten Restriktionsansätze wurden mit sechsfach konzentriertem Ladepuffer versetzt und in einem 0,8-prozentigen Agarose-Gel bei 120 V aufgetrennt. Die Detektion der DNA erfolgte durch mindestens 15-minütiges Schütteln des Agarosegels in einer Ethidiumbromidfärbelösung und die anschließende Visualisierung unter UV-Licht im Geldokumentationssystem GeneFlash.

2.2.4.5 Gelextraktion

Die Reinigung der cDNA für EphB4, EphB6, EphrinB2 und pIRES2-AcGFP1 aus dem Agarose-Gel erfolgte mit dem *GelElute Extraction-Kit* (5Prime) nach Herstellerangaben. Die cDNA für EphB4, EphB6, EphrinB2 und pIRES2-AcGFP1 umfasste 3149, 3396, 1075 bzw. 5307 Basenpaare (bp). Die entsprechende DNA-Bande wurde, wie in **Abbildung 2-3 (A)** durch die Rahmen dargestellt, mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Die Probe wurde mit drei Äquivalenten Puffer und bei DNA-Fragmenten >4000 bp zusätzlich mit zwei Äquivalenten bidestilliertem Wasser versetzt. Nach Zugabe von 20-30 µl *GelElute Extraction-Suspension* (2 µl/µg DNA) wurde der Ansatz für 10 min bei 50°C geschüttelt, bis das Agarose-Gel vollständig gelöst war. Dabei kam es aufgrund der hohen Salzkonzentration im Puffer zur Adsorption der DNA an die in der *GelElute*

Extraction-Suspension enthaltenen Silicagel-Partikel. Letztere wurden zur Entfernung der Agarose- und Salzreste mit zwei Puffern gewaschen und getrocknet. Zur Desorption der DNA von den Silicagel-Partikeln wurden diese in 10 mM Tris-Cl (pH 8,5) resuspendiert, zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten cDNA wurde diese gelelektrophoretisch aufgetrennt (**Abbildung 2-3 (B)**). Aufgrund des bekannten Volumens des aufgetragenen DNA-Markers (O'GeneRuler™DNA Ladder Mix) und der darin enthaltenen DNA-Konzentration konnte die cDNA-Konzentration im jeweiligen Gelextrakt abgeschätzt werden.

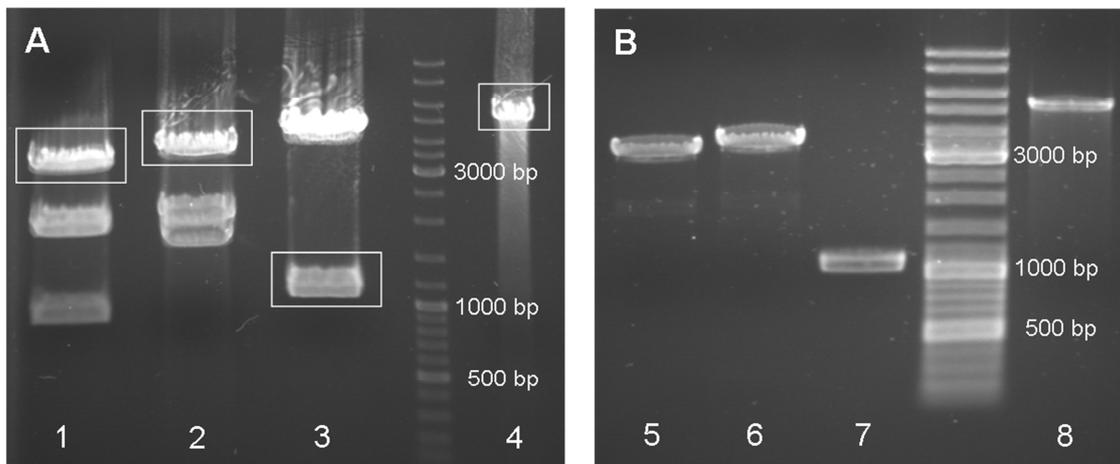


Abbildung 2-3: Gelelektrophoretische Auftrennung von pOTB7-EphB4 (1), pCR-BluntII-TOPO-EphB6 (2), pCR4-TOPO-EphrinB2 (3) und pIRES2-AcGFP1 (4) nach (A) Restriktionshydrolyse und (B) Gelextraktion der gewünschten cDNA für EphB4 (5), EphB6 (6), EphrinB2 (7) und pIRES2-AcGFP1 (8) Die Ausgangsplasmide wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen hydrolysiert, der Reaktionsansatz mit sechsfach konzentriertem Ladebuffer versetzt und bei 120 V in einem 0,8-prozentigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid detektiert und die im Rahmen dargestellte DNA-Bande, welche der cDNA für EphB4, EphB6 und EphrinB2 entspricht, aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mittels Gelextraktion gereinigt.

2.2.4.6 Ligation

Die Ligation der gereinigten cDNA für EphB4, EphB6 und EphrinB2 (im Folgenden als Insert bezeichnet) mit dem linearisierten, gereinigten pIRES2-AcGFP1-Vektor erfolgte unter Katalyse der T4-DNA-Ligase. Für die Ligation mit 25 ng Vektor wurde für *Blunt End*-Ligationen der drei- und für *Sticky End*-Ligationen der fünffache molare Überschuss an Insert eingesetzt. Die entsprechend einzusetzende Masse an Insert in ng wurde nach **Gleichung 2** berechnet. Die Reaktion erfolgte in einem 20 µl-Ansatz mit 2 µl 10-fach konzentriertem Ligasepuffer sowie 1 µl T4-DNA-Ligase (400.000 U/ml) für 2 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde die Ligase durch eine 10-minütige

Inkubation bei 65°C inaktiviert und der Ligationsansatz zur Transformation kompetenter *Escherichia coli* (*E.coli*)-Bakterien der Stämme K12 Top10 bzw. K12 DH5α genutzt.

$$\text{Masse Insert [ng]} = \text{Masse Vektor [ng]} \times \frac{\text{Basenzahl Insert}}{\text{Basenzahl Vektor}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} \quad (2)$$

2.2.4.7 Herstellung Transformations-kompetenter *E. coli*

Für die Herstellung Transformations-kompetenter *E.coli*-Bakterien wurde der gewünschte Bakterienstamm auf einer Agar-Platte ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und am darauffolgenden Tag eine Einzelkolonie ausgewählt. Diese wurde in 20 ml LB-Medium gegeben und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe dieser Vorkultur wurde eine Bakterienkultur in SOB-Medium hergestellt, die eine OD₆₀₀ von 0,2 hatte. Die Bakterien wurden nun bei 20°C bis 25°C vermehrt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatten. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Bakterien auf Eis wurden diese für 10 min bei 4°C und 2.500 × g zentrifugiert und in 64 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden wieder auf Eis gestellt, nach 10 min nochmals für 10 min bei 4°C und 2.500 × g zentrifugiert und in 15 ml kaltem TB-Puffer aufgenommen. Zu dieser Bakteriensuspension wurde auf Eis tropfenweise 1050 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) bis zu einer Endkonzentration von 7% (v/v) zugegeben. Anschließend wurden die Bakterien in Form von 200 µl-Aliquoten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

2.2.4.8 Transformation kompetenter *E. coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* der Stämme Top 10 und DH5α wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und 100 µl Bakteriensuspension mit 1 µl einer Plasmid-Mini- bzw. -Midi-Präparation oder mit 5-10 µl Ligationsansatz für 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C wurden die Bakterien auf Eis gestellt, mit 900 µl eiskaltem SOB-Medium versetzt und für 1,5 h bei 37°C und 600 Umdrehungen pro Minute (rpm) im Thermomixer geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle wurden am darauffolgenden Tag verschiedene Kanamycin-resistente (KanR) Klone von den LB-Agarplatten ausgewählt. Diese wurden für eine sich anschließende Plasmid-Isolierung über Nacht in 5 ml Kanamycin-haltigem LB-Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurde 1 ml der Bakterienkultur mit etwa 100 µl Glycerol vermischt und zur

dauerhaften Konservierung der Bakterien bei -70°C gelagert. Die restliche Bakterienkultur diente der Plasmid-Isolierung.

2.2.4.9 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von relativ geringen Mengen Plasmid-DNA, beispielsweise zur Sequenzierung, erfolgte mit Hilfe des FastPlasmid™ Mini Kit (5Prime) nach Herstellerangaben. Dazu wurden 5 ml Bakterienkultur zentrifugiert und das Bakterienpellet auf Eis lysiert. Zur Reinigung der Plasmid-DNA wurde das Lysat über eine im Kit enthaltene Säule gegeben, die gebundene DNA gewaschen und mit 50 μl Elutionspuffer (10 mM Tris-Cl + 0,1 mM EDTA, pH 8,5) eluiert. Sollte das Plasmid im Anschluss sequenziert werden, wurde bidestilliertes Wasser zur Elution verwendet. Die Sequenzierung der cDNA erfolgte durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) unter Verwendung Vektor-spezifischer Primer, welche durch die LGC Genomics GmbH bereitgestellt wurden.

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA, beispielsweise nach der erfolgreichen Sequenzierung eines Plasmids, wurde der Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden 100 ml Bakterienkultur pelletiert und auf Eis alkalisch lysiert. Alle unlöslichen Zellbestandteile wurden mittels Zentrifugation und Filtration abgetrennt. Anschließend wurde das Lysat auf eine zuvor äquilibrierte Harz-Säule gegeben, wobei es, basierend auf dem Prinzip der Anionenaustausch-Chromatographie, zur Interaktion von negativ geladenen Phosphatresten der Plasmid-DNA mit positiv geladenen Diethylammoniumethanol-Gruppen des Harzes kommt. Die Plasmid-DNA wurde zweimal gewaschen und mit 5 ml Puffer eluiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA im Eluat mit 3,5 ml Isopropanol präzipitiert, nach Zentrifugation mit 70-prozentigem Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und schließlich mit 100 μl Elutionspuffer (10 mM Tris-Cl + 1 mM EDTA, pH 8,0) eluiert. Die in **Abbildung 2-4** dargestellten, gereinigten Plasmide wurden nun zur Transfektion von eukaryotischen Zellen, wie z.B. A375-Melanomzellen, verwendet.

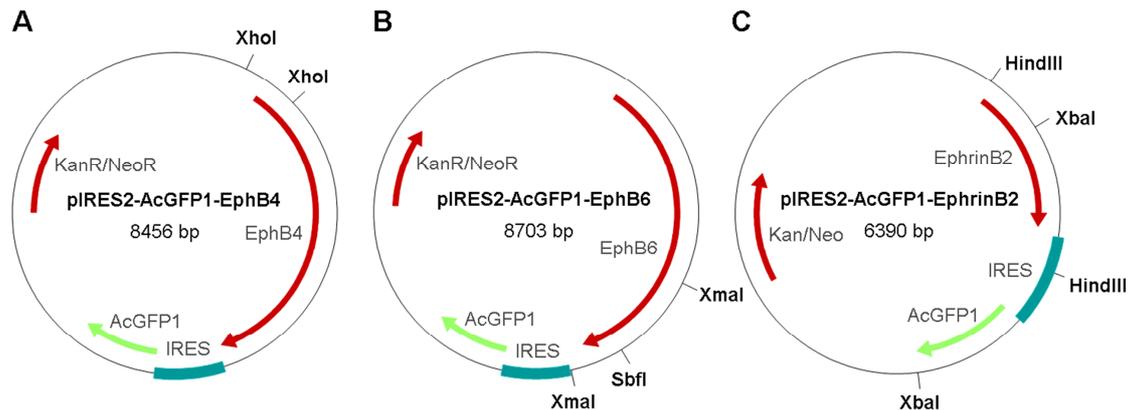


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der für die Transfektion von A375-Melanomzellen zur Verfügung stehenden Vektoren pIRES2-AcGFP1-EphB4 (A), pIRES2-AcGFP1-EphB6 (B) und pIRES2-AcGFP1-EphrinB2 (C) Dargestellt sind die in den Vektoren enthaltenen Gene für EphB4, EphB6 und EphrinB2 und für die Resistenz gegenüber Kanamycin (KanR) und Neomycin (NeoR). Darüber hinaus sind die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen, welche für die Kontroll-Restriktionshydrolyse verwendet wurden, sowie die IRES-Sequenz gekennzeichnet.

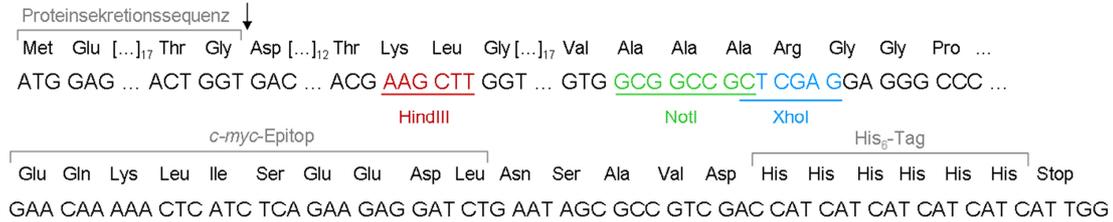
2.2.5 Klonierung von humanem sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2B

2.2.5.1 Prinzip

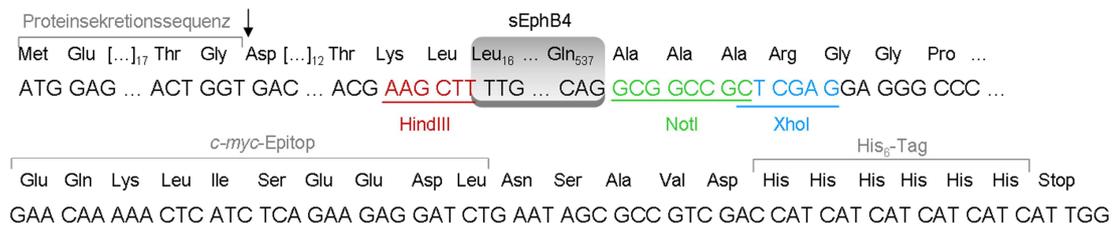
Zur Gewinnung der löslichen, extrazellulären Domänen von EphB4 (sEphB4, Leu₁₆ - Gln₅₃₇), von EphB6 (sEphB6, Leu₁₇ - Arg₅₇₇) und von EphrinB2 (sEphrinB2, Ala₂₃ - Glu₂₂₄) in Form rekombinanter Proteine wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen, wie in **Abbildung 2-5** dargestellt, in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2B kloniert. Da die extrazelluläre Domäne der Eph-Rezeptoren posttranslational glykosyliert wird und auch EphrinB2 potentielle Glykosylierungsstellen aufweist [53, 91, 92], wurde ein eukaryotisches Expressionssystem verwendet. Die murine *Ig κ* chain-V-J2-Signalpeptid-Sequenz des pSecTag2B-Vektors bewirkt die Sekretion der intrazellulär synthetisierten Proteine in den Zellkulturüberstand, was deren Abtrennung begünstigt. Darüber hinaus verfügen die rekombinanten Proteine über einen Hexahistidin (His₆)-Tag sowie einen Myc-Tag, die zur Reinigung und zum Nachweis der Proteine genutzt werden können. Die cDNA-Sequenzen für sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 wurden mittels PCR gewonnen und über eine TA-Klonierung in den pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen HindIII und NotI bzw. XhoI wurde die sEphB4-, sEphB6- bzw. sEphrinB2-cDNA anschließend wieder aus dem pCR4-TOPO-Vektor freigesetzt. Parallel dazu erfolgte die Hydrolyse des Expressionsvektor pSecTag2B mit den gleichen Restriktionsendonukleasen, so dass cDNA und Vektor im Anschluss ligiert

werden konnten. Die dabei entstandenen Plasmide wurden im weiteren Verlauf zur Transfektion von COS-7-Zellen verwendet.

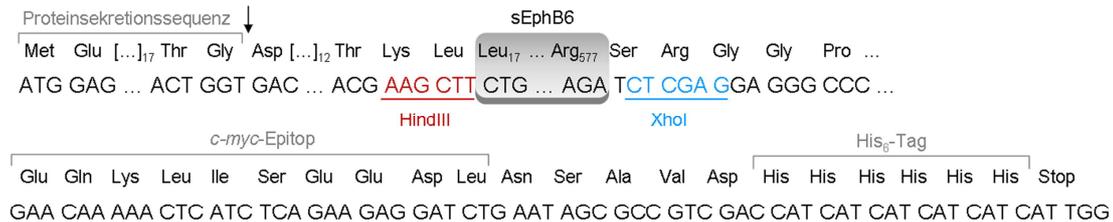
pSecTag2B



pSecTag2B-sEphB4



pSecTag2B-sEphB6



pSecTag2B-sEphrinB2

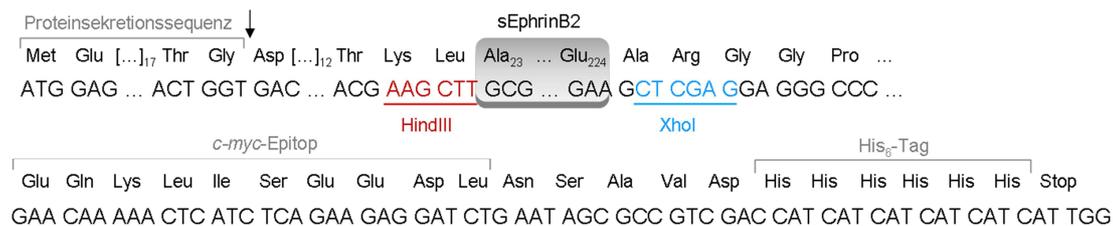


Abbildung 2-5: Klonierung von humanem sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2B Gezeigt sind Ausschnitte der Plasmide mit deren wichtigsten Eigenschaften. An der mit einem Pfeil gekennzeichneten Stelle kommt es zur Abspaltung des murinen *Ig κ chain-V-J2*-Signalpeptides und damit zur Freisetzung der rekombinanten, mit einem His₆-Tag ausgestatteten Proteine sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 in den Zellkulturüberstand.

2.2.5.2 PCR zur Gewinnung der cDNA für sEphrinB2, sEphB4 und sEphB6

Zur Gewinnung von rekombinantem sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 wurde die entsprechende cDNA mit Hilfe von Primern (siehe **Tabelle 2-3**), welche Schnittstellen für bestimmte Restriktionsendonukleasen enthielten, amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass das entstehende PCR-Produkt am 5'-Ende eine HindIII-Schnittstelle und am 3'-Ende eine XhoI- (sEphB4, sEphrinB2) bzw. NotI-Schnittstelle (sEphB6) aufwies. Als Ausgangsmaterial für die PCR diente eine Midi-Präparation der Plasmide pIRES2-AcGFP1-EphB4, -EphB6 bzw. -EphrinB2 (siehe 2.2.4.9). Da aufgrund der Länge der PCR-Produkte eine sehr geringe Fehlerrate der DNA-Polymerase-Reaktion erforderlich war und diese mit der *Taq* DNA-Polymerase nicht gewährleistet werden konnte, wurde die PCR mit Hilfe des *Easy A® High Fidelity PCR Cloning*-Enzyms durchgeführt. Genau wie die *Taq*-Polymerase generiert diese DNA-Polymerase, bedingt durch ihre terminale Transferaseaktivität, einen 3'-Desoxyadenosin-Überhang, was die TA-Klonierung des PCR-Produkts in den pCR4-TOPO-Vektor ermöglicht. Der linearisierte pCR4-TOPO-Vektor besitzt an seinen 5'-Enden einen Desoxythymidin-Überhang und ist darüber hinaus kovalent mit einer DNA-Topoisomerase verknüpft. Aufgrund dessen kommt es zur effizienten Ligation mit den PCR-Produkten, was man als TA-Klonierung bezeichnet [93]. Gleichzeitig besitzt das *Easy A® High-Fidelity PCR Cloning*-Enzym eine Korrekturleseaktivität, so dass die resultierende Fehlerrate der Polymerase-Reaktion etwa sechsmal geringer ist als unter Verwendung der *Taq*-Polymerase.

Die PCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei in einem 50 µl-Ansatz etwa 1-2 µg Plasmid-DNA (pIRES2-AcGFP1-EphB4, pIRES2-AcGFP1-EphB6 bzw. pIRES2-AcGFP1-EphrinB2), je 1 µl der entsprechenden Primer (**Tabelle 2-3**) und 1 µl dNTPs (10 mM) mit 2,5 U *Easy A® High-Fidelity PCR Cloning*-Enzym nach dem in **Tabelle 2-4** beschriebenen Temperaturprogramm inkubiert wurden.

Tabelle 2-3: Sequenz, T_m und erwartete Produktgröße der für die Klonierung von sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 verwendeten Primer

Die in den Primern enthaltene Erkennungssequenz für die Restriktionsendonukleasen HindIII, NotI und XhoI wurde mit einem Unterstrich gekennzeichnet.

Primer	Sequenz (5' → 3')	T_m	Produkt
h sEphB4 HindIII <i>fwd</i>	GGCTTCGGTGGCCA <u>AAGCTTT</u> TGGAAGAG	73°C	1569 bp
h sEphB4 NotI <i>rev</i>	CGCGGCCGCCTGCTCCCG	70°C	
h sEphB6 HindIII <i>fwd</i>	GGTGTCTTCAGTTA <u>AAGCTT</u> CTGGAAGAG	69°C	1686 bp
h sEphB6 XhoI <i>rev</i>	ATGGAGCCGACTCGAGATCTTTCC	67°C	
h sEphrinB2 HindIII <i>fwd</i>	GGTTTTATGCAAGCTTGCGATTTCCAA	65°C	603 bp
h sEphrinB2 XhoI <i>rev</i>	TGCAAATACTCGAGCTTCGGAACC	65°C	

Tabelle 2-4: Temperaturprogramm zur Durchführung der Klonierungs-PCR

Reaktionsschritt		Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung		2 min	95°C
30 PCR-Zyklen	Denaturierung	40 s	95°C
	Primer-Hybridisierung	30 s	$T_m - 5^\circ\text{C}$
	Primer-Elongation	90 s	72°C
Finale Elongation		7 min	72°C

2.2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Im Anschluss an die Klonierungs-PCR wurde der komplette Ansatz mit sechsfach konzentriertem Ladebuffer versetzt, in einem 1,5-prozentigen Agarose-Gel bei 120 V aufgetrennt und die DNA anschließend mittels Ethidiumbromid detektiert (siehe 2.2.4.4). Die cDNA für sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 umfasste 1569, 1686 bzw. 603 bp. Diese wurde, wie in **Abbildung 2-6** mit Hilfe der Rahmen dargestellt, aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert. Die gereinigte cDNA wurde zur Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit erneut gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.4.5).

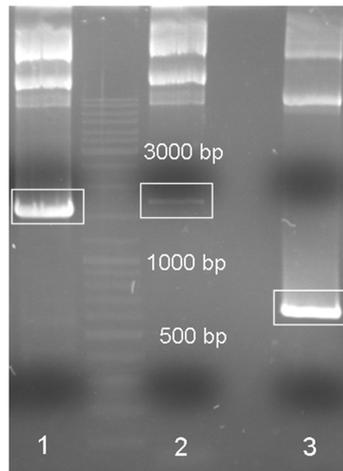


Abbildung 2-6 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Reaktionsansätze zur Gewinnung der cDNA für sEphB4 (1), sEphB6 (2) und sEphrinB2 (3) Die PCR wurde durchgeführt, der Reaktionsansatz mit sechsfach konzentriertem Ladepuffer versetzt und bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid detektiert und die im Rahmen dargestellte DNA-Bande, die der cDNA für sEphB4 (1), sEphB6 (2) und sEphrinB2 (3) entspricht, aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mittels Gelextraktion gereinigt.

2.2.5.4 TOPO-TA-Klonierung, Transformation und Plasmid-Isolierung

Da die Restriktionshydrolyse von Plasmiden deutlich effizienter verläuft als die von PCR-Produkten, wurde die mittels PCR und Gelextraktion gewonnene und gereinigte cDNA für sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 mit Hilfe des *TOPO TA Cloning Kit for Sequencing* zuerst in den pCR4-TOPO-Vektor kloniert. Dabei ligieren die durch das *Easy A® High-Fidelity PCR Cloning*-Enzym an den 3'-Enden der PCR-Produkte eingefügten Desoxyadenosin-Reste mit den 5'-seitig überhängenden Desoxythymidin-Resten des linearisierten Vektors. Die Reaktion wird durch die an den linearisierten Vektor gebundene Topoisomerase I katalysiert. Für die Ligation wurden 4 µl gereinigte cDNA mit 1 µl im Kit enthaltener Pufferlösung und 1 µl pCR4-TOPO-Vektor für 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Der sEph- bzw. sEphrin-pCR4-TOPO-Ligationsansatz wurde nach Ablauf der Reaktionszeit zur Transformation kompetenter *E.coli* K12 Top10 bzw. K12 DH5α genutzt (siehe 2.2.4.8). Der Transformationsansatz wurde anschließend auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden verschiedene Ampicillin-resistente (Amp^R) Klone von den LB-Agarplatten ausgewählt und über Nacht in 5 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium kultiviert.

Am nächsten Tag wurde 1 ml der Bakterienkultur mit 100 µl Glycerol vermischt und zur dauerhaften Konservierung der Bakterien bei -70°C gelagert. Aus den restlichen 4 ml

Bakterienkultur wurde das enthaltene Plasmid isoliert (siehe 2.2.4.9) und zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation mit den Restriktionsendonukleasen, deren Erkennungssequenz in den Primern enthalten war (siehe Tabelle 2-3), hydrolysiert (siehe 2.2.4.2).

Zur Sicherstellung einer fehlerfreien cDNA-Sequenz wurden die gereinigten Plasmide durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) sequenziert. Für die Sequenzierung wurden Vektor-spezifische Primer verwendet, welche durch die LGC Genomics GmbH bereitgestellt wurden.

2.2.5.5 Restriktionshydrolyse, Ligation, Transformation und Plasmid-Isolierung

Nach der Verifizierung einer fehlerfreien DNA-Sequenz der Spendervektoren pCR4-TOPO-sEphB4, -sEphB6 und -sEphrinB2 wurde die cDNA für sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen HindIII und XhoI (sEphB6, sEphrinB2) bzw. HindIII und NotI (sEphB4) aus den Spendervektoren freigesetzt (siehe 2.2.4.2). Die verwendeten Restriktionsendonukleasen hydrolysierten die Plasmide an den entsprechenden Erkennungssequenzen, welche mit Hilfe der Primer in die Vektoren eingeführt worden waren. Der Zielvektor pSecTag2B wurde ebenfalls mit HindIII und XhoI bzw. NotI hydrolysiert. Die Restriktionsansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt (siehe 2.2.4.4), die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel extrahiert und zur Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit erneut gelelektrophoretisch getrennt (siehe 2.2.4.5).

Die Ligation der cDNA für sEphB4, sEphB6 und sEphrinB2 mit dem pSecTag2B-Vektor erfolgte wie in Kapitel 2.2.4.6 beschrieben (Sticky End-Ligation). Der Ligationsansatz wurde zur Transformation kompetenter *E.coli* genutzt (siehe 2.2.4.8). Nach der Anfertigung eines Glycerolstocks für die dauerhafte Lagerung der Bakterien erfolgte die Plasmid-Isolierung aus verschiedenen AmpR-Klonen (siehe 2.2.4.9). Die Plasmide wurden erneut durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) sequenziert und aus je einem Klon mit korrekter cDNA-Sequenz wurden größere Mengen der in **Abbildung 2-7** dargestellten Plasmide isoliert (siehe 2.2.4.9) und zur Transfektion von COS-7-Zellen verwendet (siehe 2.3.4).

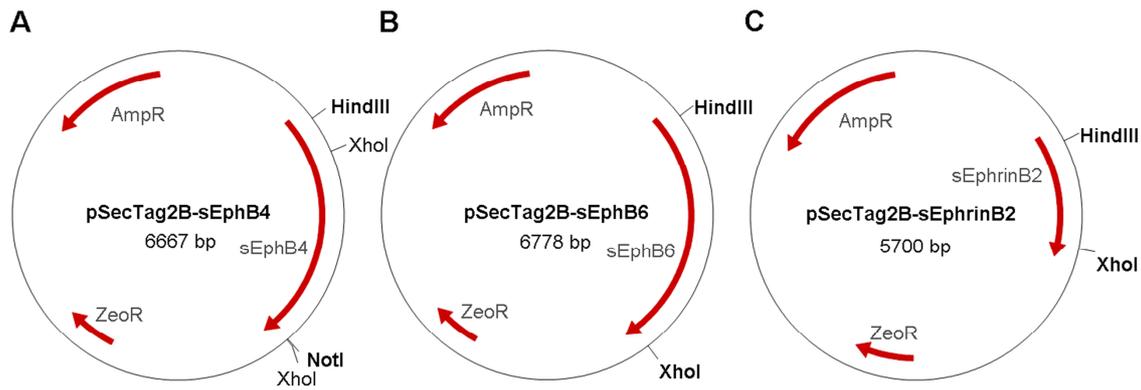


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung der eukaryotischen Expressionsvektoren pSecTag2B-sEphB4 (A), pSecTag2B-sEphB6 (B) und pSecTag2B-sEphrinB2 (C) Dargestellt sind die Gene für sEphB4, sEphB6, sEphrinB2 und für die Resistenz gegenüber Ampicillin (AmpR) und Zeocin™ (ZeoR) sowie die Schnittstellen von ausgewählten Restriktionsendonukleasen.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien erfolgte unter standardisierten Kulturbedingungen (37°C, 95% relative Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) im entsprechenden Zellkulturmedium (*Dulbecco's Modified Eagle-Medium* (DMEM) bzw. *Roswell Park Memorial Institute 1640-Medium* (RPMI)) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 1% eines Gemischs aus Penicillin und Streptomycin (PenStrep). Die entsprechenden Zellkulturmedien werden im Folgenden als komplettes DMEM bzw. komplettes RPMI bezeichnet.

Die Zellen wurden durch eine dreiminütige Inkubation mit PBS + 0,5% Trypsin (v/v) + 0,2% EDTA (v/v) (im Folgenden kurz als Trypsin bezeichnet) vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst, in Trypsinneutralisator (PBS + 10% FKS (v/v)) aufgenommen und nach Zentrifugation für 5 min bei 200 × g in frischem Zellkulturmedium resuspendiert.

Die Bestimmung der Zellzahl und -vitalität erfolgte mit 100 µl der gut durchmischten Zellsuspension am Casy®-Zellzählgerät. Anschließend wurde eine von den jeweils geplanten Experimenten abhängige Anzahl von Zellen in eine 25 cm²- bzw. 75 cm²-Zellkulturflasche oder in ein anderes Zellkulturgefäß überführt und nach drei bis vier Tagen erneut passagiert.

2.3.2 Kontrolle von Zellkulturen auf Mykoplasmen-Kontamination

Um eine Kontamination der eukaryotischen Zellen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde der Überstand der Zellkulturen mit Hilfe des VenorGeM®-Mykoplasmen-Detektionskit (Minerva) regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht. Dazu wurden 200 µl Zellkulturüberstand für 5 min bei 99°C erhitzt und zur Abtrennung von Zellresten für circa 30 s bei 10.000 × g zentrifugiert. Auf Eis wurden 2 µl des Überstandes nach Herstellerangaben mit 10-fach konzentriertem Reaktionspuffer, Mycoplasmen-spezifischen Primern (im Lieferumfang enthalten), Nukleotiden, Taq-Polymerase, MgCl₂ und einer internen Kontroll-DNA versetzt. Im Anschluss erfolgte eine PCR nach dem in **Tabelle 2-5** angegebenen Temperaturprogramm. In jeder Testreihe wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Auftrennung der PCR-Reaktionsansätze erfolgte in einem 1,5-prozentigen Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromid-Detektion der DNA-Banden. Für alle im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden nur Zellen verwendet, die frei von Mykoplasmen waren.

Tabelle 2-5: Temperaturprogramm zur Durchführung der Mykoplasmentest-PCR

Reaktionsschritt		Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung		2 min	94°C
39 PCR-Zyklen	Denaturierung	30 s	95°C
	Primer-Hybridisierung	30 s	55°C
	Primer-Elongation	30 s	72°C
Kühlung		bis Ende	4°C

2.3.3 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die mit Trypsin gelösten Zellen in 10 ml PBS gewaschen, mit einer relativen Zellzahl von 5×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium (10% DMSO in FKS (v/v)) resuspendiert und davon jeweils 1 ml in Einfrierröhrchen überführt. Die Einfrierröhrchen wurden zunächst für mindestens 24 h bei -70°C in einem Einfriergefäß gelagert und anschließend zur dauerhaften Kryokonservierung der Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.3.4 Transfektion und Antibiotikaselektion von COS-7-Zellen

Die Transfektion der COS-7-Zellen mit den Plasmiden pSecTag2B-sEphB4 und pSecTag2B-sEphB6 erfolgte mittels Lipofectamin™ 2000. Die im Lipofectamin™ 2000 enthaltenen Lipide formen in wässriger Lösung kationische Liposomen, die aufgrund

ihrer Ladung negativ geladene Plasmid-DNA binden. Letztere passiert dank der Liposomen die Membran von eukaroytischen Zellen und wird intrazellulär freigesetzt. Während der Zellteilung gelangt die Plasmid-DNA in den Zellkern und kann stabil in das zelluläre Genom integriert werden. Dies bezeichnet man als Lipofektion.

Die COS-7-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 80% in 6well-Platten kultiviert. Es wurden 4 µg des zu transfizierenden Plasmides in 50 µl Opti-MEM®-Medium gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen (Ansatz A). Parallel dazu wurden 20 µl Lipofectamin™ 2000 mit 80 µl Opti-MEM®-Medium vermischt (Ansatz B). Schließlich wurden 50 µl vom Ansatz B zu 50 µl Ansatz A gegeben und das Gemisch A/B für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass die Plasmid-DNA an die Liposomen binden konnte. In der Zwischenzeit wurden die COS-7-Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 900 µl DMEM + 10% FKS je Kavität zugegeben. Schließlich wurden 100 µl Gemisch A/B in das Zellkulturmedium gegeben, die Zellkultur-Platte zur besseren Verteilung vorsichtig geschwenkt und die Zellen anschließend für 24 h bei 37°C kultiviert.

Nach 24 h wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin in Suspension gebracht und auf drei 10 cm-Zellkulturschalen verteilt. Zur Selektion der Plasmid-tragenden Zellen erfolgte die Zugabe von 250 µg/ml Zeocin™ zum Zellkulturmedium. Nach etwa zwei Wochen wurde die gesamte Zellkulturschale mit PBS gewaschen, Klonierungszyylinder um ausgewählte Klone platziert und die Zellen innerhalb des entsprechenden Klonierungszyinders mit 100 µl Trypsin für 10 min bei 37°C in Suspension gebracht. Die abgelösten Zellen wurden in komplettem DMEM + 250 µg/ml Zeocin™ resuspendiert und in eine 24well-Platte überführt. Nach Erreichen der Konfluenz der Zellen wurde der jeweilige Zellkulturüberstand mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion (siehe 2.4.4 und 2.4.5) auf darin enthaltenen sEphB4 bzw. sEphB6 untersucht. Der Klon mit der stärksten Proteinbande im Zellkulturüberstand wurde für weiterführende Experimente ausgewählt und vermehrt. Zur Aufrechterhaltung der Transfektionsrate wurde dem Zellkulturmedium bei jedem Mediumwechsel 250 µg/ml Zeocin™ zugesetzt.

2.3.5 Transfektion und Antibiotika-Selektion von A375-Zellen

Da die Transfektion der humanen Melanomzelllinie A375 mit verschiedenen Transfektionsreagenzien auf Basis von Liposomen und kationischen Polymeren (Lipofectamin™ und Plus™-Reagenz, Lipofectamin™ 2000, Metafecten® Pro und TurboFect™) zu keiner zufriedenstellenden Transfektionseffizienz führte, wurde die Transfektion dieser Zellen mittels Nukleofektion etabliert. Die Nukleofektion ist ein Transfektionsverfahren, bei der die Plasmid-DNA durch spezifische, von der

Herstellerfirma vorgegebene, elektrische Parameter und Puffer direkt in den Zellkern gelangt. Aufgrund dessen kann die Plasmid-DNA unabhängig von einer stattfindenden Zellteilung in das zelluläre Genom integriert werden. Die Nukleofektion erfolgte mit Hilfe des *Cell Line Nucleofector® Kit V* (Lonza) am Nucleofector® I¹.

Drei Tage vor der Transfektion wurden 1×10^6 A375-Zellen in 75 cm²-Flaschen ausgesät, so dass sie am Tag der Nukleofektion etwa 80% konfluent waren. Die Zellen wurden mit Trypsin in Lösung gebracht, in Trypsinneutralisator aufgenommen, 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und mit einer relativen Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml in komplettem DMEM resuspendiert. Für jeden Nukleofektionsansatz wurde 1 ml Zellsuspension für 5 min bei $90 \times g$ zentrifugiert und das Zellpellet nach vollständiger Entfernung des Zellkulturmediums in 100 µl Cell Line Nucleofector® Lösung V resuspendiert. Nach Zugabe von 2 µg des zu transfizierenden Plasmids (1 µg/µl, pIRES2-AcGFP1, pIRES2-AcGFP1-EphB4, -EphB6 und -EphrinB2) wurde der Nukleofektionsansatz luftblasenfrei in eine Glasküvette pipettiert, diese in den Nucleofector® I gestellt und das Programm X-01 gestartet. Dabei kam es zur Elektroporation der Zellen, so dass die Plasmide in den Zellkern gelangen konnten. Nach erfolgter Nukleofektion wurde die Zellsuspension schnellstmöglich in eine 6well-Platte mit 3 ml warmem DMEM + 20% FKS (v/v) + 1% PenStrep (v/v) überführt. Nach ein bis zwei Tagen wurden alle transfizierten Zellen aus einer Kavität einer 6well-Platte mit Trypsin gelöst, auf drei 10 cm-Zellkulturschalen aufgeteilt und für ein bis zwei Wochen in komplettem DMEM + 1,2 mg/ml Geneticin (im Folgenden als G418 bezeichnet) kultiviert.

Nach dieser Zeit wurde die gesamte Zellkulturschale mit PBS gewaschen, Klonierungszyylinder um ausgewählte Klone platziert und die Zellen innerhalb des entsprechenden Klonierungszyinders mit 100 µl Trypsin für 10 min bei 37°C in Suspension gebracht. Die abgelösten Zellen wurden in komplettem DMEM + 1,2 mg/ml G418 resuspendiert und in eine 24well-Platte überführt. Nach Erreichen der Konfluenz in den Kavitäten der 24well-Platte wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin gelöst und wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben mittels Durchflusszytometrie auf die Proteinbiosynthese des grün fluoreszierenden Proteins AcGFP1 (im Folgenden kurz als GFP bezeichnet) geprüft. GFP-positive Klone wurden zur weiteren Selektion fortwährend in komplettem DMEM + 1,2 mg/ml G418 kultiviert und zur Erhöhung der Anzahl GFP-positiver Zellen sowie zur Verbesserung der Transfektionsstabilität acht-

¹ Die Nukleofektion wurde von der Autorin in der Arbeitsgruppe Molekulare Hämatologie um PD Dr. Illmer und Prof. Dr. Schaich an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus der TU Dresden durchgeführt. Die technische Betreuung erfolgte durch Frau Claudia Dill.

bis elfmal mit Hilfe des Zellsorters FACSAria™ II und der FACSDiva-Software gesortet² (siehe 2.3.6).

2.3.6 Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse und -sortierung (FACS) von transfizierten A375-Zellen

Die Bestimmung des prozentualen Anteils GFP-positiver Zellen und der Fluoreszenzintensität der Zellen erfolgte am FACSCalibur und der dazugehörigen BD CellQuest™ Pro-Software. Die zu analysierenden Zellen wurden wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben in Suspension gebracht, gezählt und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 500 μ l PBS resuspendiert und am FACSCalibur analysiert.

Die Selektion GFP-positiver Zellen erfolgte mit Hilfe des Zellsorters FACSAria™ II und der FACSDiva-Software. In Vorbereitung dessen wurden die Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert und, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, in Suspension gebracht. Nach dem einmaligen Waschen mit PBS und der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in Sortpuffer (PBS + 2 mM EDTA + 2% FKS) resuspendiert und bis zur Sortierung auf Eis gelagert. Zur Vermeidung von Zellaggregaten wurde die Zellsuspension kurz vor Beginn der FACS-basierten Separierung durch einen Maschenfilter pipettiert. Am Zellsorter wurden unter Verwendung der 70 μ m-Düse etwa 1×10^6 Zellen mit möglichst starker GFP-Proteinbiosynthese aus der Zellsuspension gewonnen und automatisch in ein 15 ml-Röhrchen mit 5 ml DMEM + 10% FKS + 1% Zell Shield™ (v/v) überführt. Im Anschluss an die Zellseparierung wurden die GFP-positiven Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 7 ml komplettem DMEM + 1% Zell Shield™ (v/v) + 1,2 mg/ml G418 resuspendiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Der Zusatz von Zell Shield™ zum Zellkulturmedium diente der Vermeidung von Mykoplasmenkontaminationen und erfolgte nur für etwa eine Woche.

2.3.7 Fluoreszenzmikroskopie von transfizierten A375-Zellen

Für die (fluoreszenz-)mikroskopische Darstellung der transfizierten A375-Zellen wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 500 μ l komplettem DMEM in eine Kavität eines Glas-Objekträgers mit einem Polystyrol-8-Kammer-Aufsatz gegeben und für etwa 24 h auf diesem kultiviert. Der Polystyrol-Aufsatz des Objekträgers wurde entfernt und die auf

² Die Fluoreszenz-basierte Sortierung der Zellen wurde von der Autorin am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus der TU Dresden unter Leitung von Prof. Dr. Jessberger durchgeführt. Die technische Betreuung erfolgte durch Frau Manuela Günther und Frau Susann Höfner.

dem Objektträger angewachsenen Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gemisch aus PBS und FKS (1:1, v/v) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Die (fluoreszenz-)mikroskopische Auswertung erfolgte am Mikroskop AxioImager.A1 und der dazugehörigen AxioVision-Software. Um eine Vergleichbarkeit der Bilder zu gewährleisten, wurden alle Fotos mit der gleichen Belichtungszeit aufgenommen.

2.3.8 Bestimmung der Zellproliferation und Zellvitalität mittels Wachstumskurve

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurden 5×10^4 nicht-transfizierte bzw. transfizierte A375-Melanomzellen in 2 ml komplettem DMEM bzw. 2 ml komplettem DMEM + 1,2 mg/ml G418 in die Kavitäten einer 6well-Platte ausgesät und unter standardisierten Bedingungen kultiviert. Am Tag eins, zwei, drei, vier und sieben nach Aussaat der Zellen wurden diese mit 1 ml PBS gewaschen und mit Hilfe von 400 μ l Trypsin je Kavität in Suspension gebracht. Nach Zugabe von 600 μ l Trypsinneutralisator je Kavität wurde die Zellsuspension gut gemischt und die Zellzahl und -vitalität im Casy®-Zellzählgerät bestimmt (siehe 2.3.1).

2.3.9 Differenzierung humaner THP-1-Leukämiezellen zu Makrophagen-artigen Zellen (THP-1(M))

Durch eine dreitägige Inkubation mit 64 nM 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) in komplettem RPMI wurde die humane, monozytische Leukämiezelllinie THP-1 zu Zellen differenziert, die funktionelle Eigenschaften von reifen Makrophagen tragen. Aus den in Suspension kultivierten THP-1-Zellen wurden dabei adhärenz THP-1(M) mit flacher, Amöboid-artiger Zellmorphologie. Neben Veränderungen in der Enzymausstattung sind die Zellen außerdem vermehrt zur Phagozytose fähig [85, 94].

2.3.10 Differenzierung humaner HL-60-Leukämiezellen zu Makrophagen-artigen (HL-60(M)) und Granulozyten-artigen (HL-60(G)) Zellen

Analog zu den THP-1-Zellen wurde die humane, promyelozytische Leukämiezelllinie HL-60 mit Hilfe von 64 nM TPA in komplettem DMEM zu Makrophagen-artigen Zellen differenziert (HL-60(M)). Die Zellen adhären an das Zellkulturgefäß und die DNA-Synthese und Zellteilung kommt zum Erliegen. Gleichzeitig verändert sich die Enzym-Ausstattung der Zellen. Darüber hinaus exprimieren sie Fc-Rezeptoren für

Immunglobulin G (IgG) auf ihrer Oberfläche und erlangen die Fähigkeit zur Phagozytose [86, 95].

Durch die sechstägige Inkubation mit 1,3% (v/v) DMSO in komplettem DMEM konnten die HL-60-Leukämiezellen zu Zellen differenziert werden, die in ihren funktionellen Eigenschaften mit Granulozyten vergleichbar sind (HL-60(G)). Wie periphere Blut-Granulozyten reagieren die HL-60(G) auf Chemoattraktantien und exprimieren Komplement-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Vergleichbar zu HL-60(M) sind auch die HL-60(G) zur Phagozytose befähigt [96, 97].

2.3.11 Kokultivierung humaner Melanomzellen mit HL-60(M) und anschließende Trennung mittels Magnet-aktivierter Zell-Separierung (MACS)

Zur Simulation der komplexen Interaktionen zwischen Tumorzellen und Tumor-assoziierten Immunzellen *in vivo*, wurde ein Kokultur-Modell etabliert, in dem die humanen Melanomzellen *in vitro* mit Makrophagen-artig differenzierten HL-60-Zellen (HL-60(M)) kokultiviert wurden. Die anschließende Trennung erfolgte durch die magnetische Separierung der Melanomzellen von den CD45-PE-MicroBead-markierten HL-60(M)-Zellen.

Für die Kokultur-Experimente wurden 1×10^7 nicht-adhärenente HL-60-Leukämiezellen, wie in Kapitel 2.3.10 beschrieben, in 10 cm-Zellkulturschalen zu HL-60(M) differenziert. Nach drei Tagen wurden die HL-60(M) zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und mit 9 ml komplettem DMEM überschichtet. Das Zellkulturmedium wurde nach 24 h vollständig abgenommen, 5 min bei $2.000 \times g$ zentrifugiert und der klare Überstand als HL-60(M)-konditioniertes DMEM verwendet. Parallel dazu wurden die Melanomzellen mit Hilfe von Trypsin in Suspension gebracht (siehe 2.3.1), 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert, in komplettem DMEM bzw. HL-60(M)-konditioniertem DMEM resuspendiert und je 8×10^6 Melanomzellen in eine neue 10 cm-Zellkulturschale (Monokultur und Monokultur mit Überstand HL-60(M)) bzw. in eine 10 cm-Zellkulturschale mit HL-60(M) (Kokultur) ausgesät. Die Zellen wurden für 24 h unter standardisierten Bedingungen kultiviert (siehe 2.3.1).

Zur Trennung der Melanomzellen von den in der Kokultur befindlichen HL-60(M) wurden alle nicht-adhärenenten Zellen durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt. Die adhärenenten Zellen wurden durch eine 10-minütige Inkubation mit Trypsin abgelöst, in PBS aufgenommen und nach Zentrifugation (5 min, $200 \times g$) in PBS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl im Casy®-Zellzählgerät (siehe 2.3.1) wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in 100 μ l MACS-Puffer (PBS + 0,5% BSA (v/v) + 2 mM EDTA) +

0,2 mg/ml humanes IgG resuspendiert und unter Rotation für 30 min bei 4°C inkubiert. Der Zusatz von IgG diente der Blockierung von Fc-Rezeptoren, welche gegen die konstante Domäne (Fc) von Antikörpern gerichtet sind. Nach dieser Zeit wurden 10 µl anti-CD45 Phycoerythrin (PE)-gekoppelter Antikörper zugegeben und die Zellen unter Rotation für 15 min bei 4°C inkubiert, wodurch es zur spezifischen Färbung der HL-60(M)-Zellen kam. Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem MACS-Puffer gewaschen und in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl anti-PE MACS® MicroBeads wurden die Zellen erneut unter Rotation für 15 min bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung der überschüssigen, superparamagnetischen MACS® MicroBeads wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem MACS-Puffer gewaschen und in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine zuvor mit 500 µl MACS-Puffer äquilibrierte MACS® MS-Säule gegeben und diese nach vollständigem Durchlaufen der Zellsuspension dreimal mit 500 µl eiskaltem MACS-Puffer gewaschen. Auf diese Weise wurden die CD45-PE-MicroBead-markierten HL-60(M)-Zellen vom Magnetfeld des MiniMACS™ bzw. OctoMACS™ Separators, in dem sich die MACS® MS-Säule befand, zurückgehalten. Im Gegensatz dazu wurden die nicht-markierten Melanomzellen eluiert und standen für weitere Experimente zur Verfügung. Im Anschluss wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die HL-60(M)-Zellen bei Bedarf durch Zugabe von 1 ml MACS-Puffer und unter Zuhilfenahme des dazugehörigen Stempels von der Säule eluiert.

Bei der Untersuchung von kokultivierten Melanomzellen mussten im Hinblick auf den Adhäsions- und Migrationsassay einige Veränderungen an den in Kapitel 2.3.12 und 2.3.13 beschriebenen Protokollen vorgenommen werden. Sollten die kokultivierten Zellen auf ihre Adhäsionsfähigkeit untersucht werden, wurden diese statt mit Trypsin nur mit PBS + 2 mM EDTA unter Verwendung eines Zellschabers in Suspension gebracht. Aus mehreren experimentellen Gründen wurde bei der Kokultur der Melanomzellen mit HL-60(M) auf die für den Migrationsassay übliche Vorinkubation der Zellen in serumfreiem Medium über Nacht verzichtet, was aber keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der Zellen hatte. Ansonsten wurden die zuvor mit HL-60(M) kokultivierten Melanomzellen wie unten beschrieben auf ihre Adhäsions- (siehe 2.3.12) und Migrationsfähigkeit (siehe 2.3.13) untersucht.

2.3.12 Adhäsionsassay

2.3.12.1 Adhäsion an Fibronektin

Mit Hilfe des Adhäsionsassays wurde die Fähigkeit humaner Melanomzellen, sich in Abhängigkeit verschiedener Vorbehandlungen an Fibronektin anzuheften, untersucht. Fibronektin ist ein Glykoprotein der ECM, das *in vivo* für die Zellmigration und -adhäsion von Bedeutung ist.

Fibronektin wurde durch Zugabe von 300 µl PBS + 5 µg/ml Fibronektin je Kavität über Nacht bei 4°C auf einer 24well-Platte immobilisiert. Zum Entfernen von ungebundenem Fibronektin und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Platte am darauffolgenden Tag zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und für mindestens 30 min mit 300 µl PBS + 2% BSA (w/v) je Kavität stehen gelassen. Die Melanomzellen wurden nach einer entsprechenden Vorbehandlung, wie z.B. der Kokultur mit HL-60(M), mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml in DMEM + 1% BSA (w/v) resuspendiert. Jeweils 500 µl dieser Zellsuspension wurden nun auf die mit Fibronektin beschichtete 24well-Platte gegeben und in Abhängigkeit der Zelllinie für 40 min (A375), 60 min (A2058) bzw. 120 min (Mel-Juso) bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach dieser Zeit wurde die Zellsuspension abgenommen und alle nicht-adhären Zellen durch Waschen mit 500 µl PBS je Kavität entfernt. Die adhären Zellen wurden durch die Zugabe von 50% Methanol in PBS (v/v, 500 µl/Kavität) für 5 min und 100% Methanol (500 µl/Kavität) für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS + 0,5% Kristallviolett (w/v) + 20% Methanol (v/v, 250 µl/Kavität) für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt und der überschüssige Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser entfernt. Mit Hilfe von PBS + 0,5% Triton X-100 (v/v, 250 µl/Kavität) wurde das Kristallviolett innerhalb von 5 - 10 min bei Raumtemperatur wieder aus den Zellen gelöst. In einer Doppelbestimmung wurde schließlich die OD von jeweils 100 µl dieser Lösung photometrisch quantifiziert ($\Delta OD = OD_{550} - OD_{650}$). Die Messung der OD_{650} ermöglichte den Abzug des Hintergrundes, während die ΔOD von PBS + 0,5% Triton X-100 (v/v) als Blindwert diente.

2.3.12.2 Adhäsion an HL-60(M)-Zellen

Zur Untersuchung der Adhäsionsfähigkeit der transfizierten A375-Zellen an HL-60(M) wurden 4×10^5 HL-60-Zellen für 3 d in einer 24well-Platte mit 1 ml komplettem DMEM + 64 nM TPA kultiviert und somit zu HL-60(M) differenziert (siehe 2.3.10).

Am Versuchstag wurden die A375-Zellen mit Hilfe von Trypsin in Suspension gebracht (siehe 2.3.1), die benötigte Menge an Zellen zentrifugiert (5 min, 200 × g) und mit einer

Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in komplettem DMEM + 5 µg/ml Calcein-Azetoxymethylester (Calcein-AM) resuspendiert und für 30 min bei 37°C kultiviert. Dies führte zur intensiven Calcein-AM-Färbung aller lebenden Zellen. Calcein-AM ist eine nicht-fluoreszierende Verbindung, welche die Zellmembran passieren kann. In lebenden Zellen kommt es aufgrund der Hydrolyse durch intrazelluläre Esterasen zur Freisetzung des grün-fluoreszierenden Calceins, das nach Anregung bei etwa 495 nm Fluoreszenzlicht mit einer Wellenlänge von etwa 516 nm emittiert.

Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml in komplettem DMEM resuspendiert. Es wurden 500 µl dieser Calcein-AM-gefärbten Zellsuspension (1×10^5 Zellen) zu den nicht-gefärbten, adhären HL-60(M) gegeben und gemeinsam mit diesen für 1 h bei 37°C kultiviert. Um alle noch in Suspension befindlichen Zellen zu entfernen, wurden die HL-60(M)-Zellen zuvor einmal mit PBS gewaschen. Somit wurde gewährleistet, dass die Calcein-AM-gefärbten A375-Zellen nur an adhären und damit differenzierte HL-60(M) binden konnten. Nach 1 h wurden alle nicht-adhären A375-Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die 24well-Platte mit der offenen Seite nach unten zentrifugiert (5 min, $50 \times g$). Durch die 30-minütige Inkubation mit 250 µl NaOH-SDS (0,1 M NaOH + 1% SDS (w/v)) je Kavität unter Schütteln und bei Raumtemperatur wurden alle adhären Zellen lysiert.

In einer Doppelbestimmung wurde die Fluoreszenz von je 100 µl Zelllysat bestimmt (Anregung 485/20 nm, Emission 528/20 nm) und ins Verhältnis zur Fluoreszenz von jeweils 1×10^5 Calcein-AM-gefärbten Zellen der gleichen Art gesetzt. Als Blindwert diente die Fluoreszenz von NaOH-SDS.

2.3.13 Migrationsassay

Für die Untersuchung des Einflusses verschiedener experimenteller Bedingungen, beispielsweise der Kokultur mit HL-60(M), auf die Migrationsfähigkeit der humanen Melanomzellen wurden zwei verschiedene Migrationsassays, der Boyden-Kammer- oder Filter-Assay sowie der Wundheilungs- oder *Scratch*-Assay, ausgewählt.

2.3.13.1 Boyden-Kammer-Assay

Der Boyden-Kammer-, Filter- oder Transwell-Migrations-Assay wurde bereits 1962 durch Stephen Boyden publiziert und nach diesem benannt [98]. Beim Boyden-Kammer-Assay wird die Migration beispielsweise von Tumorzellen entlang des Gradienten eines Chemoattraktants, wie z.B. FKS, untersucht. Dafür wird die Kavität einer Zellkulturplatte mit Hilfe eines ThinCert™ Zellkultur-Einsatzes, der über eine

poröse Polyethylenterephthalat-Membran (Porengröße: 8 μm) verfügt, in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt (**Abbildung 2-8**). Um zum FKS im unteren Kompartiment der Zellkulturplatte zu gelangen, müssen die Zellen durch die 8 μm großen Poren der Membran migrieren, was aktive Veränderungen ihrer Form und damit ihres Zellskeletts erfordert.

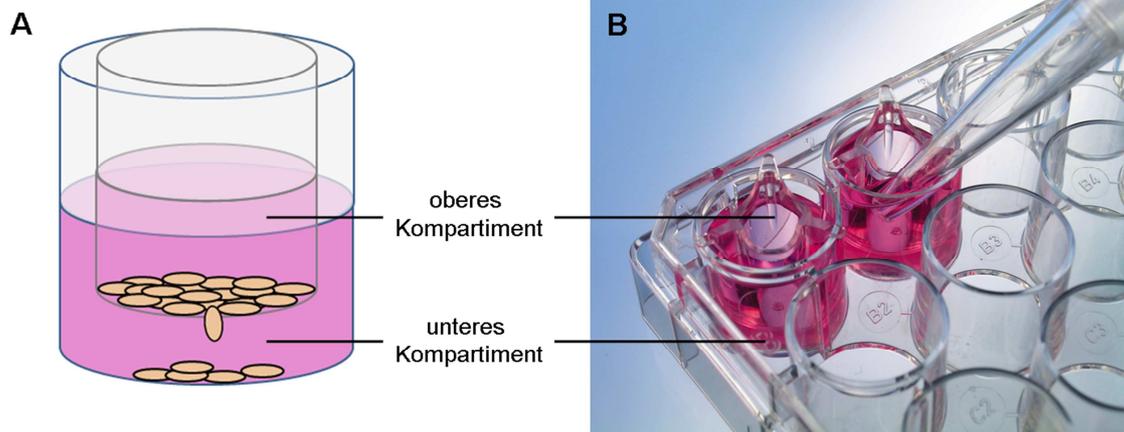


Abbildung 2-8: Schematische (A) und photographische Darstellung (B) eines in der Kavität einer 24well-Platte befindlichen ThinCert™ Zellkultur-Einsatzes zur Untersuchung der Migration von Zellen (B) Abbildung modifiziert nach http://www.krishgen.com/images/ThinCert_Cell_Culture_Inserts.jpg (Stand 10.02.2012).

Um die Wirkung von FKS als Chemoattraktant zu gewährleisten, wurde vor Beginn des Migrationsassay in den Zellen eine Art Hungerzustand erzeugt. Dazu wurden die Melanomzellen über Nacht in FKS-freiem DMEM + 0,2% BSA (w/v) kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Trypsin vom Zellkulturgefäß gelöst und in PBS aufgenommen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in FKS-freiem DMEM + 0,2% BSA (w/v) resuspendiert. Anschließend wurden 200 μl dieser Zellsuspension in einen ThinCert™ Zellkultur-Einsatz pipettiert, der in einer 24well-Platte hing. Im unteren Kompartiment der Kavitäten befanden sich jeweils 600 μl DMEM + 0% FKS bzw. 600 μl DMEM + 10% FKS (v/v). Die Melanomzellen konnten nun für 24 h durch die poröse Membran migrieren.

Am darauffolgenden Tag wurde das Medium aus dem unteren Kompartiment vorsichtig entfernt und durch 450 μl DMEM + 1 μM Calcein-AM ersetzt. Auf diese Weise wurden alle lebenden Zellen an der Unterseite der porösen Membran und auf dem Boden der 24well-Platte innerhalb von 1 h bei 37°C gefärbt. Zum Ablösen der migrierten Zellen wurde die Flüssigkeit aus dem ThinCert™ Zellkultur-Einsatz abgesaugt und dieser in eine 24well-Platte mit 500 μl warmem Trypsin je Kavität überführt und für 10 min bei

37°C inkubiert. Durch mehrmaliges Klopfen der Platte und des ThinCert™ Zellkultur-Einsatzes wurden alle Zellen abgelöst. Anschließend wurde der ThinCert™ Zellkultur-Einsatz verworfen und die Trypsinlösung zurück in die 24well-Platte überführt, in welcher der Migrationsassay durchgeführt worden war. Diese wurde unter mehrmaligem Klopfen erneut für 10 min bei 37°C inkubiert, so dass auch die am Boden der 24well-Platte angewachsenen Zellen gelöst wurden.

In einer Doppelbestimmung wurde nun die Fluoreszenz von 180 µl dieser Trypsin-Calcein-Zellsuspension gemessen (Anregung 485/20 nm, Emission 528/20 nm). Als Blindwert diente die Fluoreszenz von Trypsin aus einer Kavität der 24well-Platte, in der sich vorher 450 µl DMEM + 1 µM Calcein-AM, jedoch keine Zellen befunden hatten.

2.3.13.2 Wundheilungsassay

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit der humanen Melanomzellen ist der Wundheilungs- oder *Scratch*-Assay. Während sich die Zellen im Boyden-Kammer-Assay aufgrund von aktiven Veränderungen ihres Zellskeletts durch eine 8 µm große Pore bewegen, macht der Wundheilungs-Assay eine Aussage über die freie Beweglichkeit, d.h. die Motilität, von Zellen. Darüber hinaus befinden sich die Zellen beim Wundheilungsassay, im Gegensatz zum Boyden-Kammer-Assay, in einem intakten Zellverband, so dass Zell-Zell-Interaktionen möglich sind [99].

Für den Wundheilungsassay wurden je 5×10^5 nicht-transfizierte bzw. transfizierte A375-Zellen in komplettem DMEM in die Kavitäten einer 6well-Platte ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurden dem Zellrasen mit Hilfe einer Pipettenspitze Kratzer zugefügt und alle dabei abgelösten Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden 2 ml DMEM + 1% PenStrep (v/v) + 5% FKS (v/v) je Kavität zugegeben. Lichtmikroskopisch wurde eine Stelle ausgewählt, an welcher einer der Kratzer eine Anfangsbreite von 280 bis 300 µm aufwies und diese nach 2, 4, 6, 8 und 24 h fotografiert. Mit Hilfe der AxioVision-Software wurde die entsprechende Kratzerbreite an fünf definierten Stellen im Bild bestimmt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinisolierung aus Zellkulturen

Zur Gewinnung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen bis zur vollständigen Konfluenz in 25 cm²-Flaschen kultiviert und anschließend einmal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 150 µl Radioimmunopräzipitationsassay (RIPA)-Lysepuffer wurden die Zellen für 15 min auf Eis stehen gelassen, mit einem Zellschaber von Zellkulturgefäß gelöst und anschließend unter Verwendung des Ultraschallstabes UW 2200 (15 s, 20% der Gesamtleistung) sowie einer Insulinspritze DISPOMED® U-100 mit einer entsprechenden Kanüle (Durchmesser: 0,8 mm) vollständig lysiert. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde das Lysat 15 min bei 15.000 × g und 4°C zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration des geklärten Gesamtzelllysates wurde, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, bestimmt.

2.4.2 Proteinisolierung aus Gewebeproben

Zur Gewinnung von Lysaten aus Gewebeproben, beispielsweise aus den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren (siehe 2.5.1), wurden die gefrorenen Gewebestücke auf Eis aufgetaut und mit je 1 ml PIPA-Lysepuffer versetzt. Nach Zugabe von zwei Stahlkugeln wurde das Reaktionsgefäß für jeweils 2 min bei einer Frequenz von 30 Hz im *TissueLyser* geschüttelt, bis die Tumoren vollständig homogenisiert waren. Das Homogenat wurde mit dem Ultraschallstab UW 2200 (15 s, 20% der Gesamtleistung) behandelt und für 20 min bei 4°C geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die Stahlkugeln aus dem Reaktionsgefäß entfernt und Letzteres für 15 min bei 15.000 × g und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (15 min, 15.000 × g, 4°C). Die Proteinkonzentration des geklärten Gewebelysates wurde, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, bestimmt.

2.4.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA)-Kit (Pierce) nach Herstellerangaben und BSA als Standard. In alkalischer Lösung komplexieren Cu²⁺-Ionen mit Proteinen, was zur Reduktion der Cu²⁺- zu Cu⁺-Ionen führt (Biuret-Reaktion). Hierfür sind insbesondere die Peptidbindungen und die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan sowie Tyrosin verantwortlich. Jeweils zwei der entstandenen Cu⁺-Ionen bilden nun mit BCA einen violetten Farbkomplex. Die

Proteinbestimmung mittels BCA ist mit einer Nachweisgrenze von 0,5 µg eine vergleichsweise empfindliche Methode [100].

Nach einer 30-minütigen Reaktion der Proteinproben bzw. des BSA-Standards mit dem BCA-Reagenz-Gemisch (Lösung A:B, 50:1) bei 37°C wurde die OD₅₆₂ der Lösung am Photometer Synergy HT bestimmt.

2.4.4 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen erfolgte nach der durch Laemmli beschriebenen Methode der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [101]. Dabei werden die Proteine unter reduzierenden Bedingungen denaturiert und erhalten durch das im Überschuss zugesetzte Natriumdodecylsulfat (SDS) eine negative Ladung. Nach dem Anlegen eines elektrischen Feldes werden die unterschiedlichen Proteine im Polyacrylamid-Gel somit lediglich in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt.

Für die Gelelektrophorese wurden 50 - 100 µg Protein mit reduzierendem Probenpuffer für die SDS-PAGE versetzt, für 7 min bei 99°C erhitzt und durch Anlegen eines elektrischen Feldes (70 min, 120 - 140 V) in 8,5- (EphB4, EphB6) bzw. 10-prozentigen Polyacrylamid-Gelen (EphrinB2, sEphB4, sEphB6) aufgetrennt. Die im Polyacrylamid-Gel befindlichen Proteine wurden im Anschluss mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder mittels Western Blot immunchemisch detektiert. Coomassie Brilliant Blau lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und führt somit zu einer unspezifischen Proteinfärbung (Nachweisgrenze: etwa 0,1 µg Protein je Bande) [100].

2.4.5 Western Blotting und Immundetektion

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die im Polyacrylamid-Gel befindlichen Proteine im *Semi Dry Blot*-Verfahren, das heißt durch Anlegen eines elektrischen Feldes, auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert (90 min, 10 V). Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde die Membran anschließend für mindestens 1 h in Blockpuffer (TBS + 0,05% Tween 20 (v/v) + 5% Magermilchpulver (w/v)) geschwenkt. Zum Nachweis ausgewählter Proteine wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem in Blockpuffer verdünnten Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS + 0,05% Tween 20 (v/v, TBS-T) wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase (POD)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die optimale Verdünnung war vom Antikörper abhängig (anti-EphB4 (AF3038): 1:1.000, anti-EphB6 (H-90/N-19): 1:200, anti-CD31 (ab28364): 1:200, anti-Aktin (A5060):

1:1.000, anti- β -Aktin (A5316): 1:1.000, anti-Kaninchen- und anti-Ziege-POD: 1:10.000). Durch erneutes Waschen der Membran mit TBS-T wurde überschüssiger Sekundärantikörper entfernt und die Proteinbanden durch Zugabe von Super Signal West Pico, Dura bzw. Femto nach dem Prinzip der Chemilumineszenz detektiert.

Die Antikörper-gebundene POD katalysiert unter Verbrauch von H_2O_2 die Umsetzung von Luminol zu dessen oxidierten Form. Dabei kommt es in Bereichen der PVDF-Membran, in denen sich gebundener Antikörper befindet, zur Freisetzung von Lumineszenz, die detektiert werden kann. Als Größenmarker für die Molmasse der Proteine diente der vorgefärbte Proteinmarker PageRuler™ Plus (Fermentas).

Bei Bedarf konnte die Bindung der Antikörper an die in der PVDF-Membran immobilisierten Proteine durch achtminütiges Schwenken der Membran in Stripping-Puffer (50 mM Tris + 2% SDS (v/v) + 0,7% Mercaptoethanol (v/v)) bei 55°C im Hybridisierungssofen gelöst werden. Im Anschluss daran wurde die Membran für mindestens dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen nochmals für 1 h in Blockpuffer geschwenkt. Anschließend stand die Membran für eine erneute Immundetektion von Proteinen zur Verfügung.

2.4.6 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionsassay (ELISA)

2.4.6.1 IL-6-ELISA

Der Nachweis von IL-6 in Zellkulturüberständen erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen *Human IL-6 ELISA Development-Kits* (Promokine). Für die Gewinnung der Zellkulturüberstände wurden HL-60-Zellen, wie in Kapitel 2.3.10 beschrieben, in 6well-Platten zu HL-60(M) differenziert. Nach drei Tagen wurden die HL-60(M) zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und mit 900 μ l komplettem DMEM überschichtet. Das Zellkulturmedium wurde nach 24 h vollständig abgenommen, 5 min bei 2.000 \times g zentrifugiert und der klare Überstand als HL-60(M)-konditioniertes DMEM verwendet. Parallel dazu wurden die Melanomzellen mit Hilfe von Trypsin in Suspension gebracht (siehe 2.3.1), 5 min bei 200 \times g zentrifugiert, in komplettem DMEM bzw. HL-60(M)-konditioniertem DMEM resuspendiert und in eine neue 6well-Platte (Monokultur und Monokultur mit Überstand HL-60(M)) bzw. in die 6well-Platte mit den HL-60(M)-Zellen (Kokultur) ausgesät.

Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen, bis zur Verwendung bei -70°C gelagert und am Versuchstag zur Abtrennung von Zellresten für 10 min bei 10.000 \times g und 4°C zentrifugiert. Die in der jeweiligen Kavität befindlichen Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml NaOH-SDS lysiert. Nach 30-minütigem Schütteln wurde die Proteinkonzentration des gut durchmischten Lysates bestimmt (siehe 2.4.3).

Die Durchführung des IL-6-ELISA erfolgte nach Herstellerangaben. Zuvor wurden die benötigten Kavitäten einer MaxiSorp®-96well-Platte über Nacht bei Raumtemperatur mit dem im Kit enthaltenen IL-6-Antikörper beschichtet.

2.4.6.2 pEphB4-ELISA

Der Nachweis von phosphoryliertem EphB4 (pEphB4) in verschiedenen Gesamtzelllysaten erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Human Phospho-EphB4 ELISA (R&D). Für die Gewinnung der Gesamtzelllysate wurden 3×10^6 A375-, A375-pIRES- bzw. A375-EphB4-Melanomzellen in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Nach etwa 24 h wurde das Zellkulturmedium vollständig entfernt und durch komplettes DMEM, welches 0; 0,1; 1 bzw. 10 μ M Verbindung **1** oder **2** (siehe 2.6.1) enthielt, ersetzt. Nach weiteren 24 h wurde das Zellkulturmedium vollständig entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 400 μ l pEphB4-ELISA-Lysepuffer sowie durch den Einsatz eines Zellschabers, einer Insulinspritze DISPOMED® U-100 mit einer entsprechenden Kanüle (Durchmesser: 0,8 mm) und eines Ultraschallstabes vollständig lysiert. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde das Lysat 15 min bei $14.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration des geklärten Gesamtzelllysates wurde, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, bestimmt. Die Gesamtzelllysate wurden bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Für die Bestimmung von pEphB4 mittels ELISA wurde von jedem Zelllysate 300 μ g Gesamtprotein je Kavität eingesetzt. Die Durchführung des pEphB4-ELISA erfolgte nach Herstellerangaben. Zuvor wurden die benötigten Kavitäten einer MaxiSorp®-96well-Platte über Nacht bei Raumtemperatur mit dem im Kit enthaltenen pEphB4-Antikörper beschichtet.

Um einen Einfluss der EphB4-Kinaseinhibitoren (Verbindung **1** und **2**, siehe 2.6.1) auf die Gesamt-EphB4-Menge ausschließen zu können, erfolgte parallel zum pEphB4-ELISA die Detektion von EphB4 mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion (siehe 2.4.4 und 2.4.5), wobei unter Verwendung der gleichen Lysate 80 μ g Gesamtprotein je Gel-Tasche aufgetragen wurden.

2.4.7 Gewinnung und Reinigung der rekombinanten, löslichen Eph-Rezeptoren sEphB4 und sEphB6

2.4.7.1 Gewinnung von COS-7-Zellkulturüberständen

Zur Gewinnung von rekombinatem sEphB4 und sEphB6 wurden die mit pSecTag2B-sEphB4 bzw. pSecTag2B-sEphB6 transfizierten COS-7-Zellen bis zur Konfluenz in 175 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Als Zellkulturmedium diente komplettes DMEM mit Zusatz von 250 µg/ml Zeocin™. Zur Gewinnung der rekombinanten Proteine wurden die transfizierten COS-7-Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um alle Reste des FKS-haltigen Zellkulturmediums zu entfernen, und für drei Tage in 50 ml DMEM + 1% PenStrep (v/v) kultiviert. Nach dieser Zeit wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert. Die COS-7-Zellen wurden für die folgenden vier Tage zur Regeneration in komplettem DMEM kultiviert, bis das Medium zur Gewinnung der rekombinanten Proteine erneut für drei Tage gegen FKS-freies DMEM ausgetauscht wurde. In diesem Rhythmus wurden etwa vier bis sechs Wochen lang COS-7-Zellkulturüberstände gewonnen. Anschließend wurden die Zellen verworfen und durch neu aufgetaute Zellen ersetzt.

2.4.7.2 Reinigung von sEphB4 und sEphB6 aus den COS-7-Zellkulturüberständen mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der rekombinanten Proteine sEphB4 und sEphB6, die C-terminal durch einen His₆-Tag charakterisiert sind, erfolgte mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie. Bei dieser Form der Metall-Affinitätschromatographie kommt es zur Interaktion des His₆-Tags der rekombinanten Proteine mit Ni²⁺-Ionen, die über Nitrilotriessigsäure (NTA) komplexiert und somit an die Säulenmatrix gebunden sind (**Abbildung 2-9**).

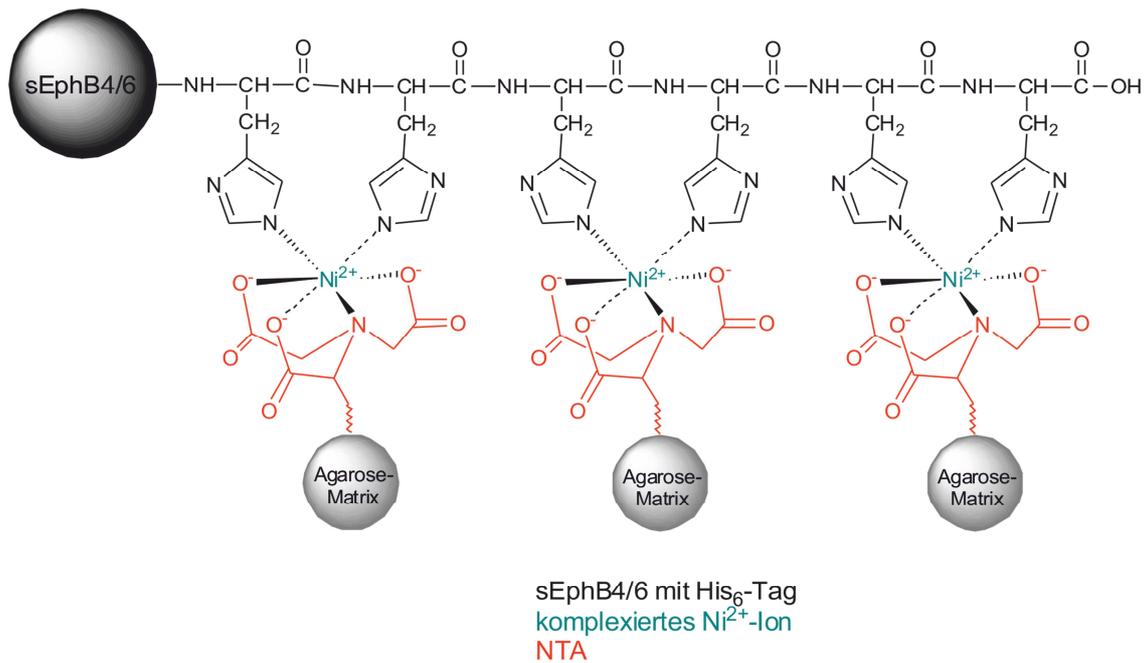


Abbildung 2-9: Interaktion von benachbarten Histidin-Resten im His₆-Tag eines rekombinanten sEphB4 bzw. sEphB6-Proteins mit NTA-komplexierten Ni²⁺-Ionen

Für die Reinigung von sEphB4 und sEphB6 stand neben einer kommerziell erhältlichen, fertig gepackten HisTrap™ FF crude-Säule (**Abbildung 2-10 (A)**) Ni²⁺-NTA-Agarose zum Befüllen von Chromatographie-Säulen zur Verfügung. Letztere ermöglichte die Reinigung der rekombinanten Proteine im kontinuierlichen Verfahren (**Abbildung 2-10 (B)**) oder im diskontinuierlichen (*Batch*-) Verfahren (**Abbildung 2-10 (C)**).

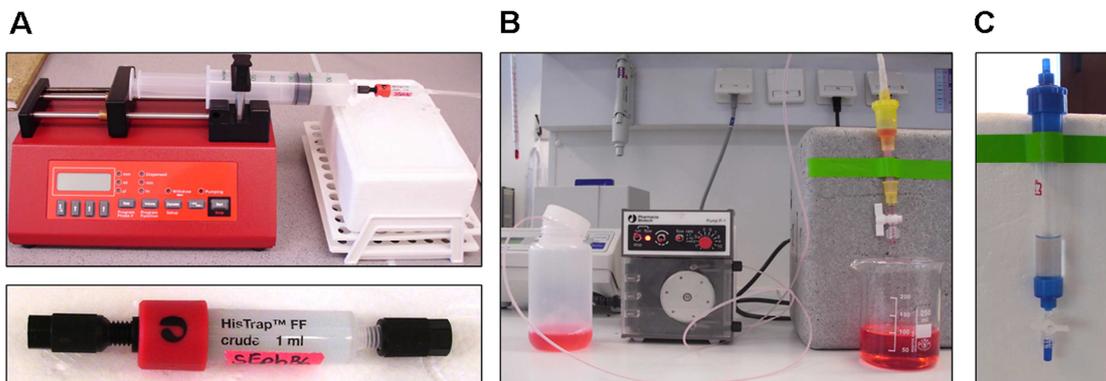


Abbildung 2-10: Überblick über die Ni²⁺-Affinitätschromatographie-Methoden zur Reinigung von sEphB4 und sEphB6 Die Reinigung von sEphB4 und sEphB6 erfolgte im kontinuierlichen Verfahren über die HisTrap™ FF crude-Säule (A) bzw. über eine mit Ni²⁺-NTA-Agarose befüllte Chromatographie-Säule (B). Darüber hinaus wurde eine mit Ni²⁺-NTA-Agarose befüllte Chromatographie-Säule im diskontinuierlichen (*Batch*-) Verfahren getestet (C).

Vorbereitend wurden 100 ml Zellkulturüberstand für 5 min bei $2.000 \times g$ zentrifugiert, durch je einen Rotilabo®-Spritzenfilter mit einer Maschenweite von $0,45 \mu\text{m}$ bzw. $0,22 \mu\text{m}$ filtriert und mit 5 mM Imidazol sowie $10 \mu\text{g/ml}$ Leupeptin und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt. Die Ni^{2+} -NTA-Agarose wurde bis zur Verwendung in Ethanol gelagert. Um das Ethanol zu entfernen, wurde die in einer entsprechenden Chromatographie-Säule befindliche Ni^{2+} -NTA-Agarose zunächst mit 5 ml bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 10 ml Bindungspuffer äquilibriert. Der Zellkulturüberstand wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min über die Säule geführt, so dass es zur Bindung der rekombinanten, mit einem His_6 -Tag versehenen Proteine an die Ni^{2+} -NTA-Phase kam. Zum Schutz der Proteine vor Abbaumechanismen befand sich die Säule bei der Reinigung auf Eis und wurde während der etwa 100 min dauernden Proteinbindungsphase zusätzlich bei einer Umgebungstemperatur von 4°C gelagert. Um alle unspezifisch gebundenen Proteine zu entfernen, wurde die Säule anschließend mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Elution der rekombinanten Proteine in 2 ml-Fractionen erfolgte mit Hilfe von 20 ml Elutionspuffer. Dabei kam es durch den im Elutionspuffer enthaltenen Überschuss an Imidazol (100 mM) zur Verdrängung der His_6 -Tag-Proteine von der Ni^{2+} -NTA-Phase. Abschließend wurde die Ni^{2+} -NTA-Phase mit 5 ml bidestilliertem Wasser gewaschen, mit 5 ml einer 20-prozentigen Ethanollösung (v/v) umgepuffert und bei 4°C gelagert. Die Eluate wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert. Zuvor wurde von jeder Fraktion der Reinigung und den gewonnenen Eluaten jeweils $50 \mu\text{l}$ Probe abgenommen und mit $12,5 \mu\text{l}$ fünffach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt.

Die Menge und Reinheit des in den einzelnen Reinigungsfraktionen und Eluaten enthaltenen sEphB4 bzw. sEphB6 wurde mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion (siehe 2.4.4 und 2.4.5) beurteilt. Im Anschluss wurden alle Eluate, welche die gewünschten rekombinanten Proteine enthielten, vereinigt und mit Hilfe von Vivaspin-6-Zentrifugalkonzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 3.000 Da bei 4°C auf ein Endvolumen von 1 ml eingeengt.

2.4.7.3 Regeneration der Ni^{2+} -NTA-Agarose

Nach circa fünf Reinigungen musste die Ni^{2+} -NTA-Phase regeneriert werden, um eine gleichbleibende Proteinbindung zu gewährleisten. Dazu wurde die in bidestilliertes Wasser umgepufferte Ni^{2+} -NTA-Agarose mit 10 ml Stripping-Puffer (500 mM NaCl + 20 mM Na_3PO_4 + 50 mM EDTA) gespült und anschließend mit 10 ml bidestilliertem Wasser sowie 5 ml Bindungspuffer gewaschen. Durch Zugabe von 2 ml 100 mM NiCl_2 -Lösung wurde die NTA-Phase wieder mit Ni^{2+} -Ionen beladen. Um die

überschüssige NiCl₂-Lösung zu entfernen, wurde die Säule erneut mit 10 ml bidestilliertem Wasser sowie 5 ml Bindungspuffer gewaschen. Da die regenerierte Ni²⁺-NTA-Agarose eine hohe unspezifische Bindung für Proteine, wie z.B. BSA, aufwies, wurde sie zusätzlich mit 3 ml FKS gespült. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen und die unspezifisch gebundenen Proteine mit 10 ml Elutionspuffer eluiert. Danach wurde die Ni²⁺-NTA-Phase mit 10 ml Wasser gewaschen, mit 5 ml einer 20-prozentigen Ethanollösung (v/v) umgepuffert und bei 4°C gelagert.

2.4.7.4 Entfernung von Salzen und Imidazol mittels Schneller Protein-Flüssigkeitschromatographie (FPLC)

Die konzentrierten Eluate konnten nun mittels Schneller Protein-Flüssigkeitschromatographie (FPLC) von den im Elutionspuffer enthaltenen Salzen und dem Imidazol getrennt werden. Die FPLC wurde am Äkta-System unter Verwendung einer HiTrap™ Desalting- (Bettvolumen: 5 ml, Ausschlussgröße: 5 kDa) bzw. einer Superdex™ 75 10/300 GL-Gelfiltrationssäule (Bettvolumen: 24 ml, Trennbereich: 3 - 70 kDa) durchgeführt. Die Säulen wurden mit zwei Bettvolumen bidestilliertem Wasser äquilibriert. Anschließend wurde 1 ml der konzentrierten Eluate steril filtriert und in das FPLC-System injiziert. Die Elution erfolgte ebenfalls mit zwei Bettvolumen bidestilliertem Wasser.

Von den erhaltenen Elutionsfraktionen wurden jeweils 50 µl Probe mit 12,5 µl fünffach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion (siehe 2.4.4 und 2.4.5) analysiert. Die Fraktionen, welche sEphB4 bzw. sEphB6 enthielten, wurden mit Hilfe von Vivaspin-6-Zentrifugalkonzentratoren eingeeengt und standen nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.4.3) für weiterführende Experimente zur Verfügung.

2.4.7.5 Entfernung von Salzen und Imidazol mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren

Da eine vollständige Entfernung der Salze und des Imidazols mittels FPLC unter Verwendung der HiTrap™ Desalting-Säule nicht sichergestellt werden konnte, da sich das entsprechende UV- (Protein) und Leitfähigkeitssignal (Salze) überschneiden, und die Konzentration der rekombinanten Proteine für die Superdex™ 75 10/300 GL-Gelfiltrationssäule zu gering war, wurde die Entfernung der Salze und des Imidazols alternativ zur FPLC durch den Einsatz von Zentrifugalkonzentratoren erreicht. Dazu wurden die sEphB4- bzw. sEphB6-enthaltenden Eluate der Ni²⁺-Affinitätschromatographie vereinigt und mit Hilfe von Vivaspin-6-

Zentrifugalkonzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 3.000 Da bei 4°C auf ein Endvolumen von circa 1 ml eingengt. Das eingengte Eluat wurde wieder auf 6 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und die Lösung mit den rekombinanten Proteinen letztendlich auf circa 2 ml eingengt.

2.4.7.6 Gefriertrocknung

Zur dauerhaften Lagerung wurden die rekombinanten Proteine im Anschluss gefriergetrocknet. Dazu wurde der Deckel des 2 ml-Reaktionsgefäßes, in welchem sich die eingengte sEphB4- bzw. sEphB6-Lösung befand, geöffnet und durch Parafilm ersetzt. Die Proteine wurden im Lyophilisator zunächst tiefgefroren und anschließend über Nacht bei 0,34 mbar und 10°C (Haupttrocknung) bzw. 0,01 mbar und 25°C (Nachtrocknung) lyophilisiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß wieder verschlossen, mit Parafilm umhüllt und bei -70°C gelagert.

2.5 Tierexperimentelle Arbeiten

2.5.1 Etablierung eines murinen Tumor-Xenograft-Modells mit subkutanen A375-pIRES/EphB4-Tumoren³

Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden mit Zustimmung der lokalen Ethikkommission entsprechend den genehmigungsrechtlichen Vorschriften durchgeführt (TVA-AZ24D-9168.11-4/2007-2).

Die pIRES- und EphB4-transfizierten A375-Zellen wurden bis zur Konfluenz in 10 cm-Schalen kultiviert, mit PBS gewaschen und durch eine dreiminütige Einwirkung von Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Anschließend wurden die Zellen in Trypsinneutralisator resuspendiert, 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und in PBS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl und -vitalität der Zellsuspension am Zellzählgerät Casy® wurden die Zellen erneut für 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert und mit einer Dichte von 5×10^7 Zellen/ml in isotonischer Kochsalzlösung aufgenommen.

Neun Wochen alte, weibliche NMRI (*nu/nu*)-Mäuse wurden mit 9% (v/v) Suprane (Wirkstoff: Desfluran) in einem Luft-Sauerstoff-Gemisch aus 700 ml/min Luft und 300 ml/min O₂ und bei einem Gasfluss von 1000 ml/min narkotisiert (im Folgenden als Desfluran-Narkose bezeichnet). Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurde subkutan in den linken (A375-pIRES) bzw. rechten (A375-EphB4) Oberschenkel der Mäuse injiziert. Die Tumorgröße wurde dreimal wöchentlich mit Hilfe eines Messschiebers bestimmt und daraus das Tumolvolumen nach **Formel 3** berechnet.

$$\text{Tumolvolumen [mm}^3\text{]} = \frac{\pi}{6} \times \text{Tumurlänge [mm]} \times \text{Tumorbreite [mm]} \times \text{Tumordicke [mm]} \quad (3)$$

Etwa 15 bis 20 Tage nach Injektion der Tumorzellen, wenn die Tumoren ein Volumen von etwa 300 mm³ erreicht hatten, wurden die Tumor-Mäuse für weiterführende Experimente genutzt.

³ Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden den genehmigungsrechtlichen Bestimmungen entsprechend durch Frau Dr. Birgit Mosch und Frau Catharina Heinig durchgeführt.

2.5.2 Fluoreszenz-Bildgebung

Mit Hilfe des In-vivo-Bildgebungssystems FX PRO war es möglich die Fluoreszenz der A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren *in vivo* darzustellen. Die Tumor-Mäuse wurden unter Desfluran-Narkose im Sichtfeld (FOV, 20 x 20 cm) des In-vivo-Bildgebungssystems FX PRO positioniert und mit einer 400 W Xenon-Lampe angeregt. Die Xenon-Lampe verfügt über ein breites Anregungsspektrum von etwa 400 bis 800 nm, so dass zusätzlich ein für das jeweilige Fluorophor spezifischer Anregungs- und Emissionsfilter zugeschaltet wurde (GFP: Anregung 480/5 nm, Emission 535/5 nm).

Durch die Absorption der elektromagnetischen Strahlung werden im Fluorophor Elektronen in unbesetzte Orbitale mit höherem Energiegehalt (S_1 oder S_2) gehoben. Das Fluorophor, beispielsweise GFP, gelangt dadurch in einen angeregten Zustand. Da dieser Zustand energetisch ungünstig ist, fallen die Elektronen sofort, oft jedoch über Zwischenstufen, wieder in ihr ursprüngliches Orbital (S_0) zurück und geben dabei Energie an ihre Umwelt ab. Dies kann strahlungslos unter Abgabe von Wärme (Schwingungsrelaxation, beim Übergang von S_2 zu S_1 bzw. S_0) und/ oder unter Emission von elektromagnetischer Strahlung (Fluoreszenzlicht, nur beim Übergang von S_1 zu S_0) erfolgen.

Das von den subkutanen Tumoren emittierte Fluoreszenzlicht wurde schließlich detektiert und zur Bilderzeugung verarbeitet.

2.5.3 Magnet-Resonanz-Tomographie⁴

Zur Charakterisierung der subkutanen A375-Tumoren wurden die Tumor-Mäuse mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) untersucht. Die MRT macht sich den Kernspin (im Folgenden kurz als Spin bezeichnet), d.h. die Drehung des Kerns um seine eigene Achse und das damit einhergehende magnetische Moment zunutze und wird daher auch als Kernspin-Resonanz-Tomographie bezeichnet. Wasserstoff ist das am häufigsten in biologischen Geweben vorkommende Element und spielt daher für die MRT eine große Rolle. Werden Wasserstoff-haltige Verbindungen in das statische Magnetfeld eines MRT eingebracht, reagieren die Spins der Wasserstoffkerne mit einer Präzessionsbewegung, welche durch die sogenannte Larmorfrequenz gekennzeichnet ist und richten sich entlang des statischen Magnetfeldes aus (Längsmagnetisierung). Wird nun senkrecht zum statischen Magnetfeld ein schnell wechselndes Magnetfeld mit einer Frequenz, die der Lamorfrequenz entspricht, angelegt, werden die Spins aus

⁴ Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden den genehmigungsrechtlichen Bestimmungen entsprechend durch Herrn Dr. Ralf Bergmann und Herrn Dipl.-Ing. (FH) Sebastian Meister durchgeführt.

ihrer Längs- in eine Quermagnetisierung ausgelenkt. Dies induziert in einer Empfangsspule eine Wechselspannung, deren Frequenz wiederum gleich der Larmorfrequenz ist und das eigentliche Messsignal darstellt. Unmittelbar nach ihrer Anregung geben die Spins die aufgenommene Energie wieder an das umliegende Gewebe ab. Dadurch kippen sie zurück in die Ebene der Längsmagnetisierung, was als Relaxation bezeichnet wird. Die Protonendichte und die für die Relaxation benötigte Zeit bestimmen den Bildkontrast und die Helligkeit, mit der ein Gewebe im MRT-Bild erscheint. Da sich Protonendichte und Relaxationszeit in verschiedenen Geweben zum Teil sehr stark unterscheiden, kann mit Hilfe der MRT auch in Weichteilgeweben ein guter Gewebe-zu-Gewebe-Kontrast erreicht werden [102]. Aufgrund dessen stellt die MRT eine wichtige begleitende Bildgebungsmodalität, beispielsweise bei der Diagnostik von Tumorerkrankungen mittels PET, dar.

Für die vorliegende Arbeit wurde der Kleintier-MRT BioSpec 70/30 USR der Firma Bruker mit einer Magnetstärke von 7 T verwendet (FOV: 6 × 6 cm). Die Tumor-Mäuse befanden sich während der Messung unter Desfluran-Narkose. Für die Erzeugung eines Übersichtsbildes wurde die T2-gewichtete *turbo rapid aquisition with relaxation enhancement* (TurboRARE)-Messesequenz gewählt.

2.5.4 Untersuchung der Tumorperfusion mittels Hoechst 33342

Zur Untersuchung der Perfusion der subkutanen A375-Tumoren wurde den Tumor-Mäusen exakt 1 min vor ihrer Tötung Bisbenzimid Hoechst 33342 (im Folgenden als Hoechst 33342 bezeichnet) in einer Dosis von 25-30 mg/kg Körpergewicht intravenös injiziert. Hoechst 33342 wird von Zellen entlang der Blutgefäße schnell aufgenommen und stabil in deren DNA eingebaut. Da der Farbstoff nur bedingt durch Zellschichten diffundieren kann, was zur ausschließlichen Färbung Gefäß-naher Zellen führt, ist eine Identifikation von funktionellen Blutgefäßen möglich [103]. Unverzüglich nach der Tötung der Mäuse durch zervikale Dislokation wurden die Tumoren entnommen und, wie in Kapitel 2.7.1 und 2.7.3 beschrieben, weiter behandelt, um eine Diffusion des Farbstoffes zu verhindern.

2.6 Radiochemische und Radiopharmakologische Methoden

2.6.1 Darstellung und Radiomarkierung von EphB4-Kinaseinhibitoren⁵

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob sich EphB4-Kinaseinhibitoren als radiopharmazeutische Diagnostika eignen. Darüber hinaus sollte der Einfluss dieser Verbindungen beispielsweise auf die Zellproliferation und -vitalität von A375-Melanomzellen untersucht werden.

Ausgehend von einem bereits beschriebenen EphB4-Kinaseinhibitor (Verbindung **1**⁶), der durch eine 2,4-*bis*-Anilinopyrimidin-Struktur charakterisiert ist [104], wurde, wie in **Abbildung 2-11** gezeigt, ein neuer, potentieller EphB4-Kinaseinhibitor synthetisiert (Verbindung **2**⁷) [105]. Die Darstellung von Verbindung **2**, welche als ¹⁹F-Referenzverbindung diente, erfolgte durch die *p*-Tosylat-katalysierte Reaktion von 3-(3-Fluorpropylsulfonyl)-anilin mit 2-Chlor-N-(5-chlorbenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)-pyrimidin-4-amin (a, Ausbeute: 76%). Letzteres wurde analog zu einem durch Bardelle und Kollegen beschriebenen Syntheseweg dargestellt [104]. Der Austausch der Methylsulfonylbenzen-Gruppe in Verbindung **1** durch eine 3-Fluorpropylsulfonylbenzen-Gruppe in Verbindung **2** ermöglichte die Radiomarkierung mit dem Positronenemitter ¹⁸F (Verbindung [¹⁸F]**2**). Aufgrund dessen stellt der neue EphB4-Kinaseinhibitor gleichzeitig einen potentiellen Radiotracer für die In-vivo-Bildgebung von EphB4 dar. Die Darstellung der Zwischenverbindung, welche als Ausgangsverbindung für die ¹⁸F-Radiomarkierung dient, erfolgte durch die Reaktion von 3-(3-Chlorpropylsulfonyl)-anilin mit 2-Chlor-N-(5-chlorbenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)-pyrimidin-4-amin (b, Ausbeute: 90%). Im Rahmen eines Finkelstein-Austausches wurde das Chlor im entstandenen bisubstituierten Diamin durch Iod ersetzt (c, Ausbeute: 77%), welches anschließend im Dunkeln und bei Raumtemperatur mit *p*-Tosylat reagierte (d, Ausbeute: 61%). Die ¹⁸F-Radiomarkierung der *p*-tosylierten Zwischenverbindung erfolgte mittels nukleophiler Substitution der Tosylat-Gruppe durch [¹⁸F]Fluorid (e, Reaktionsbedingungen: Acetonitril, 15 min, 90°C, ohne Trägerzusatz).

⁵ Die Darstellung und Radiomarkierung von Verbindung **1** und **2** erfolgte durch Dr. Constantin Mamat.

⁶ Systematischer Name von Verbindung **1**: N⁴-(5-chlorbenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)-N²-(3-(methylsulfonyl)phenyl)pyrimidin-2,4-diamin

⁷ Systematischer Name von Verbindung **2**: N⁴-(5-chlorbenzo[d][1,3]dioxol-4-yl)-N²-(3-((3-fluorpropyl)sulfonyl)phenyl)pyrimidin-2,4-diamin

Verbindung **[¹⁸F]2** wurde nach der Radiosynthese mittels semipräparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, Eluent: Acetonitril/Wasser (1:1, v/v) + 0,1% TFA (v/v)) und einer *reversed phase*-C18-Kartusche gereinigt, in Ethanol aufgenommen und eingengt. Auf diese Weise wurde Verbindung **[¹⁸F]2** mit einer radiochemischen Reinheit von >95% (zerfallskorrigierte, radiochemische Ausbeute: 15%) erhalten. Verbindung **[¹⁸F]2** wurde nach der ¹⁸F-Radiomarkierung in ethanolischer Lösung bereitgestellt (93 - 174 MBq; 0,65 - 1,76 GBq/μmol) und für zelluläre Experimente mit komplettem DMEM verdünnt, so dass die Ethanol-Konzentration im Zellkulturmedium maximal 5% (v/v) betrug. Von den Verbindungen **1** und **2** wurden 100 mM Stammlösungen in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt, welche für alle weiteren Experimente verwendet wurden.

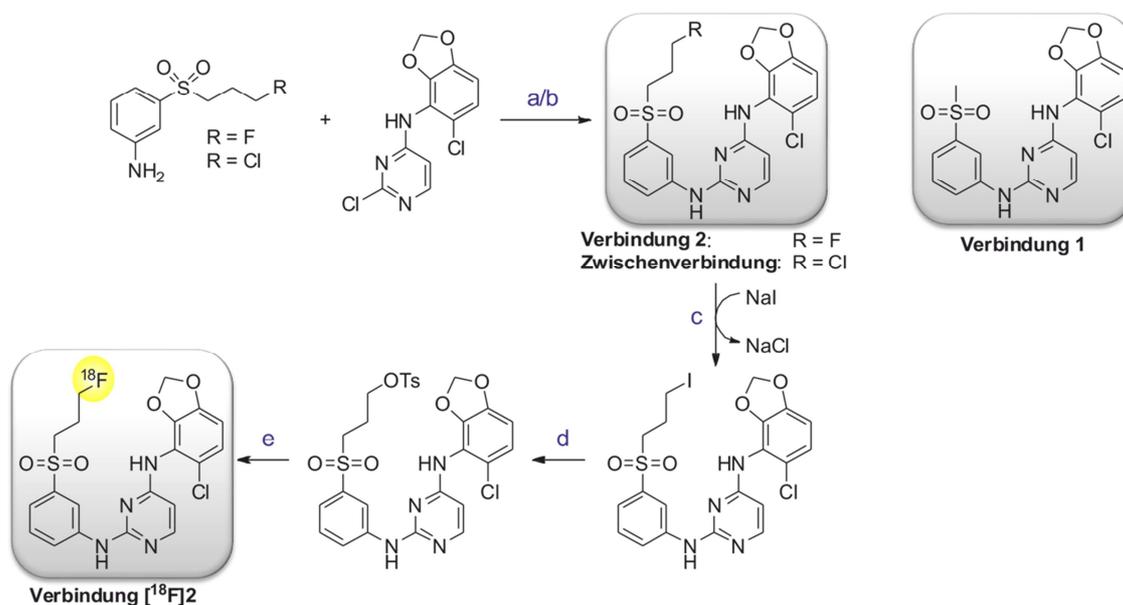


Abbildung 2-11: Schematischer Überblick zur Darstellung von Verbindung 2 sowie dessen ¹⁸F-Radiomarkierung

2.6.2 Untersuchung des Einflusses der Verbindungen **2** auf die Zellproliferation und Zellvitalität mittels MTT-Test

Der MTT-Test ist ein kolorimetrisches Verfahren zur Beurteilung der Zellproliferation und -vitalität. In lebenden Zellen kommt es aufgrund der Pyridin-haltigen Reduktionsäquivalente Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) sowie der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase zur Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliums Salzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan. Die Vorteile des MTT-Tests gegenüber der Wachstumskurve liegen in dem niedrigen Bedarf an Zellen und der zu testenden Substanz. Aufgrund dessen ist eine zeitgleiche Untersuchung mehrerer Einflussfaktoren möglich.

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde der Einfluss von Verbindungen **2** auf die Vitalität von A375-Melanomzellen untersucht. Verbindung **1** diente dabei als Vergleichssubstanz. Dazu wurden in jede Kavität einer 24well-Platte $2,5 \times 10^4$ A375-Zellen in 300 μl komplettem DMEM eingesät. Durch Verdünnung der 100 mM Stammlösungen von Verbindung **1** und **2** mit komplettem DMEM wurden 0; 0,025; 0,25; 2,5; 25 und 250 μM Arbeitslösungen hergestellt. Jeweils 200 μl dieser Arbeitslösungen wurden zu 300 μl Zellsuspension in die Kavitäten der 24well-Platten gegeben, so dass die finale Inhibitorkonzentration 0; 0,01; 0,1; 1; 10 und 100 μM betrug. Die Zellen wurden für 24, 48 oder 72 h in Anwesenheit der Inhibitoren kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden zu den 500 μl Zellkulturmedium je Kavität 55 μl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Zellkulturmedium vollständig abgenommen und je Kavität wurden 500 μl DMSO zugegeben. Mit Hilfe des DMSO wurde das von den Zellen metabolisierte MTT innerhalb von 15 min unter Schütteln aus den Zellen extrahiert und anschließend photometrisch quantifiziert ($\Delta\text{OD} = \text{OD}_{550} - \text{OD}_{690}$). Die Messung der OD_{690} ermöglichte den Abzug des Hintergrundes.

2.6.3 Untersuchung der zellulären Bindung und Aufnahme der Verbindung [^{18}F]**2**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde neben dem zeitlichen Verlauf auch der Einfluss verschiedener Substanzen (Verbindung **1** und **2**, Verapamil, Cyclosporin A, Natriumazid) auf die Zellbindung und -aufnahme von Verbindung [^{18}F]**2** untersucht. Die eingesetzten Substanzen wirken wie im Folgenden beschrieben und sollen somit der Aufklärung potentieller Aufnahmemechanismen dienen.

- Verbindung **1** und **2** bewirken aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit bzw. ihrer chemischen Identität zu Verbindung [**¹⁸F**]**2** eine kompetitive Hemmung der Radiotracer-Aufnahme.
- Verapamil und Cyclosporin inhibieren Proteine, die über eine Adenosintriphosphat (ATP) binding cassette (ABC) verfügen. Diese sogenannten ABC-Transporter bewirken die zelluläre Exkretion beispielsweise von Chemotherapeutika und führen zu dem Phänomen der *multidrug resistance* (MDR) [106, 107]. Darüber hinaus ist Verapamil ein Ca²⁺-Antagonist und könnte somit auch Ca²⁺-abhängige Transportprozesse inhibieren.
- Das Azid-Ion blockiert irreversibel die Sauerstoffbindungsstelle im aktiven Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase, was die Elektronen-Transportkette der Atmungskette und damit die ATP-Produktion inhibiert. Aufgrund dessen kommen ATP-abhängige Transportprozesse zum Erliegen.

Zur Untersuchung der zellulären Bindung und Aufnahme von Verbindung [**¹⁸F**]**2** wurden in jede Kavität einer 24well-Platte 5×10^4 A375-, A375-pIRES- bzw. A375-EphB4-Zellen in 500 μ l komplettem DMEM bzw. 500 μ l komplettem DMEM + 1,2 mg/ml G418 eingesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Zellkulturmedium vollständig entfernt und durch 250 μ l Inhibitorlösung (200 μ M Verbindung **1**, 200 μ M Verbindung **2**, 20 μ M Verapamil, 20 μ M Cyclosporin A, 30 mM Natriumazid bzw. DMSO 1:250 (v/v, Kontrolle) in komplettem DMEM) ersetzt. Mit Ausnahme von Natriumazid (1,5 M Stammlösung in PBS) lagen alle Inhibitoren in Form von höher konzentrierten Stammlösungen in DMSO vor (Verbindung **1** und **2**: 100 mM, Verapamil: 250 mM, Cyclosporin A: 10 mM) und wurden mit komplettem DMEM auf die oben genannte Konzentration verdünnt. Nach einer 30-minütigen Vorinkubation mit den Inhibitoren wurde zu jeder Kavität 250 μ l Radiotracerlösung (Verbindung [**¹⁸F**]**2** in komplettem DMEM) gegeben, so dass sich finale Inhibitorkonzentration von 100 μ M für Verbindung **1** und **2**, 10 μ M für Verapamil und Cyclosporin A sowie 15 mM für Natriumazid ergaben. Als Kontrolle diente DMSO, das in komplettem DMEM verdünnt wurde (1:500, v/v). Nach Zugabe von Verbindung [**¹⁸F**]**2** wurden die Zellen für 15, 30, 60 und 120 min bei 37°C kultiviert, wobei der Einfluss der Inhibitoren nur während der 60-minütigen Kultivierung untersucht wurde. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 500 μ l NaOH-SDS und durch 30-minütiges Schütteln bei Raumtemperatur wurden alle Zellen lysiert.

Die Bestimmung der Aktivität von je 250 μ l gut durchmischtem Zelllysat erfolgte mit dem Gamma-Radioaktivitätszähler Cobra II. Die Zerfalls-korrigierte Normierung der

Messwerte erfolgte mit Hilfe von 25 µl Radiotracerlösung nach Zusatz von 225 µl NaOH-SDS in einer Dreifachbestimmung (100% injizierte Dosis (ID)). Des Weiteren wurde in einer Doppelbestimmung die Proteinkonzentration von jeweils 25 µl Zelllysat ermittelt (siehe 2.4.3), was die Berechnung der ID/mg Protein erlaubte.

2.6.4 Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie⁸

Eine wichtige Bildgebungsmodalität in der nuklearmedizinischen Diagnostik, beispielsweise von Tumoren, stellt die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) dar. Nach der intravenösen Injektion von Verbindungen, die mit Positronen-emittierenden Radionukliden markiert sind, kommt es im Körper zur Annihilation der Positronen mit dort befindlichen Elektronen. Dabei werden zwei Gammaquanten in einem Winkel von 180° zueinander freigesetzt, die bei Koinzidenz vom Detektor registriert und zur Computer-gestützten Erzeugung eines dreidimensionalen Bildes verwendet werden (**Abbildung 2-12**).

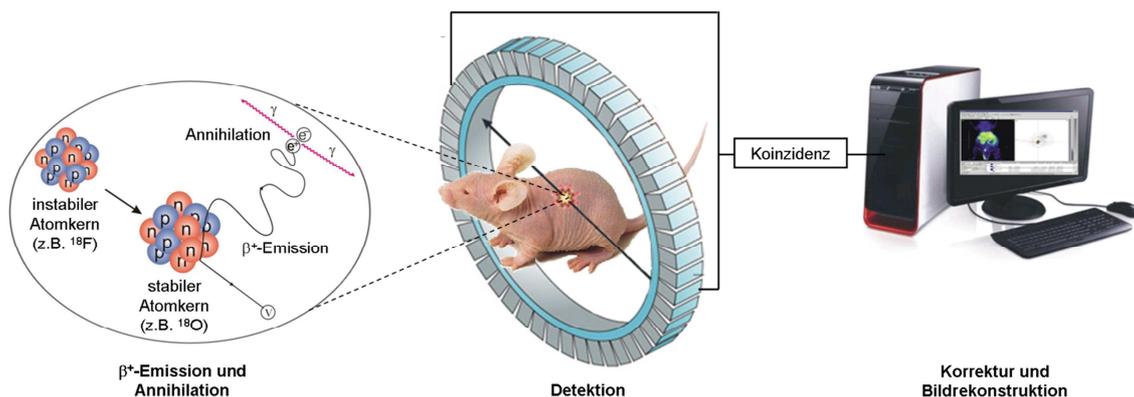


Abbildung 2-12: Versuchsaufbau und Messprinzip der PET nach der Injektion eines Radiotracers

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der PET die Verteilungskinetik von 2- ^{18}F Fluor-2-desoxy-D-glukose (^{18}F FDG), ^{18}F Fluormisonidazol (^{18}F FMISO) und Verbindung ^{18}F 2 sowie eine mögliche Anreicherung in den subkutanen A375-pIRES/EphB4-Tumoren auf den Oberschenkeln der NMRI (*nu/nu*)-Mäuse untersucht. Dazu wurde der Kleintier-Positronen-Emissions-Tomograph microPET P4 mit einer örtlichen Auflösung von 1,8 - 2,3 mm und einem FOV von circa 18 × 18 × 8 cm verwendet. Letzteres ermöglichte die simultane Erfassung des Körperstamms von vier Mäusen.

⁸ Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden den genehmigungsrechtlichen Bestimmungen entsprechend durch Herrn Dr. Ralf Bergmann und Prof. Dr. Jens Pietzsch durchgeführt.

Den Versuchstieren wurden unter Desfluran-Narkose 10 bis 30 MBq [^{18}F]FDG, [^{18}F]FMISO bzw. [^{18}F]2 in 300 μL Elektrolyt-Infusionslösung 153 innerhalb von 15 s in die Schwanzvene injiziert. Gleichzeitig wurde die dynamische PET-Messung mit einer Aufnahmedauer von 120 min ([^{18}F]FDG, [^{18}F]2) bzw. 240 min ([^{18}F]FMISO) gestartet. Zur Ermittlung der zeitabhängigen Verteilung der radioaktiv markierten Verbindungen in ausgewählten Organen wurden mit der Software Rover 2.0.50 (ABX GmbH, Radeberg) dreidimensionale *regions of interest* (ROIs), beispielsweise im Bereich der Tumoren, festgelegt und Zeit-Aktivitäts-Kurven der ROIs generiert. Die Zeit-Aktivitäts-Kurven geben die Konzentration radioaktiv markierter Substanzen im entsprechenden ROI normalisiert zu der injizierten Gesamtaktivität und dem Körpergewicht der Maus (standardisierte Aufnahmewerte im PET (SUV_{PET})) über der Zeit wieder. Alternativ wurde die Aktivitätskonzentration ohne Berücksichtigung des Körpergewichts der Maus als Bq/cm^3 dargestellt.

2.6.5 Bioverteilung⁹

Zusätzlich zur PET-Untersuchung wurde die In-vivo-Verteilung der Verbindung [^{18}F]2 genau 5 bzw. 60 min nach der Injektion in die Tumor-tragenden NMRI (*nu/nu*)-Mäuse untersucht. Dazu wurde den mit Desfluran narkotisierten Mäusen 0,5 - 1 MBq Verbindung [^{18}F]2 in 300 μL Elektrolyt-Infusionslösung 153 in die Schwanzvene injiziert. Nach 5 bzw. 60 min wurden die Tiere erneut anästhesiert und nach Entnahme der Blutproben durch Herzpunktion getötet. Die Organe und Gewebe wurden entnommen, gewogen und deren Aktivität im Gamma-Radioaktivitätszähler Wizard™3" gemessen. Die im jeweiligen Organ oder Gewebe gemessene Aktivität wurde auf die injizierte Aktivitätsmenge normalisiert und die SUV nach **Gleichung 4** berechnet.

$$\text{SUV} \left[\frac{\text{Impulse}}{\text{mg}} \right] = \frac{\text{Impulse pro Organ bzw. Gewebe}}{\text{injizierte Gesamtimpulse}} \times \text{Körpergewicht Maus [mg]} \quad (4)$$

2.6.6 Metabolitenanalyse¹⁰

Zur Untersuchung der metabolischen Stabilität wurden 30 MBq Verbindung [^{18}F]2 in 1 ml Elektrolyt-Infusionslösung 153 über die Schwanzvene in männliche Wistar-Ratten

⁹ Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden den genehmigungsrechtlichen Bestimmungen entsprechend durch Herrn Dr. Ralf Bergmann und Frau Regina Herrlich durchgeführt.

¹⁰ Die Metabolitenanalyse erfolgte durch Herrn Dr. Ralf Bergmann und Frau Andrea Suhr.

injiziert. Nach 3, 5, 10, 30, 60 und 120 min wurde den narkotisierten Ratten Blut über einen Katheter aus der rechten Femoral-Arterie entnommen und die darin enthaltenen Plasmaproteine durch Zusatz von 1,5 Äquivalenten eiskaltem Methanol präzipitiert. Nach der Zentrifugation für 3 min bei 11.000 x g wurde das Plasma abgenommen und unter Verwendung einer Zorbax 300SB-C18-Säule im Agilent 1100-HPLC-Systems mit integriertem UV- und Radioaktivitätsdetektor analysiert. In analoger Weise wurde der Dünndarminhalt der Ratten analysiert.

2.6.7 Autoradiographie

Nach den PET-Untersuchungen wurden die Mäuse getötet und eine Ganztierautoradiographie bzw. eine Autoradiographie der entnommenen Tumoren durchgeführt. Für die Ganztierautoradiographie wurden die Tumor-Mäuse in 5% Carboxymethylcellulose (w/v) eingebettet und mit flüssigem N₂ eingefroren. Bei -20°C wurden im Kryotom Leica Jung Cryopolyicut 80 µm-Koronalschnitte angefertigt. Diese wurden im Sublimator 400 gefriergetrocknet und anschließend für 80 min auf eine Radioluminographie-Detektionsplatte gelegt. Letztere wurde im Radioluminographie-Scanner BAS 5000 eingelesen und somit die Verteilung der Aktivität in den Körperschnitten sichtbar gemacht. Exakt formuliert handelt es sich bei der Autoradiographie also um die radioluminographische Auswertung von Platten, die für ionisierende Strahlung sensitiv sind.

Alternativ wurden die entnommenen Tumoren, wie in Kapitel siehe 2.7.1 beschrieben, eingefroren, geschnitten, getrocknet und ebenfalls im Radioluminographie-Scanner BAS 5000 eingelesen. Die Inkubationszeit der Schnitte mit der Radioluminographie-Detektionsplatte betrug 10 - 20 min ([¹⁸F]FDG) bzw. 60 min ([¹⁸F]2).

2.7 Histologische Methoden

2.7.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Für immunhistologische Untersuchungen wurden die subkutanen A375-pIRES/EphB4-Tumoren unverzüglich nach der Tötung der Mäuse entnommen, halbiert und eine Hälfte in 2-Methylbutan mit einer Temperatur von -28°C eingefroren. Von den auf einem Objekthalter fixierten Tumoren wurden im Kryostat Leica CM 1850 10 µm-Schnitte angefertigt. Diese wurden anschließend auf SuperfrostPlus-Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet.

2.7.2 Nachweis von Hoechst 33342 in Gefrierschnitten

Die Verteilung des DNA-interkalierenden Farbstoffes Hoechst 33342, der aufgrund seiner raschen Verteilung mit dem Blut und seiner begrenzten Diffusion durch Zellmembranen auch die Identifikation von funktionellen Blutgefäßen, beispielsweise in Tumoren, ermöglicht (siehe 2.5.4), wurde in den Gefrierschnitten der A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren analysiert. Dazu wurden diese am Mikroskop AxioImager.A1 unter Zuhilfenahme der dazugehörigen AxioVision-Software und dem Modul AutMess Plus mit Hilfe des DAPI-Filters (Anregung 365 nm, Emission 445/50 nm) im MosaiX-Modus fotografiert. Nach der Festlegung eines geeigneten Schwellwertes für die Farbe Blau wurde für alle fotografierten Tumorschnitte der prozentuale Anteil der Hoechst 33342-positiven Areale innerhalb eines ganzen Tumorschnittes ermittelt. Dabei wurden durch die Herstellung der Gefrierschnitte bedingte, falsch-positive Artefakte sowie angrenzendes Gewebe, wie z.B. Haut und Muskulatur, von der Auswertung ausgeschlossen.

2.7.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die zweite Hälfte jedes Tumors wurde direkt nach der Entnahme zur Fixierung für mindestens 24 h in PBS + 4% Paraformaldehyd (PFA) gegeben. Im Anschluss daran wurden die Tumoren 1 h in bidestilliertem Wasser gewaschen und mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 2 h 70% Ethanol (v/v), 2 x 2 h 85% Ethanol (v/v), über Nacht 96% Ethanol (v/v), 2 x 2 h 100% Ethanol, 1 x 2 h Isopropanol) entwässert. Danach wurden die Tumoren dreimal bis zum Absinken in Methylbenzoat und 1 h in einem Methylbenzoat-Paraffin (42 - 44°C)-Gemisch (1:1, v/v) inkubiert. Zur Einbettung in Paraffin wurden die Tumoren 2 x 2 h in Paraffin mit einer Schmelztemperatur von 42 - 44°C und über Nacht in Paraffin mit einer Schmelztemperatur von 58 - 60°C gegeben. Anschließend wurden die Tumoren in den entsprechenden Gefäßen eingebettet. Von den fixierten Tumoren wurden im Mikrom HM 340 E mit der Ausgießstation und Kühleinheit Mikrom EC 350-1/2 5 µM-Schnitte angefertigt. Die Tumorschnitte wurden im Wasserbad gestreckt, auf SuperfrostPlus-Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37 - 40°C getrocknet.

2.7.4 Nachweis von EphB4 in Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte der A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren wurden mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe (15 min Roti®-Histol, je 5 min 100% Ethanol, 96% Ethanol (v/v), 85% Ethanol (v/v) und 70% Ethanol (v/v)) deparaffiniert, 1 min in bidestilliertem Wasser gespült und anschließend für mindestens 5 min in PBS rehydriert. Zur Demaskierung des Antigens wurden die Paraffinschnitte für circa 5 min in 500 mM Tris-Puffer (pH 9,5) erhitzt, langsam abgekühlt und anschließend zweimal für 10 min in TBS-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Nach der 10-minütigen Hemmung der endogenen Peroxidase mit PBS + 1% H₂O₂ (v/v) bei Raumtemperatur wurden die Objektträger erneut zweimal für 10 min in TBS gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch die Überschichtung der Schnitte für 1 h bei Raumtemperatur mit Blockpuffer (TBS-T + 2% BSA (w/v) + 0,3% Magermilchpulver (w/v) + 0,1% Gelatine (w/v)). Anschließend wurden die Tumorschnitte über Nacht bei 4°C mit dem 1:25 (v/v) in Blockpuffer verdünnten EphB4-Antikörper (AF3038 (R&D)) inkubiert, 3 x 5 min in TBS-T gewaschen, für 1 h bei Raumtemperatur mit einem POD-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und erneut 3 x 5 min in TBS-T gewaschen. Die Visualisierung der EphB4-Färbung erfolgte durch den Umsatz von Diaminobenzidin (DAB) durch die POD innerhalb von 10 min bei Raumtemperatur. Überschüssiges DAB wurde durch 3 x 5 min Waschen in TBS-T entfernt. Anschließend wurden die Tumorschnitte kurz in bidestilliertem Wasser gespült, mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 5 min 70% Ethanol (v/v), 85% Ethanol (v/v), 96% Ethanol (v/v), 100% Ethanol, Roti®-Histol) entwässert und mit Roti®-Histokitt eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der EphB4-Färbung erfolgte am Mikroskop AxioImager.A1 und der dazugehörigen AxioVision-Software.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der OriginPro 8G-Software (OriginLab Corporation, Northampton (USA)) und der GraphPad Prism 3.0-Software (GraphPad Software, La Jolla (USA)). Nach Durchführung eines Ausreißertests nach Dixon wurden die Daten ohne Ausreißer in das Programm OriginPro 8G übertragen und dort mittels Varianzanalyse (einfache ANOVA) und Bonferroni-*Post-Hoc*-Test auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten geprüft. Statistisch signifikante Unterschiede sind im folgenden Ergebnisteil entsprechend gekennzeichnet (Irrtumswahrscheinlichkeit < 5% (p < 0,05)).

3 Ergebnisse

3.1 Genexpression von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei humanen Leukämie- und Melanomzellen

Aus der Familie der Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden wurden die Rezeptoren EphB4 und EphB6 sowie deren Ligand EphrinB2 ausgewählt, da diese für eine Reihe von Tumorerkrankungen von Bedeutung sind. Während der Zusammenhang zwischen der EphB4-Proteinbiosynthese und dem klinischen Fortschreiten beim Melanom kontrovers diskutiert wird [67, 68], kommt es im Verlauf der Melanomprogression zweifellos zum Verlust von EphB6 [75].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die mRNA-Expression von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei den ausgewählten Zellsystemen untersucht (siehe 2.2.3). Neben den Melanomzelllinien Mel-Juso, A375 und A2058 wurden als Modelle für Tumor-assoziierte inflammatorische Zellen THP-1, THP-1(M), HL-60, HL-60(M) und HL-60(G) verwendet. Bei allen untersuchten humanen Leukämie- und Melanomzellen konnte die mRNA-Expression von EphB4, EphB6 und EphrinB2 nachgewiesen werden (**Abbildung 3-1**).

Die Differenzierung von HL-60-Leukämiezellen zu Makrophagen-artigen Zellen (HL-60(M), siehe 2.3.10) ging mit einer signifikant verminderten EphB4-mRNA-Expression einher. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg der Genexpression von EphB6 und EphrinB2. Die Differenzierung von HL-60-Zellen zu Granulozyten-artigen Zellen (HL-60(G), siehe 2.3.10) führte zu einer verminderten EphB4- und EphB6-Genexpression, während die EphrinB2-mRNA-Expression unbeeinflusst blieb.

Bei der Differenzierung der THP-1-Zellen zu Makrophagen-artigen Zellen (THP-1(M), siehe 2.3.9) kam es, wie bei den HL-60-Zellen, zu einer signifikant verminderten EphB4- und zu einer signifikant erhöhten EphrinB2-mRNA-Expression. Analog zum EphB4-Rezeptor war auch die EphB6-mRNA-Konzentration bei THP-1(M) signifikant niedriger als bei THP-1-Zellen.

Bei den Melanomzelllinien Mel-Juso, A375 und A2058 wurde im Vergleich zu den Leukämiezellen und deren Differenzierungsformen eine deutlich höhere EphB4-mRNA-Konzentration nachgewiesen. Gleichzeitig exprimierten alle drei Melanomzelllinien nur sehr wenig EphB6. EphrinB2 hingegen wurde von den verschiedenen Melanomzellen unterschiedlich stark exprimiert, so dass bei A2058-Zellen signifikant höhere EphrinB2-mRNA-Konzentrationen nachgewiesen wurden als bei Mel-Juso- oder A375-Zellen.

Folglich zeigten die ersten Untersuchungen, dass es signifikante Unterschiede im Expressionsmuster von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei den verschiedenen Zelllinien gab. Darüber hinaus kam es, wie am Beispiel von EphB4 und EphB6 bei HL-60(M) gezeigt, insbesondere bei der Differenzierung der Leukämiezelllinien zu inflammatorischen Zellen zu einer teils gegensätzlichen Regulation der mRNA-Expression der Eph-Rezeptoren und deren Ligand EphrinB2.

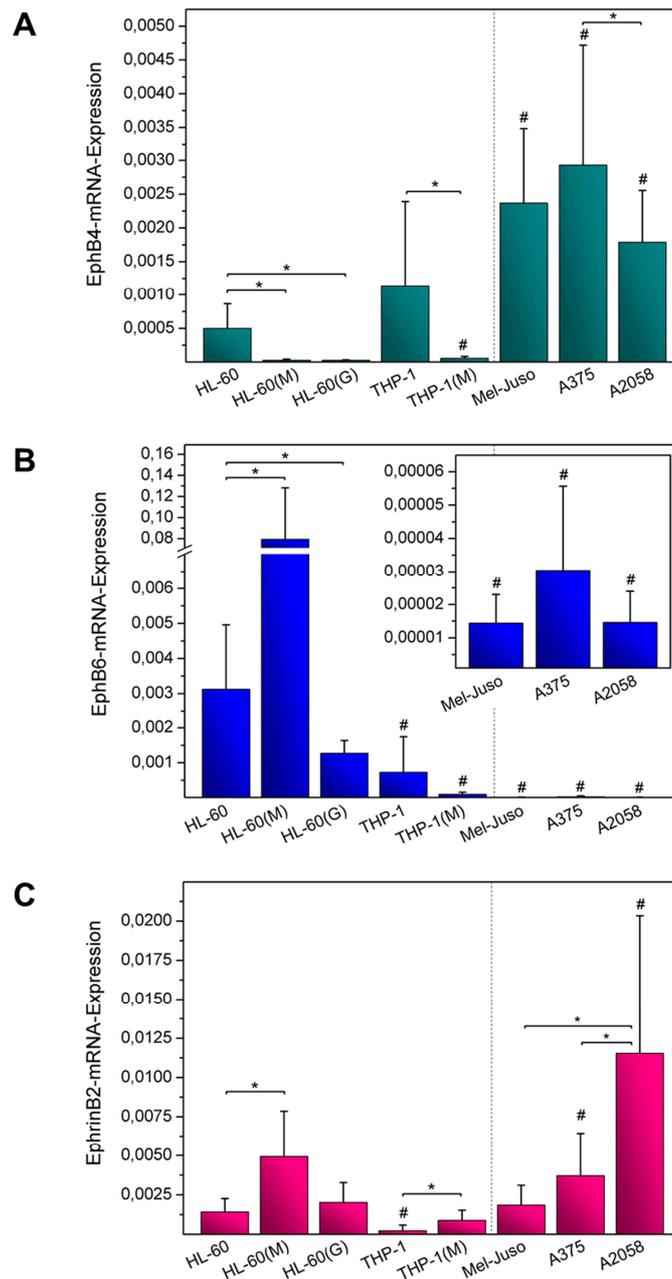


Abbildung 3-1: Genexpression von EphB4 (A), EphB6 (B) und EphrinB2 (C) bei humanen Leukämie- und Melanomzellen Die mRNA-Expression von EphB4, EphB6 und EphrinB2 wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten ($n=9$), die als $2^{-\Delta Ct}$ berechnet wurden. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * (bezogen auf die entsprechend gekennzeichneten Zellen) bzw. mit # (bezogen auf HL-60) gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test; $p \leq 0,05$).

3.2 Proteinbiosynthese von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei humanen Leukämie- und Melanomzellen

Um zu prüfen, ob die beobachteten Unterschiede in der Gen-Transkription auch in einer entsprechenden Translation der mRNA resultiert, wurde die EphB4-, EphB6- und EphrinB2-Proteinbiosynthese bei den oben genannten Zellsystemen durch SDS-PAGE und Western Blotting mit anschließender Immundetektion (siehe 2.4.4 und 2.4.5) untersucht. Da bei der Gewinnung der Gesamtzelllysate aus HL-60(G)-Zellen aufgrund des relativ geringen Prozentsatzes vollständig differenzierter Zellen nur geringe Proteinkonzentrationen erreicht wurden, die es nicht erlaubt hätten, den anderen Zelllinien äquivalente Proteinkonzentrationen einzusetzen, wurden die HL-60(G)-Zellen von der Untersuchung der Proteinbiosynthese ausgeschlossen.

Die Detektion von EphB6 und EphrinB2 in den Gesamtzelllysaten der untersuchten Zelllinien war mit den getesteten Antikörpern für EphB6 (Santa Cruz: sc-25461 und sc-7282) und EphrinB2 (Santa Cruz: sc-19227, sc-15397 und sc-1010, Novus Biologicals: NBP1-48551) aufgrund einer unspezifischen Bindung der Antikörper nicht möglich bzw. es wurden keine Banden bei der erwarteten Größe detektiert.

Auch die Detektion von EphB4 in den Zelllysaten war trotz einer aufgetragenen Proteinmasse von 80 bis 100 µg mit den anfangs getesteten Antikörpern (Santa Cruz: sc-5536 und Invitrogen: 37-1800) nicht möglich. Mit Hilfe eines Antikörpers von R&D (AF3038) konnte EphB4 schließlich bei den untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Allerdings konnte die Proteinbiosynthese von EphB4 auch mit Hilfe dieses Antikörpers nur bei den drei untersuchten Melanomzelllinien Mel-Juso, A375 und A2058 eindeutig gezeigt werden (**Abbildung 3-2**). Drei unabhängige Experimente ergaben, dass A375-Zellen tendenziell mehr EphB4 als Mel-Juso- und diese wiederum mehr EphB4 als A2058-Melanomzellen synthetisierten. Somit wurden die bei den Melanomzellen gefundenen Unterschiede bezüglich der EphB4-mRNA-Expression tendenziell auch auf Protein-Ebene bestätigt.

Durch die Detektion des Haushaltsproteins Aktin, das in der Regel einer konstitutiven Expression unterliegt, sollte der Auftrag gleicher Proteinmassen überprüft werden. Innerhalb der Melanomzellen waren die Aktin-Banden gut vergleichbar, so dass die hinsichtlich der EphB4-Proteinbiosynthese gefundenen Unterschiede nicht auf eine unterschiedliche Beladung der Gel-Taschen zurückzuführen waren.

In drei unabhängigen Experimenten war die Stärke der Aktin-Banden zwischen den Leukämie- und Melanomzellen trotz gleicher Proteinkonzentrationen nur bedingt vergleichbar. Dies deutete darauf hin, dass Aktin als Haushaltsprotein in den

Leukämiezelllinien, insbesondere für vergleichende Untersuchungen mit anderen Zelllinien, nur bedingt geeignet ist.

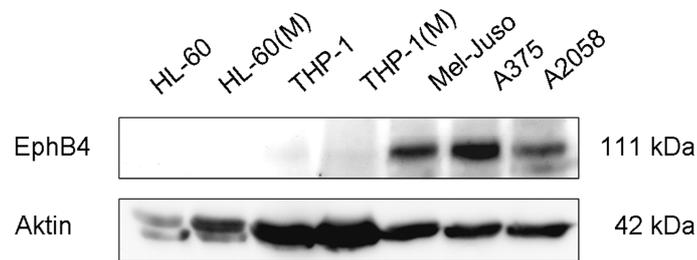


Abbildung 3-2: Proteinbiosynthese von EphB4 und Aktin bei humanen Leukämie- und Melanomzellen Die Proteinbiosynthese von EphB4 und Aktin wurde mittels SDS-PAGE, Western Blotting und anschließender Immundetektion bestimmt. Aktin diente dabei als Haushaltsprotein und damit als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinmassen. Dargestellt ist der Ausschnitt eines repräsentativen Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3 Kokultivierung humaner Melanomzellen mit HL-60(M)

3.3.1 Etablierung eines Kokultur-Modells mit anschließender Trennung der humanen Melanomzellen von den HL-60(M)-Zellen

In den Untersuchungen zur mRNA-Expression hatte sich gezeigt, dass es während der Differenzierung von HL-60-Leukämiezellen zu Makrophagen-artigen Zellen (HL-60(M)) zu interessanten regulativen Effekten gekommen war, die in einer signifikant verminderten EphB4- sowie einer signifikant erhöhten EphB6- und EphrinB2-mRNA-Expression resultierten. Aufgrund dessen sollte im Fortgang der Arbeit der Einfluss der Kokultivierung von humanen Melanomzellen mit HL-60(M) auf die metastatischen und inflammatorischen Eigenschaften der Zellen untersucht werden.

Zur Simulation der *in vivo* stattfindenden Interaktionen zwischen Tumorzellen und Tumor-infiltrierenden inflammatorischen Zellen wurden Mel-Juso-, A375- und A2058-Melanomzellen für 24 h gemeinsam mit HL-60(M)-Zellen kultiviert (siehe 2.3.11). Da es sich bei den Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden um membranständige Proteine handelt, sollte bei den Untersuchungen zwischen Zell-Zell-Kontakt-bedingten Effekten und Effekten bedingt durch lösliche Faktoren unterschieden werden. Dies wurde erreicht, indem alle Untersuchungen parallel zur Kokultur auch mit Überständen der verwendeten Zellen durchgeführt wurden.

Beispielsweise sollte der Einfluss der Kokultur mit HL-60(M) auf die Adhäsions- und Migrationsfähigkeit der Melanomzellen untersucht werden. Daher war es nötig, die verschiedenen Zellpopulationen nach der Kokultur in Suspension zu bringen (siehe 2.3.1), die einzelnen Zellpopulationen mittels Magnetseparation wieder zu trennen (siehe 2.3.11) und anschließend auf ihre Eigenschaften zu testen.

Grundlage für die Magnetseparation war die Auswahl eines geeigneten Antikörpers, der spezifisch an eine der beiden Zellpopulationen bindet. Für die Färbung und Isolierung der Melanomzellen erwies sich der Allophycocyanin (APC)- bzw. Phycoerythrin (PE)-gekoppelte Anti-Melanom (MCSP)-Antikörper als geeignet. Dieser erkennt das Melanom-assoziierte Chondroitinsulfat-Proteoglykan (MCSP) als Antigen. MCSP wurde auf Melanomzellen, nicht jedoch auf Karzinomzellen, Fibroblasten und hämatopoetischen Zellen gefunden [108-111].

Wie in **Abbildung 3-3** dargestellt ist, wurden sowohl native als auch transfizierte A375-Melanomzellen im Gegensatz zu HL-60- bzw. HL-60(M)-Zellen mit dem MCSP-Antikörper gefärbt. Während A2058-Zellen ebenfalls mit dem MCSP-Antikörper gefärbt wurden, zeigten Mel-Juso-Melanomzellen trotz ihres histologischen Ursprungs keine Färbung (Daten nicht im Detail dargestellt).

Die Verwendung eines PE-gekoppelten CD45-Antikörpers führte zur spezifischen Markierung der HL-60- und HL-60(M)-Zellen, während die A375-Melanomzellen (**Abbildung 3-3**) sowie die A2058- und Mel-Juso-Zellen (Daten nicht im Detail dargestellt) nicht gefärbt wurden. CD45 ist eine Tyrosin-Phosphatase, die mit Ausnahme von Erythrozyten, Thrombozyten und deren Vorläuferzellen auf allen hämatopoetischen Zellen zu finden ist.

Die Trennung der Melanomzellen von den HL-60(M)-Zellen wurde schließlich mittels negativer Depletion erreicht, das heißt die HL-60(M) wurden mit dem PE-gekoppelten CD45-Antikörper markiert und bei der anschließenden Magnetseparation mit Hilfe von anti-PE MACS® MicroBeads im Magnetfeld zurückgehalten. Im Gegensatz dazu konnten die Melanomzellen die Säule ungehindert passieren und standen für weiterführende Experimente zur Verfügung. Die Variante der negativen Depletion wurde gewählt, um eine für alle drei Melanomzelllinien vergleichbare Trennmethode zu etablieren. Dies wäre mit dem MCSP-PE-Antikörper nicht möglich gewesen, da dieser zu keiner Färbung der Mel-Juso-Zellen führte. Darüber hinaus konnte bei der negativen Depletion ein Einfluss der MACS® MicroBeads auf die zellulären Eigenschaften der Melanomzellen ausgeschlossen werden, da insbesondere für die Untersuchung des Migrationsverhaltens der Melanomzellen deren Größe und Motilität entscheidend ist.

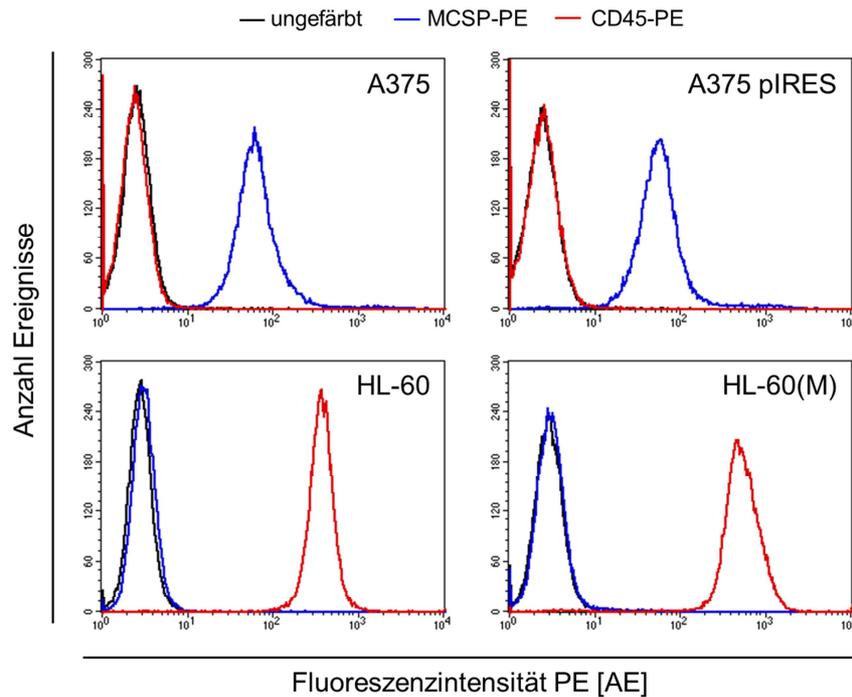


Abbildung 3-3: Proteinbiosynthese von MCSP und CD45 bei ausgewählten humanen Leukämie- und Melanomzellen Die Proteinbiosynthese von MCSP (blaue Linie) und CD45 (rote Linie) wurde mittels Durchflusszytometrie nach vorheriger Immundetektion unter Verwendung eines PE-gekoppelten MCSP- bzw. CD45-Antikörpers im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle (schwarze Linie) bestimmt. Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten im PE-Filter (Anregung 488 nm, Emission 585/42 nm) des Durchflusszytometers.

3.3.2 Einfluss der Kokultur auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten der humanen Melanomzellen

Um den Einfluss der Interaktion zwischen inflammatorischen Zellen und Melanomzellen auf das Metastasierungspotential Letzterer zu untersuchen, wurden Mel-Juso-, A375- sowie A2058-Melanomzellen für 24 h mit HL-60(M)-Zellen bzw. mit HL-60(M)-konditioniertem Medium kultiviert. Die Verwendung von HL-60(M)-konditioniertem Medium diente der Unterscheidung zwischen löslichen und Membran- gebundenen Einflussfaktoren. Nach 24 h wurden die Zellen in Suspension gebracht, mittels Magnetseparation von den HL-60(M)-Zellen getrennt (siehe 2.3.11) und auf ihr Adhäsions- und Migrationsverhalten untersucht.

3.3.2.1 Adhäsionsassay

Um den Einfluss der HL-60(M)-Zellen auf die Adhäsionsfähigkeit der humanen Melanomzelllinien Mel-Juso, A375 und A2058 an das ECM-Protein Fibronectin zu untersuchen, wurden diese im Anschluss an die Trennung für eine bestimmte Zeit in einer Fibronectin-beschichteten 24well-Platte kultiviert (siehe 2.3.12.1).

Der Vergleich der Zelllinien Mel-Juso, A375 und A2058 ergab, dass sich Mel-Juso-Zellen am langsamsten und A375-Zellen am schnellsten an Fibronectin anhafteten (Daten nicht im Detail dargestellt). Aufgrund dessen wurde für nachfolgende Adhäsionsassays eine für die jeweilige Zelllinie optimale Kultivierungszeit ausgewählt (Mel-Juso: 120 min, A375: 40 min, A2058: 60 min).

Wie in **Abbildung 3-4 (A)** dargestellt ist, wurde die Fähigkeit der Zelllinie Mel-Juso an die mit Fibronectin-beschichtete Oberfläche zu adhären weder durch die Kultur der Zellen in HL-60(M)-konditioniertem Medium noch durch die Kokultur mit HL-60(M)-Zellen beeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten die Melanomzelllinien A375 und A2058 infolge der genannten Kulturbedingungen ein verändertes Adhäsionsverhalten. Während die Adhäsion der A375-Zellen nach der Kultur in HL-60(M)-konditioniertem Medium signifikant erhöht war, konnte sowohl bei den A375- als auch bei den A2058-Zellen eine verminderte Adhäsion an Fibronectin beobachtet werden, wenn die Zellen zuvor 24 h mit HL-60(M)-Zellen kokultiviert wurden.

Fibronectin ist ein wichtiges Protein der ECM, das für die Adhäsion von Zellen an Zellmatrixbestandteile verantwortlich ist. Aufgrund dessen könnten die Befunde darauf hinweisen, dass HL-60(M)-Zellen in der Lage sind, die Adhäsion von Melanomzellen an die Basalmembran zu vermindern und somit deren Invasions- und Metastasierungspotential zu erhöhen. Da die Inkubation von A375- und A2058-Zellen mit dem Überstand der HL-60(M)-Zellen zu keiner Reduktion der Adhäsion geführt hatte, schien der Effekt in der Kokultur durch direkten Zell-Zell-Kontakt bedingt gewesen zu sein.

3.3.2.2 Migrationsassay

Mit Hilfe des Boyden-Kammer-Assays (siehe 2.3.13.1) wurde untersucht, ob die Kokultivierung der Melanomzellen mit den HL-60(M)-Zellen neben dem Adhäsions- auch das Migrationsverhalten der Melanomzellen beeinflusst. Um zwischen löslichen und Membran-gebundenen Faktoren unterscheiden zu können, wurde gleichzeitig untersucht, wie stark die monokultivierten Melanomzellen migrieren, wenn sich im unteren Kompartiment der Kavität $0,4 \times 10^6$ adhären HL-60(M)-Zellen befinden, die lösliche, als chemotaktischer Stimulus wirkende Faktoren sezernieren.

Wie in **Abbildung 3-4 (B)** zu sehen ist, wurde die Fähigkeit der A375-Melanomzellen durch eine Membran mit 8 μm großen Poren zu migrieren weder durch die Kokultur mit HL-60(M)-Zellen noch durch Faktoren, die von den HL-60(M)-Zellen sezerniert wurden, beeinflusst. Im Gegensatz dazu beeinträchtigte die Kokultur mit HL-60(M)-Zellen das Migrationsverhalten der Mel-Juso- und A2058-Melanomzellen signifikant. Darüber hinaus war die Migration der A2058-Zellen ebenfalls signifikant vermindert, wenn sich

HL-60(M)-Zellen im unteren Kompartiment der Kavität befanden. Dies spricht dafür, dass der Effekt in den A2058-Zellen durch lösliche Faktoren bedingt gewesen sein könnte, während bei den Mel-Juso-Zellen direkte Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle gespielt zu haben scheinen.

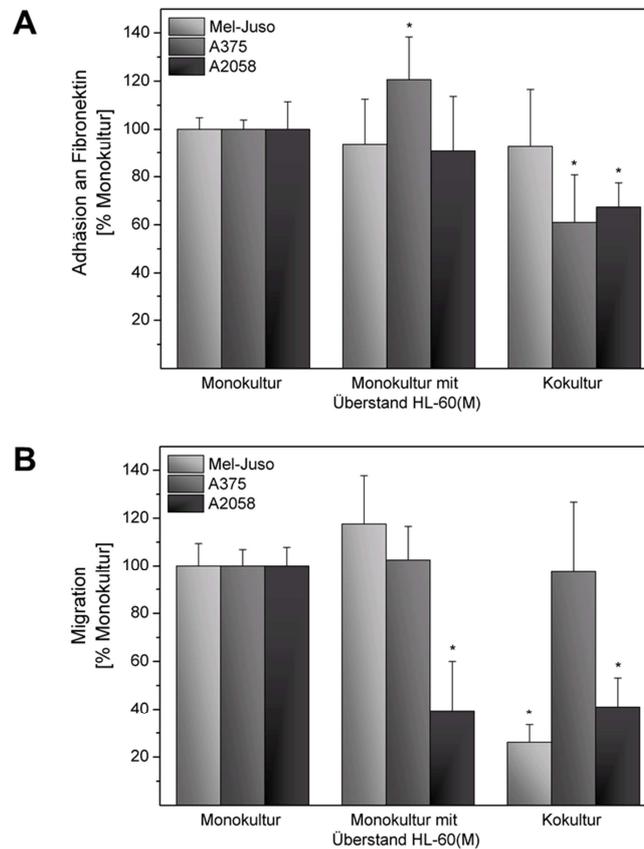


Abbildung 3-4: Einfluss der Kultur in HL-60(M)-konditioniertem Medium und der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen auf die Adhäsion an Fibronektin (A) und die Migration (B) von Mel-Juso-, A375- und A2058-Melanomzellen Die Melanomzellen wurden für 24 h unter den angegebenen Bedingungen kultiviert, mittels Magnetseparation von den HL-60(M)-Zellen getrennt und anschließend auf ihre Fähigkeit zur Adhäsion an Fibronektin (A) und zur Migration durch eine Membran mit 8 µm großen Poren (B) untersucht. Die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=12 (A) bzw. n=6 (B)) sind als Prozentwert der unbehandelten Zellen (Monokultur) dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-*Post-Hoc*-Test; $p \leq 0,05$).

3.3.3 Einfluss der Kokultur auf die Sekretion von Interleukin-6 durch die humanen Leukämie- und Melanomzellen

Die Untersuchung des Adhäsions- und Migrationsverhaltens der Melanomzellen hatte ergeben, dass dieses Verhalten zum Teil durch lösliche Faktoren beeinflusst wurde. Dies könnten etwa Zytokine, wie z.B. IL-6, sein. Aufgrund dessen wurde mit Hilfe eines ELISA untersucht, ob die Kultur der Melanomzellen mit den HL-60(M)-Zellen bzw. mit deren Überstand die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 beeinflusst.

Wie in **Abbildung 3-5 (A)** dargestellt, war die Sekretion von IL-6 unter normalen Kulturbedingungen (Monokultur) in HL-60(M)-Zellen und in den drei Melanomzelllinien gering. Im Vergleich zu Mel-Juso- und A375-Zellen sezernierten A2058-Zellen signifikant mehr IL-6. Während die Kokultivierung der Mel-Juso-Zellen mit den HL-60(M)-Zellen keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion hatte, kam es bei der Kokultur von A375- und A2058-Zellen mit den HL-60(M)-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand. Um unterscheiden zu können, ob durch die Zellen sezernierte oder aber Membran-gebundene Faktoren zu dem signifikanten Anstieg der IL-6-Sekretion geführt hatten, wurden die Zellen parallel zur Kokultur in konditioniertem Medium der Zelllinie, die auch für die Kokultur-Versuche verwendet wurde, kultiviert. Bei beiden Zelllinien war die IL-6-Sekretion im Vergleich zur Kokultur jeweils tendenziell bzw. signifikant geringer wenn HL-60(M)- bzw. A375-/A2058-konditioniertes Medium verwendet wurde. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Sekretion von IL-6 im Vergleich zur Kultur der HL-60(M)-Zellen mit dem Überstand von A375- bzw. A2058-Zellen jeweils tendenziell höher war, wenn die A375- bzw. A2058-Zellen in HL-60(M)-konditioniertem Medium kultiviert wurden.

Um erste Hinweise auf die Beteiligung einer EphB4-Aktivierung an den beobachteten Effekten zu erhalten, wurde der Einfluss eines aus der Literatur bekannten (Verbindung 1) sowie eines im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten EphB4-Kinaseinhibitors (Verbindung 2) auf die IL-6-Sekretion in der Kokultur von A375- bzw. A2058-Zellen mit HL-60(M)-Zellen untersucht. Bei einer Konzentration von 1 μ M führten beide Inhibitoren jedoch zu keiner Veränderung der IL-6-Sekretion (**Abbildung 3-5 (B)**).

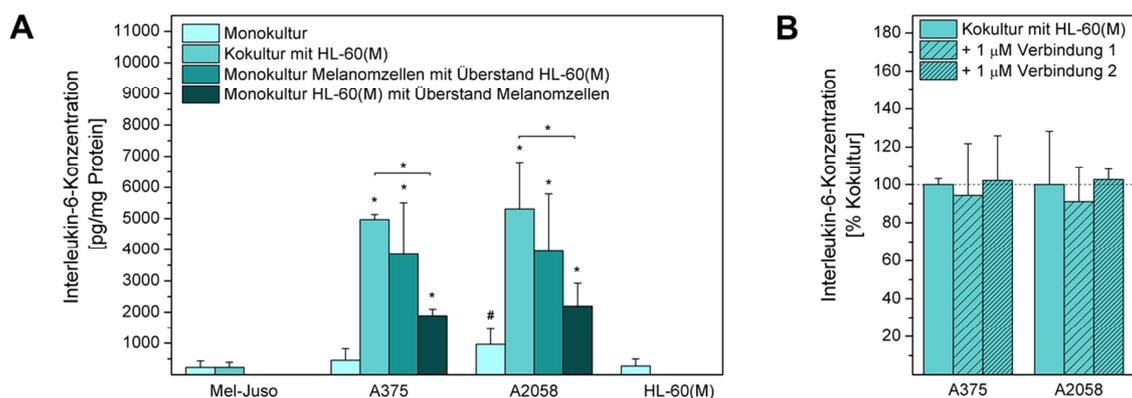


Abbildung 3-5: Sekretion von IL-6 bei humanen Leukämie- und Melanomzellen Die Sekretion von IL-6 wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten ($n=4$). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * (bezogen auf die entsprechend gekennzeichneten Zellen) bzw. mit # (bezogen auf Mel-Juso) gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-*Post-Hoc*-Test; $p \leq 0,05$).

3.4 Überexpression von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei A375-Melanomzellen

3.4.1 Fluoreszenzmikroskopie und FACS

Um den Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 unter anderem auf die metastatischen Eigenschaften der Melanomzellen untersuchen zu können, wurden A375-Melanomzellen mit einer erhöhten EphB4-, EphB6- oder EphrinB2-mRNA-Expression und -Proteinbiosynthese generiert. Dazu wurden die Zellen mit den eukaryotischen Expressionsvektoren pIRES2-AcGFP1 (Kontrolle) bzw. pIRES2-AcGFP1-EphB4, -EphB6 und -EphrinB2 transfiziert (siehe 2.3.5). Aufgrund der vom pIRES2-AcGFP1-Vektor (im Folgenden kurz als pIRES bezeichnet) codierten IRES-Sequenz kam es in den transfizierten Zellen zu einer polycistronischen Expression der mRNA für das eingefügte Eph bzw. Ephrin und das vom Plasmid codierte GFP. Es kann also davon ausgegangen werden, dass beide Proteine gleichermaßen synthetisiert werden. Aufgrund dessen wurde die Proteinbiosynthese von GFP zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion und zur Selektion der transfizierten Zellen (siehe 2.3.6 und 2.3.7) genutzt.

Lichtmikroskopisch wurden keine Unterschiede in der Morphologie der nativen und transfizierten A375-Zellen festgestellt (**Abbildung 3-6 (A)**). Im Gegensatz zur mittleren Fluoreszenzintensität der A375-pIRES- und A375-EphB4-Zellen zeichneten sich die A375-EphB6- und A375-EphrinB2-Zellen durch eine höhere Fluoreszenzintensität aus (**Abbildung 3-6 (B)**). Wie in **Abbildung 3-6 (C)** dargestellt ist, waren nach acht- bis elfmaliger Separierung der GFP-positiven Zellen mit Hilfe des Zellsorters FACSAria™ II über 98% (A375-pIRES/ -EphB4/ -EphrinB2) bzw. über 94% (A375-EphB6) der transfizierten A375-Zellen GFP-positiv. Insbesondere die A375-pIRES-Zellen zeigten eine hohe Transfektionsstabilität und waren noch nach über vier Wochen in Kultur zu etwa 99% GFP-positiv. Trotz der fortwährenden Antibiotika-Selektion mit G418 kam es bei den A375-EphrinB2-Zellen zu einer relativ schnellen Abnahme der GFP-Proteinbiosynthese, so dass die Zellen nach circa vier Wochen verworfen und durch frisch aufgetaute Zellen ersetzt wurden.

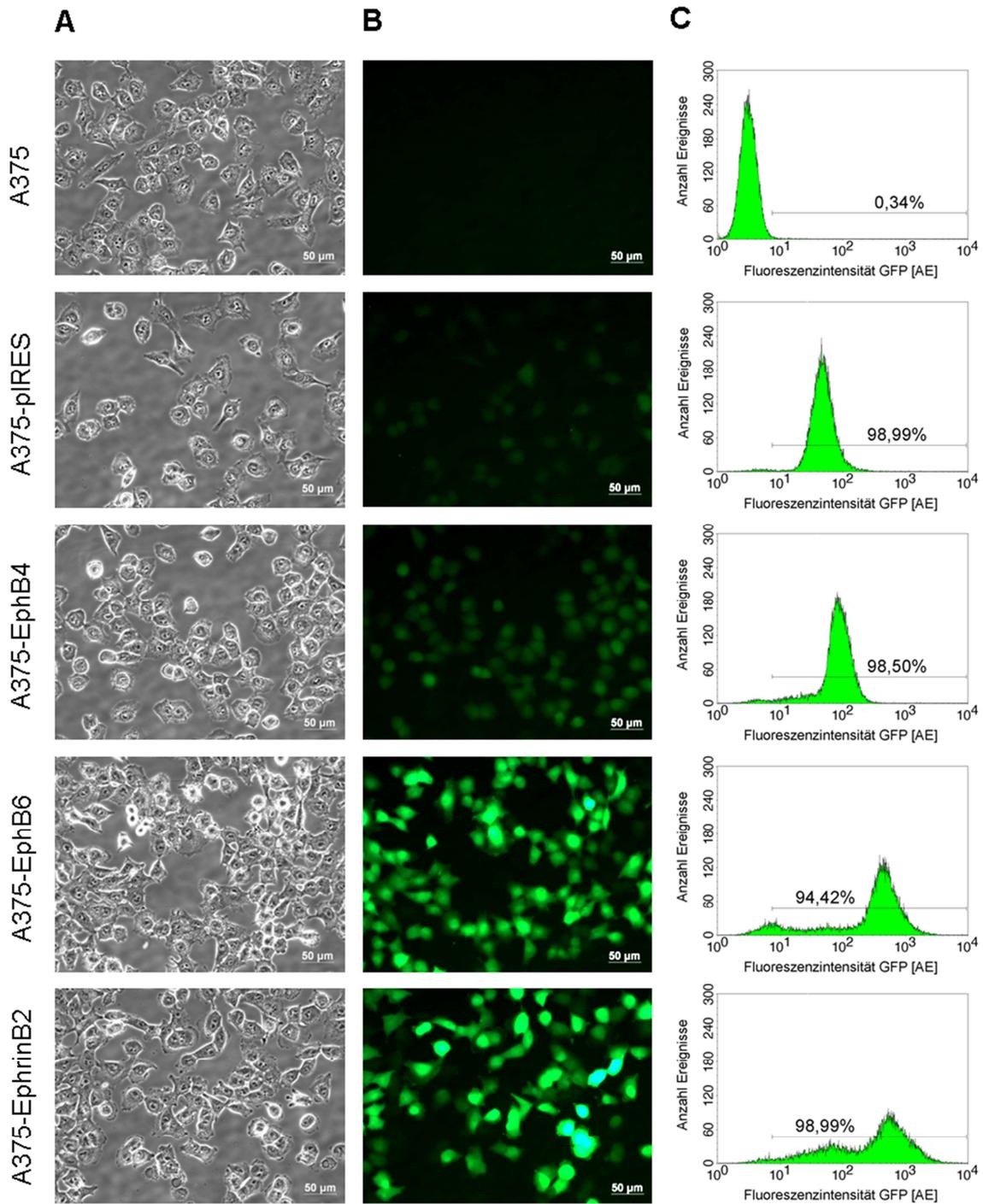


Abbildung 3-6: Lichtmikroskopische (A), fluoreszenzmikroskopische (B) und durchflusszytometrische Darstellung (C) von nativen und transfizierten A375-Zellen (A/B) Die Zellen wurden auf Glas-Objektträgern mit einem Polystyrol-8-Kammer-Aufsatz kultiviert und bei konstanter Belichtungszeit licht- und fluoreszenzmikroskopisch fotografiert. (C) Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde mittels FACS analysiert. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen ist im jeweiligen Histogramm dargestellt.

3.4.2 mRNA-Expression von EphB4, EphB6 und EphrinB2

Zum Nachweis der Überexpression von EphB4, EphB6 bzw. EphrinB2 bei den transfizierten A375-Melanomzellen wurde aus diesen RNA isoliert und mittels qRT-PCR die mRNA-Konzentration von EphB4, EphB6 und EphrinB2 im Vergleich zum Haushaltsgen β -Aktin bestimmt (siehe 2.2.1 und 2.2.3).

Bei den A375-EphB4-Zellen konnte im Vergleich zu den nicht-transfizierten A375-Zellen eine etwa fünffach höhere EphB4-mRNA-Konzentration nachgewiesen werden (**Abbildung 3-7 (A)**). Die Transfektion der A375-Melanomzellen mit dem Plasmid pIRES2-AcGFP1-EphB6 resultierte in einer etwa 1.000-fach erhöhten EphB6-mRNA-Expression (**Abbildung 3-7 (B)**). Die Transfektion der A375-Zellen mit dem pIRES2-AcGFP1-EphrinB2-Konstrukt führte zu einer circa 60-fach höheren EphrinB2-mRNA-Konzentration in den Zellen (**Abbildung 3-7 (C)**). Interessanterweise ging die erhöhte EphrinB2-mRNA-Expression in den A375-EphrinB2-Zellen mit einer signifikant erhöhten EphB6-mRNA-Expression einher (**Abbildung 3-7 (B)**).

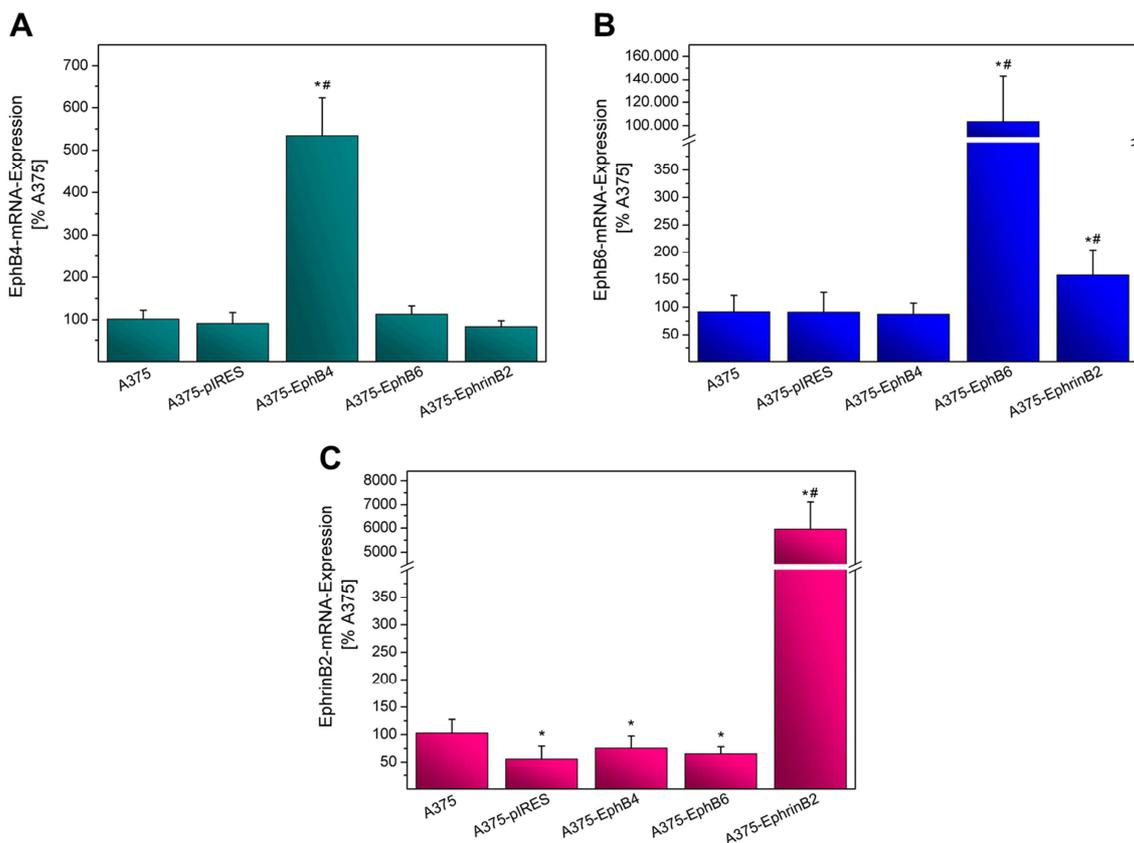


Abbildung 3-7: Genexpression von EphB4 (A), EphB6 (B) und EphrinB2 (C) bei nativen und transfizierten A375-Melanomzellen Die mRNA-Expression von EphB4, EphB6 und EphrinB2 wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=9), die als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ berechnet wurden. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * (bezogen auf A375) bzw. mit # (bezogen auf A375-pIRES) gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-*Post-Hoc*-Test; $p \leq 0,05$).

3.4.3 Proteinbiosynthese von EphB4, EphB6 und EphrinB2

Mittels SDS-PAGE, Western Blotting und anschließender Immundetektion (siehe 2.4.4 und 2.4.5) wurde gezeigt, dass die erhöhte EphB4- bzw. EphB6-mRNA-Expression der A375-EphB4- bzw. A375-EphB6-Melanomzellen auch in einer erhöhten Biosynthese des jeweiligen Proteins resultierte (**Abbildung 3-8**). Die Detektion von EphrinB2 in den nativen und transfizierten A375-Zellen war mit den getesteten Antikörpern (Santa Cruz: sc-19227, sc-15397 und sc-1010, Novus Biologicals: NBP1-48551) nicht möglich, da keine Bande bei etwa 37 kDa, was der Molmasse von EphrinB2 entspricht, nachgewiesen wurde. Stattdessen führten die verwendeten Antikörper zu unspezifischen Banden bei 50 bzw. 70 kDa (Daten nicht im Detail dargestellt).

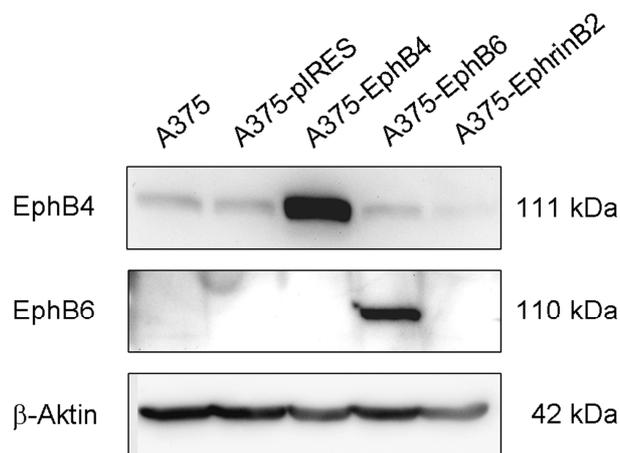


Abbildung 3-8: Proteinbiosynthese von EphB4, EphB6 und β -Aktin bei nativen und transfizierten A375-Melanomzellen Die Proteinbiosynthese von EphB4, EphB6 und β -Aktin wurde mittels SDS-PAGE, Western Blotting und anschließender Immundetektion bestimmt. β -Aktin diente dabei als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinkonzentrationen. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt eines repräsentativen Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

3.4.4 Proliferationsverhalten

Das Proliferationsverhalten der nativen und transfizierten A375-Zellen wurde durch die Bestimmung der Zellzahl und -vitalität bis zum Tag sieben nach Aussaat der Zellen in eine 6well-Platte untersucht. Im Vergleich zu den nativen A375-Zellen zeigten alle transfizierten Zellen ein vermindertes Proliferationsverhalten, was zu signifikant niedrigeren Zellzahlen am Tag sieben nach Aussaat der Zellen führte. Der Vergleich der transfizierten A375-Zellen untereinander ergab, dass nur die Überexpression von EphB4 zu einer veränderten Zellproliferation geführt hatte, die im Vergleich zu den A375-pIRES-Zellen signifikant erhöht war (**Abbildung 3-9**).

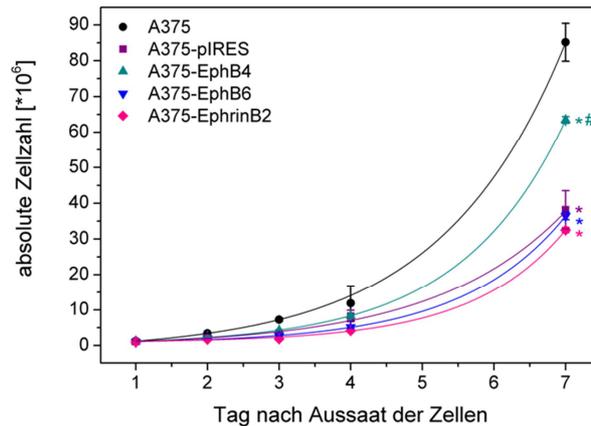


Abbildung 3-9: Proliferationsverhalten von nativen und transfizierten A375-Melanomzellen Das Proliferationsverhalten der Zellen wurde durch Bestimmung der absoluten Zellzahl am Tag eins, zwei, drei, vier und sieben nach Aussaat der Zellen mit Hilfe des Casy® Model TT ermittelt. Dargestellt sind die repräsentativen Wachstumskurven aus einem von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwerte \pm Standardabweichungen sowie nicht-lineare Kurvenanpassung ($y = y_0 + A_1 \times e^{(x-x_0)/t_1}$), $n=4$). Statistisch signifikante Unterschiede am Tag sieben nach Aussaat der Zellen wurden mit * (bezogen auf A375) bzw. mit # (bezogen auf A375-pIRES) gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-*post-hoc*-Test; $p \leq 0,05$)

3.5 Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten von A375-Melanomzellen

3.5.1 Einfluss auf die Adhäsion

3.5.1.1 Adhäsion an Fibronektin

In **Abbildung 3-10 (A)** ist die Adhäsion der nativen und transfizierten A375-Melanomzellen an das ECM-Protein Fibronektin dargestellt. Im Vergleich zu den transfizierten A375-Zellen zeigten die nativen A375-Melanomzellen eine signifikant schwächere Adhäsion an Fibronektin. Der Vergleich der EphB4-, EphB6- und EphrinB2-überexprimierenden A375-Melanomzellen mit den A375-pIRES-Zellen ergab, dass nur die erhöhte Proteinbiosynthese von EphB4 zu einer signifikant erhöhten Adhäsion der Zellen an eine Fibronektin-beschichtete Oberfläche führte.

3.5.1.2 Adhäsion an HL-60(M)-Zellen

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf die Interaktion zwischen Melanomzellen und Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen untersucht werden sollte, wurde ein Adhäsionsassay an HL-60(M)-Zellen etabliert. Dazu wurden die Melanomzellen mit Calcein-AM gefärbt, für 30 min mit

HL-60(M) inkubiert und anschließend durch Auswertung der Fluoreszenzintensität die Adhäsion der A375-Melanomzellen an die HL-60(M) bestimmt (siehe 2.3.12.2).

Wie in **Abbildung 3-10 (B)** dargestellt ist, zeigten die A375-pIRES-Zellen im Vergleich zu allen anderen untersuchten Zellen eine signifikant erhöhte Adhäsion an HL-60(M)-Zellen. Zwischen den EphB4-, EphB6- und EphrinB2-überexprimierenden Zellen wurden jedoch keine Unterschiede festgestellt. Im Vergleich zu den nativen A375-Melanomzellen hingegen war die Adhäsion der A375-EphB4-Zellen signifikant erhöht.

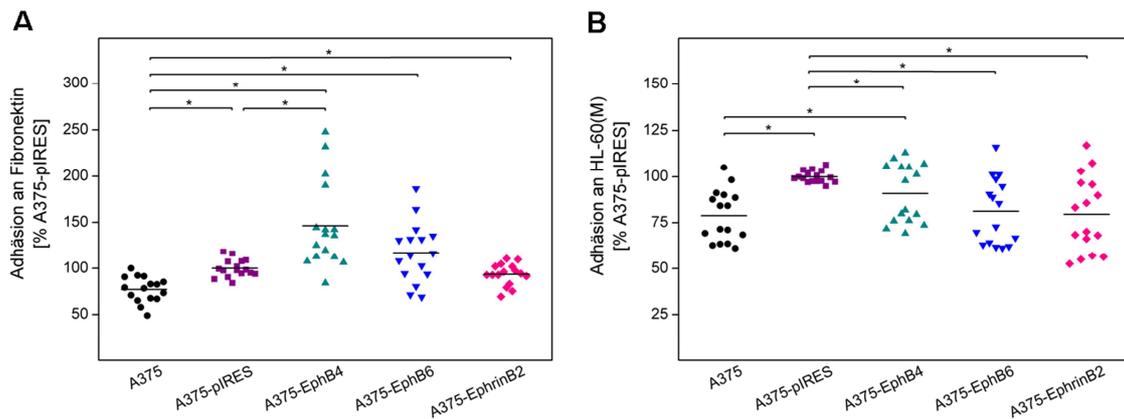


Abbildung 3-10: Adhäsion von nativen und transfizierten A375-Zellen an Fibronektin (A) und HL-60(M)-Zellen (B) (A) Die Adhäsion von nativen und transfizierten A375-Zellen an eine mit Fibronektin beschichtete Oberfläche wurde durch die Färbung aller adhärenen Zellen mit Kristallviolett sowie die nachfolgende Extraktion und photometrische Bestimmung des Farbstoffes ermittelt ($\Delta OD = OD_{550} - OD_{650}$). (B) Die Adhäsion von nativen und transfizierten A375-Zellen an HL-60(M)-Zellen wurde durch vorherige Calcein-AM-Färbung der Melanomzellen und die anschließende Bestimmung der Fluoreszenz im Lysat aller adhärenen Zellen bestimmt (Anregung 485/20 nm, Emission 528/20 nm). In den Diagrammen sind die Einzelwerte aus vier unabhängigen Experimenten ($n=16$) prozentual zu den A375-pIRES-Zellen dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-*Post-Hoc*-Test; $p \leq 0,05$).

3.5.2 Einfluss auf die Migration

3.5.2.1 Boyden-Kammer-Assay

Ferner wurde der Einfluss der erhöhten EphB4-, EphB6- und EphrinB2-Proteinbiosynthese auf die Migration der A375-Melanomzellen untersucht. Um zwischen löslichen und Membran-gebundenen Einflussfaktoren unterscheiden zu können, wurden die Melanomzellen, analog zum Adhäsionsassay, gemeinsam mit HL-60(M)-Zellen bzw. mit deren Überstand kultiviert. Im Gegensatz zum Migrationsassay mit den Mel-Juso-, A375- und A2058-Zellen (siehe 2.3.13.1 und 3.3.2.2) befanden sich die HL-60(M)-Zellen beim Migrationsassay mit den transfizierten A375-Zellen jedoch nicht als chemotaktischer Stimulus im unteren Kompartiment der Kavität. Vielmehr wurden die transfizierten A375-Melanomzellen parallel zur Kokultur

für 24 h mit HL-60(M)-konditioniertem Zellkulturmedium kultiviert, um einen sofortigen Kontakt mit HL-60(M)-sezernierten Faktoren und damit eine bessere Vergleichbarkeit der Kultivierungszeiten zu gewährleisten. Bei dem sich anschließenden Boyden-Kammer-Assay diente FKS im unteren Kompartiment der Kavität als chemotaktischer Stimulus.

Im Vergleich zu den nativen A375-Zellen, zeigten sowohl die A375-pIRES- als auch die A375-EphB6- und A375-EphrinB2-Zellen eine signifikant verminderte Migration zu FKS (**Abbildung 3-11**). Der Vergleich mit den A375-pIRES-Zellen ergab, dass nur die Überexpression von EphB4 zu einer signifikant erhöhte Migration durch den ThinCert™ Zellkultur-Einsatz geführt hatte. Die Transfektion der A375-Zellen mit dem pIRES2-AcGFP1-EphB6- bzw. -EphrinB2-Konstrukt hingegen führte im Vergleich zu den A375-pIRES-Zellen zu einer tendenziell erhöhten bzw. erniedrigten Migration.

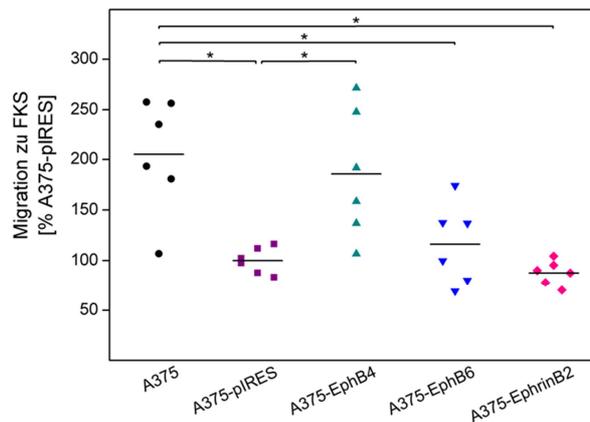


Abbildung 3-11: Migration von nativen und transfizierten A375-Melanomzellen im Boyden-Kammer-Assay Die Migration der nativen und transfizierten A375-Zellen durch eine Membran mit 8 µm großen Poren wurde durch die Färbung der innerhalb von 24 h migrierten Zellen mit Calcein-AM sowie die nachfolgende Extraktion und photometrische Bestimmung des Fluoreszenzfarbstoffes ermittelt (Anregung 485/20 nm, Emission 528/20 nm). Im Diagramm sind die Einzelwerte und der daraus berechnete Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten (n=6) prozentual zu den A375-pIRES-Zellen dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test; $p \leq 0,05$).

3.5.2.2 Wundheilungsassay

Eine weitere Methode zur Untersuchung der zellulären Migration ist der Wundheilungs- oder *Scratch*-Assay. Während sich die Melanomzellen beim Boyden-Kammer-Assay in Suspension befinden und entlang des Gradienten eines Chemoattraktans, wie z.B. FKS, durch eine poröse Membran migrieren, wird beim Wundheilungsassay die Migration von Zellen untersucht, die sich in einem intakten Zellverband befinden und somit von Zell-Zell-Interaktionen beeinflusst werden.

Wie in **Abbildung 3-12 (A)** dargestellt ist, wurde dem konfluenten Zellrasen beim Wundheilungsassay ein Kratzer zugefügt, dieser nach 2, 4, 6, 8 und 24 h fotografiert und die entsprechende Kratzerbreite mit Hilfe der AxioVision-Software ermittelt (siehe 2.3.13.2). Die Auswertung der mittleren Kratzerbreite nach 24 h ergab, dass die nativen sowie die EphB6- und EphrinB2-überexprimierenden A375-Zellen im Vergleich zu den A375-pIRES-Zellen tendenziell bzw. signifikant schneller migrierten, was nach 24 h in einem schmaleren Kratzer resultierte (**Abbildung 3-12 (B)**). Im Gegensatz dazu war der Kratzer bei den EphB4-transfizierten A375-Zellen nach 24 h signifikant breiter, was auf eine verlangsamte Migration der Zellen hindeutet.

Das Ergebnis des Wundheilungsassay wird sowohl von der Migrationsfähigkeit der Zellen als auch von deren Proliferation beeinflusst. Der Einfluss der Proliferation wurde durch die Reduktion der FKS-Konzentration im Zellkulturmedium auf 5% (v/v) zwar soweit wie möglich minimiert, schien aber, wie an den am schnellsten proliferierenden nativen A375-Zellen (siehe **Abbildung 3-9**) zu erkennen war, immer noch eine Rolle gespielt zu haben. Da die A375-EphB4-Zellen unter den transfizierten Zellen die tendenziell stärkste Proliferation zeigten, gleichzeitig nach 24 h jedoch die größte Kratzerbreite aufwiesen, schien die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese der Zellen deren Migration im Wundheilungsassay deutlich vermindert zu haben, was auf eine Reduktion des Metastasierungspotentials der Zellen hindeuten würde.

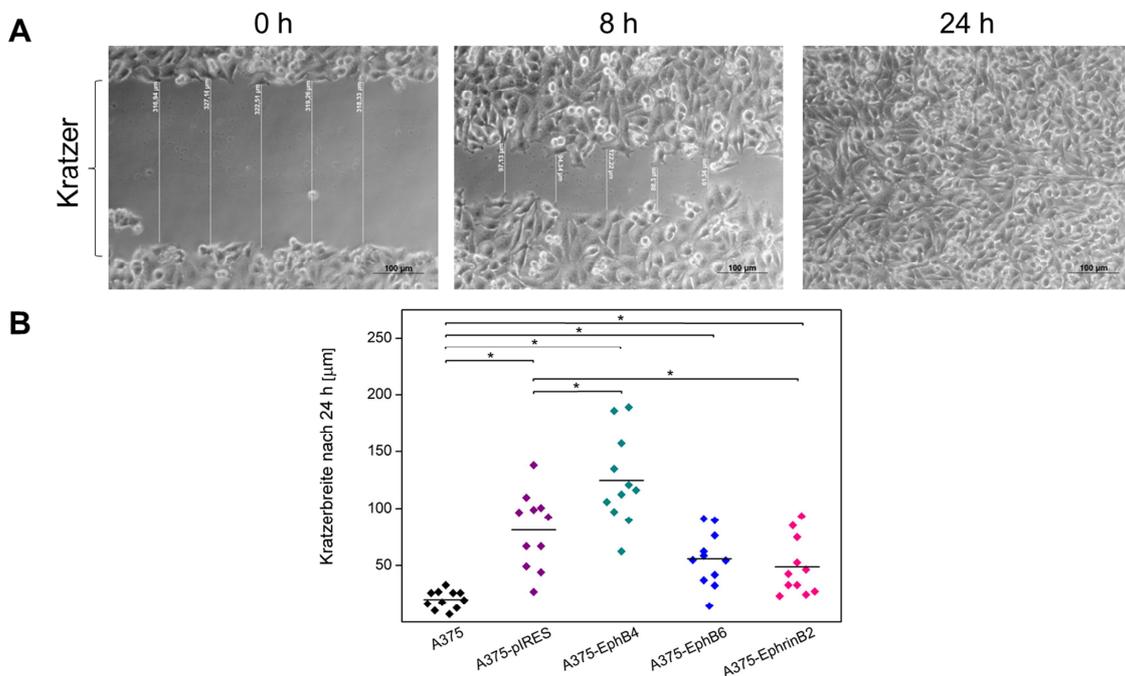


Abbildung 3-12: Migration von nativen und transfizierten A375-Melanomzellen im Wundheilungs-Assay (A) Beim Wundheilungsassay wurde die Migration der nativen und transfizierten A375-Zellen untersucht, indem dem konfluenten Zellrasen ein Kratzer zugefügt und dieser anschließend über 24 h vermessen wurde. (B) Im Diagramm dargestellt sind die Einzelwerte und der daraus berechnete Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten ($n=10$). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test; $p \leq 0,05$).

3.5.3 Einfluss der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten der A375-Melanomzellen

Da die erhöhte Proteinbiosynthese von EphB4, EphB6 und EphrinB2 nur einen geringen bis keinen Einfluss auf die Adhäsion und Migration der A375-Melanomzellen unter Monokultur-Bedingungen gezeigt hatte, wurde in weiterführenden Experimenten geprüft, ob es zu Effekten kommt, wenn die Melanomzellen zuvor für 24 h mit HL-60(M)-Zellen kokultiviert werden. Um wieder zwischen löslichen und Membran-gebundenen Einflussfaktoren unterscheiden zu können, wurden alle Zellen parallel zur Kokultur für 24 h mit HL-60(M)-konditioniertem Medium kultiviert.

- Analog zu den nativen A375-Zellen führte die Kokultivierung mit HL-60(M)-Zellen bei allen transfizierten A375-Zellen zu einer signifikant verminderten Adhäsion an Fibronektin (**Abbildung 3-13 (A)**).
- Bei den A375-, A375-EphB4- und A375-EphrinB2-Zellen führte die Kokultur mit HL-60(M)-Zellen gleichzeitig zu einer signifikant verminderten Migration der Zellen (**Abbildung 3-13 (B)**). Bei diesen drei Zelllinien bewirkte auch die Kultivierung in HL-60(M)-konditioniertem Medium eine tendenzielle bzw. signifikante Reduktion der zellulären Migration. Mit Ausnahme der A375-EphrinB2-Zellen fiel dieser Effekt jedoch etwas schwächer aus als in der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen.

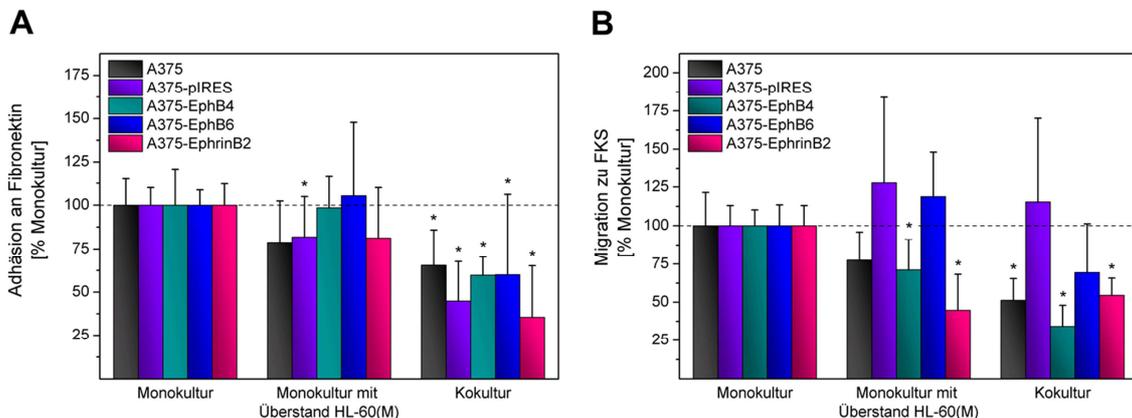


Abbildung 3-13: Adhäsion von nativen und transfizierten A375-Melanomzellen an Fibronektin (A) und Migration durch eine poröse Membran (B) nach der Kultivierung mit HL-60(M)-Zellen bzw. HL-60(M)-konditioniertem Medium Die Melanomzellen wurden für 24 h mit HL-60(M)-Zellen bzw. deren Überstand kultiviert, von diesen mittels Magnetseparation getrennt und anschließend auf ihre Fähigkeit an Fibronektin zu adhären (A) bzw. durch eine Membran mit 8 µm großen Poren zu migrieren (B), untersucht. Während die innerhalb von 40 min adhären Zellen mit Kristallviolett gefärbt wurden, erfolgte die Färbung der innerhalb von 24 h migrierten Zellen mit Calcein-AM. Anschließend wurde der jeweilige Farbstoff photometrisch bestimmt (Kristallviolett: $\Delta OD = OD_{550} - OD_{650}$; Calcein-AM: Anregung 485/20 nm, Emission 528/20 nm). Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test; $p \leq 0,05$).

3.6 Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf das inflammatorische Potential von A375-Melanomzellen und HL-60(M)-Zellen

In den Kokultivierungsexperimenten hatte sich gezeigt, dass insbesondere die Migration der EphB4- und EphrinB2-überexprimierenden A375-Melanomzellen auch von Faktoren im Überstand der HL-60(M)-Zellen beeinflusst wurde. Aufgrund dessen wurde mit Hilfe eines ELISA der Einfluss der erhöhten EphB4-, EphB6- und EphrinB2-Proteinbiosynthese auf die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 untersucht (siehe 2.4.6.1).

Die Kokultur mit HL-60(M) führte sowohl bei den nativen als auch bei den transfizierten A375-Zellen zu einer signifikant erhöhten IL-6-Sekretion (**Abbildung 3-14**). Bei den nativen A375-Zellen führte die Kultur in HL-60(M)-konditioniertem Medium zu einem signifikant schwächeren Anstieg der IL-6-Freisetzung als die Kokultur. Bei den transfizierten A375-Zellen hingegen wurde kein Unterschied zwischen der IL-6-Sekretion in der Kokultur und in der Kultur der Melanomzellen mit dem Überstand von HL-60(M)-Zellen festgestellt. Darüber hinaus waren die gemessenen IL-6-Konzentrationen bei der Kultivierung der HL-60(M)-Zellen mit dem Überstand nativer bzw. transfizierter Melanomzellen signifikant niedriger als in der Kokultur oder in der Kultur der Melanomzellen mit HL-60(M)-konditioniertem Medium. Sie unterschieden sich jedoch immer noch signifikant von der IL-6-Sekretion durch monokultivierte HL-60(M). Insgesamt betrachtet, war die Sekretion der nicht-transfizierten A375-Zellen signifikant schwächer als die der transfizierten A375-Melanomzellen.

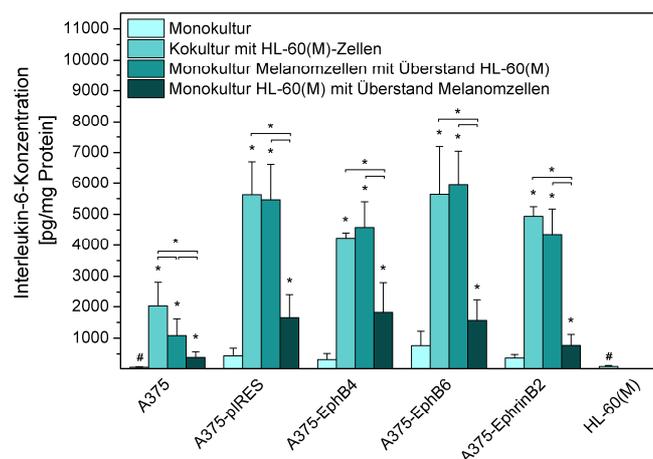


Abbildung 3-14: Sekretion von IL-6 durch native und transfizierte A375-Melanomzellen nach Kultivierung mit HL-60(M) bzw. deren Überstand Die Sekretion von IL-6 wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * (bezogen auf die jeweilige Monokultur bzw. auf die entsprechend gekennzeichneten Zellen) bzw. mit # (bezogen auf A375-piRES-Monokultur) gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test; $p \leq 0,05$).

3.7 Charakterisierung eines murinen Tumor-Xenograft-Modells mit subkutanen A375-pIRES/EphB4-Tumoren

3.7.1 Charakterisierung des Tumorwachstums

Um den Einfluss von EphB4 auf das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese *in vivo* untersuchen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein murines Tumor-Xenograft-Modell etabliert.

Durch die subkutane Injektion von jeweils 5×10^6 A375-pIRES- bzw. A375-EphB4-Melanomzellen in den linken bzw. rechten Oberschenkel von NMRI (*nu/nu*)-Mäusen (siehe 2.5.1) entwickelten sich innerhalb von 20 Tagen Tumoren mit einem Volumen von $339 \pm 185 \text{ mm}^3$ (A375-pIRES, n=14) bzw. $254 \pm 103 \text{ mm}^3$ (A375-EphB4, n=14). Zwischen dem Wachstum der A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (**Abbildung 3-15 (A)**).

Aufgrund der GFP-Proteinbiosynthese der A375-pIRES- und A375-EphB4-Zellen konnten die Tumoren mit Hilfe des Fluoreszenz-Bildgebungssystems FX Pro visualisiert werden (**Abbildung 3-15 (B)**). Darüber hinaus ergab die Untersuchung der Tumoren mittels MRT, dass es sich um dichte Strukturen handelt, die zum Teil von Bindegewebe durchzogen sind (**Abbildung 3-15 (C)**).

Durch die gleichzeitige Injektion der EphB4-überexprimierenden A375-Zellen und der A375-pIRES-Kontrollzellen in eine Maus konnte die benötigte Tierzahl vermindert und das Auftreten von interindividuellen Unterschieden beim Vergleich der beiden Tumorarten miteinander vermieden werden.

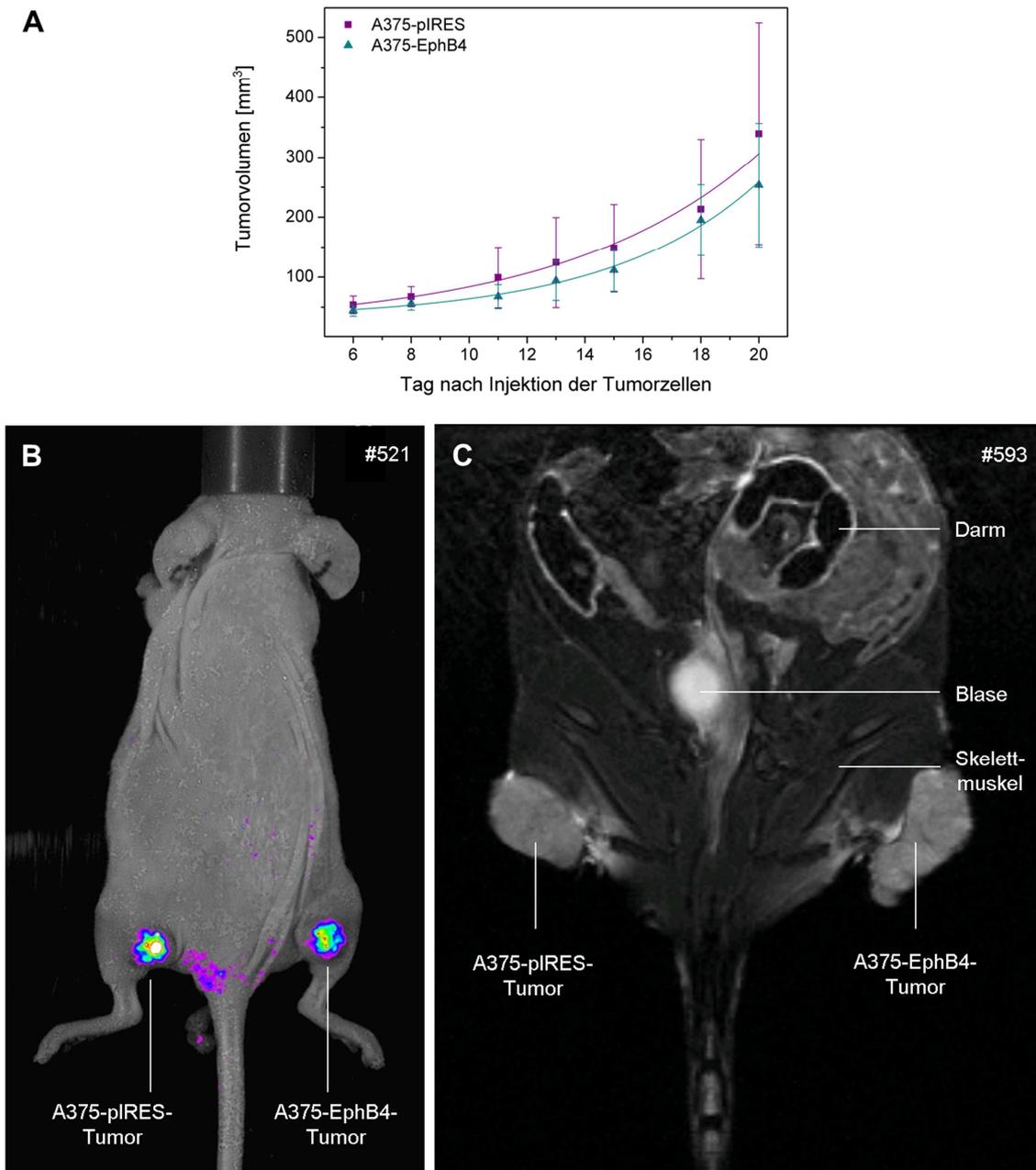


Abbildung 3-15: Graphische Darstellung des Wachstumsverhaltens der beiden Tumoren (A) sowie Fluoreszenz- (B) und MRT-Aufnahme (C) einer Nacktmaus mit subkutanem A375-pIRES- (links) und A375-EphB4-Tumor (rechts) (A) Die Größe der Tumoren wurde dreimal wöchentlich mit Hilfe eines Messschiebers bestimmt und daraus das Tumolvolumen berechnet. Dargestellt sind die Tumor-Wachstumskurven eines repräsentativen Tierexperiments (Mittelwerte \pm Standardabweichungen sowie nicht-lineare Kurvenanpassung ($y = y_0 + A_1 \times e^{(x-x_0)/t_1}$), $n=14$). (B) Die subkutan wachsenden Tumoren wurden aufgrund der GFP-Proteinbiosynthese der transfizierten A375-Zellen im Fluoreszenz-Bildgebungssystem FX Pro detektiert. (C) Die Größe und Homogenität der Tumoren wurde mittels MRT näher charakterisiert (Koronschnitt).

3.7.2 Nachweis der EphB4-Proteinbiosynthese

Zum Nachweis der erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese in den subkutanen A375-EphB4-Tumoren im Vergleich zu den A375-pIRES-Tumoren wurden diese im Anschluss an die tierexperimentellen Untersuchungen entnommen, mit 4% PFA fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten (siehe 2.7.3). Die erhaltenen Tumorschnitte wurden mit Hilfe immunhistologischer Färbetechniken auf ihre EphB4-Proteinbiosynthese untersucht (siehe 2.7.4).

Wie in **Abbildung 3-16** zu sehen ist, wiesen die A375-EphB4-Tumoren (**D**) im Vergleich zu den A375-pIRES-Tumoren (**B**) eine deutlich stärkere Färbung durch den EphB4-Antikörper, insbesondere im Bereich der Zellmembranen, auf. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die EphB4-positiven Areale von Bindegewebe durchzogen bzw. abgegrenzt waren, das kein bis sehr wenig EphB4 synthetisierte. Die Negativkontrollen beider Tumorschnitte (**A, C**) waren nicht gefärbt, was die Spezifität des verwendeten EphB4-Antikörpers bestätigt.

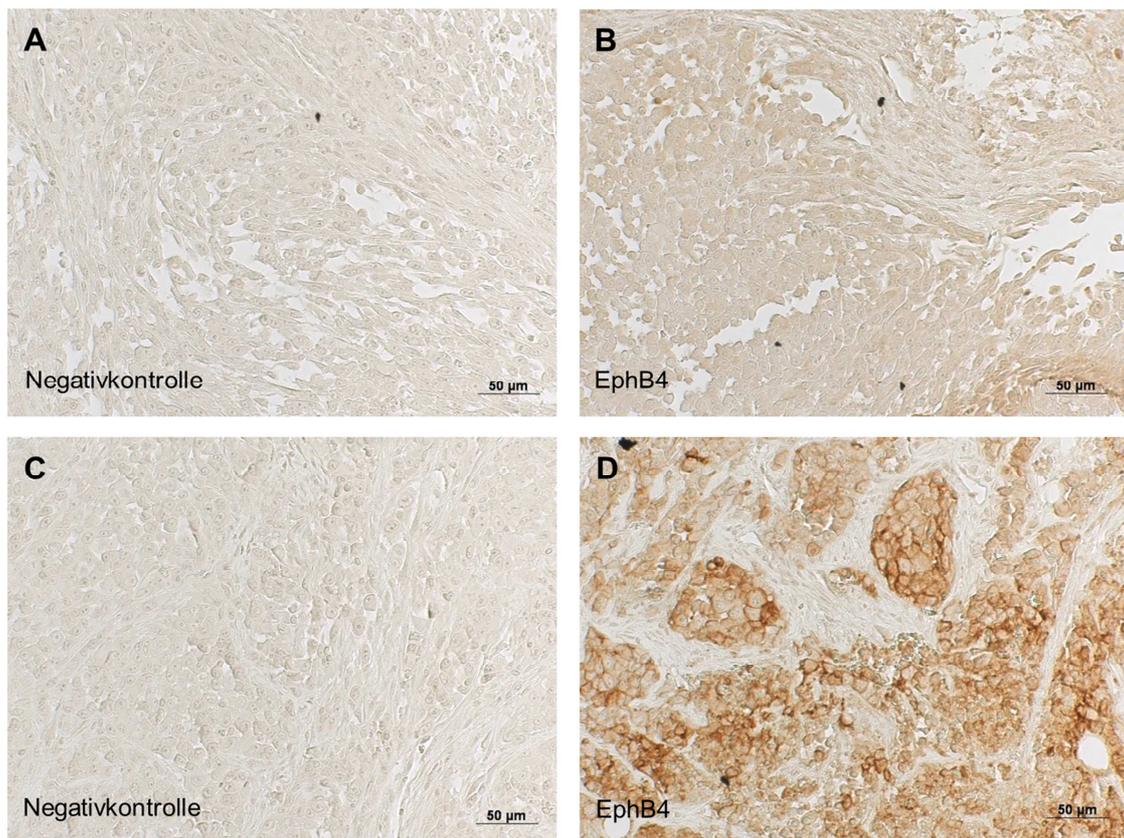


Abbildung 3-16: Immunhistologische Färbung von EphB4 sowie die dazugehörige Negativkontrolle in A375-pIRES- (A/B) und A375-EphB4-Tumoren (C/D) Die Tumoren wurden mit 4% PFA fixiert, in Paraffin eingebettet, 5 µm-Gewebeschnitte angefertigt und EphB4 mit Hilfe eines geeigneten Primär-(Ziege anti-EphB4 (AF3038 (R&D))) und Sekundär-Antikörpers (Kaninchen anti-Ziege IgG-Peroxidase (A5420 (Sigma))) sowie einer DAB-Färbung nachgewiesen (B/D). Für die entsprechenden Negativkontrollen (A/B) wurde auf die Inkubation mit dem Primärantikörper verzichtet.

3.7.3 Charakterisierung des Tumormetabolismus und der Tumorperfusion mit [^{18}F]FDG

[^{18}F]FDG ist der am häufigsten verwendete PET-Tracer in der nuklearmedizinischen Diagnostik. [^{18}F]FDG wird wie Glukose von eukaryotischen Zellen entsprechend ihrem Bedarf über den GLUT1-Transporter internalisiert und intrazellulär durch die Hexokinase phosphoryliert. Da die Zellen das dabei entstehende [^{18}F]FDG-6-phosphat nicht metabolisieren können und die Dephosphorylierung zu [^{18}F]FDG, außer in Zellen der Leber, nur sehr langsam abläuft, kommt es zur Akkumulation des Radiotracers in Zellen mit einem erhöhten Glukose-Bedarf, so z.B. im Gehirn, in Tumoren, aber auch in entzündlichen Regionen. Tumorzellen gewinnen ihre Energie bevorzugt aus der anaeroben Glykolyse und verstoffwechseln auch unter aeroben Bedingungen viel Glukose zu Laktat. Dieser nach seinem Entdecker Otto Warburg benannte Effekt, bildet die Grundlage für die [^{18}F]FDG-Avidität von Tumoren.

Einen Standardtracer für die In-vivo-Perfusionsmessung stellt [^{15}O]H₂O dar. Aufgrund der sehr kurzen ^{15}O -Halbwertszeit von 124 s ist dieser Radiotracer jedoch nur in unmittelbarer Nähe eines Zyklotron verfügbar und daher klinisch nur bedingt einsetzbar. Da die Anreicherung von [^{18}F]FDG im Tumor neben der Internalisierung durch die Tumorzellen auch von der Verfügbarkeit des Radiotracers und damit von der Blutversorgung der Tumoren abhängig ist, wird [^{18}F]FDG, insbesondere während der frühen Distributionsphase, als Surrogat-Marker für die Tumorperfusion diskutiert. Mullani und Kollegen zeigten, dass es eine enge Korrelation zwischen den Ergebnissen einer dynamischen *first-pass*-[^{18}F]FDG-PET-Messung in den ersten zwei Minuten nach der Bolus-Injektion des Radiotracers und dem mittels [^{15}O]H₂O gemessenen Blutfluss in Tumoren gibt [112, 113]. Aufgrund dessen bietet [^{18}F]FDG die Möglichkeit zur simultanen In-vivo-Messung der Perfusion (Aufnahmezeitraum: 0-2 min) und des Stoffwechsels (Aufnahmezeitraum: 2-120 min) von Tumoren nach der einmaligen Injektion des Radiotracers [113, 114].

Da EphB4 insbesondere an der Angiogenese, aber auch an der Tumorangiogenese beteiligt ist, sollte mittels [^{18}F]FDG-PET (siehe 2.6.4) geprüft werden, ob die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese zu Unterschieden in der Perfusion der Tumoren führt.

Wie in **Abbildung 3-17 (A-C oben)** dargestellt ist, kam es 5 min nach der Injektion von [^{18}F]FDG vorrangig zu einer Anreicherung des Radiotracers im Herzmuskel, den Nieren und der Blase. Insbesondere bei dem in diesem Fall größeren A375-EphB4-Tumor (**Abbildung 3-17 (B oben)**) ist zu erkennen, dass sich [^{18}F]FDG nach 5 min zunächst in den Randbereich des Tumors anreichert, was wahrscheinlich auf eine stärkere Perfusion dieser Areale zurückzuführen ist.

Wie **Abbildung 3-17 (A-C unten)** zeigt, kam es nach 60 min zu einer zunehmenden Akkumulation von [^{18}F]FDG im Darm, den Nieren und der Blase, was auf die renale und hepatobiliäre Ausscheidung des Radiotracers zurückzuführen ist. Nach 60 min war eine deutliche Anreicherung von [^{18}F]FDG sowohl im Randbereich als auch im Zentrum des Tumors zu erkennen. In der Autoradiographie heller erscheinende Areale der Tumoren könnten auf nekrotische Bereiche hindeuten. Alles in allem war nach dieser Zeit jedoch eine deutliche Akkumulation des Radiotracers in den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren detektierbar, womit die metabolische Aktivität und [^{18}F]FDG-Avidität beider Tumoren nachgewiesen wurde.

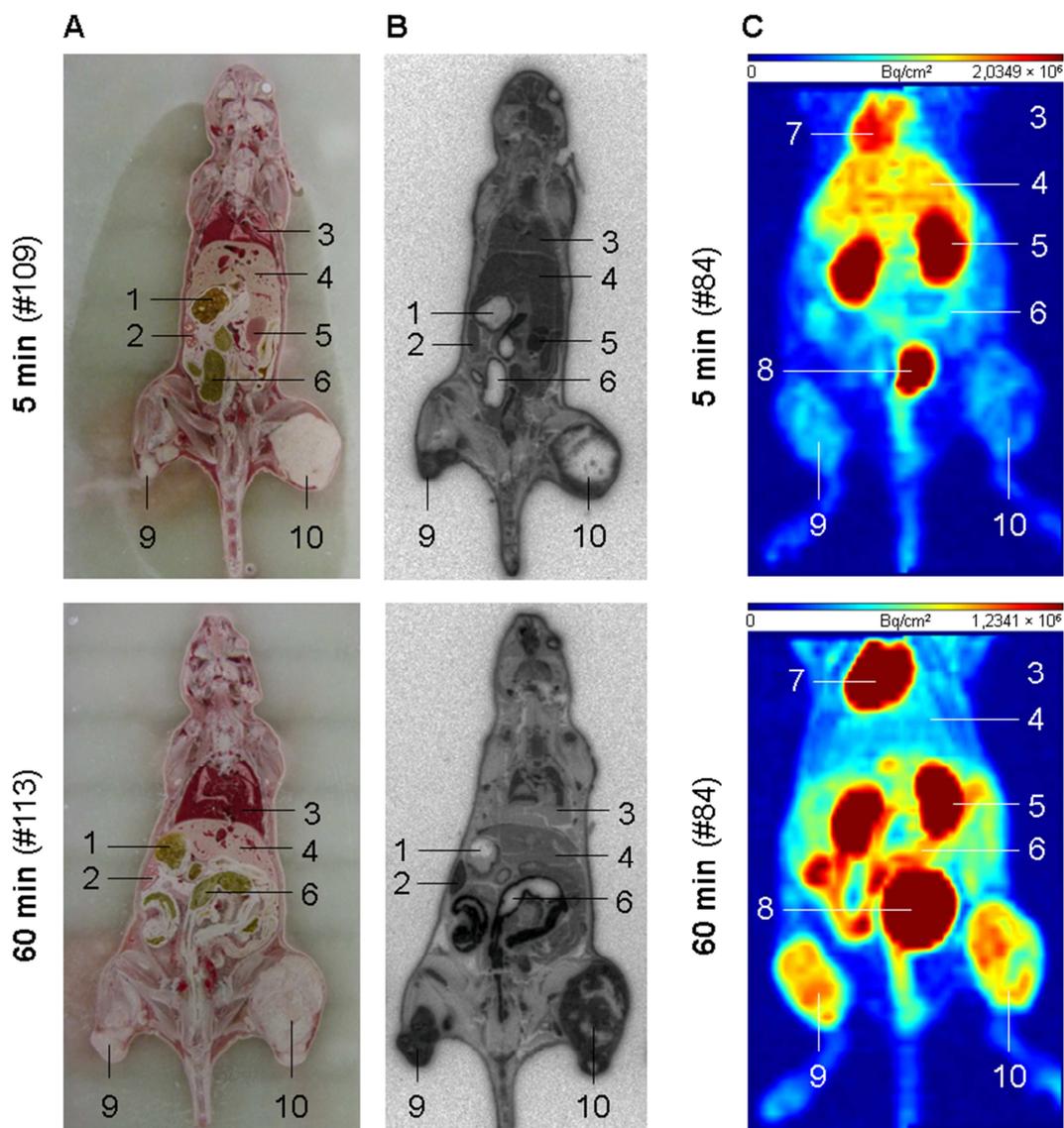


Abbildung 3-17: Fotografie (A), Autoradiographie (B) und PET (C) von Nacktmäusen mit subkutanen A375-pIRES- (links) und A375-EphB4-Tumoren (rechts) 5 min und 60 min nach Injektion von [^{18}F]FDG [^{18}F]FDG wurde intravenös injiziert und die Verteilung des Radiotracers nach 5 min bzw. 60 min mittels Ganzkörper-Autoradiographie (B) bzw. mittels PET (Maximum-Intensitäts-Projektion) (C) bestimmt. Die Auswertung der Ganzkörper-Autoradiographie wird dabei von einer Fotografie der gleichen Schnittebene unterstützt. Die Nummern verweisen auf folgende Organe bzw. Gewebe: 1-Magen, 2-Milz, 3-Lunge, 4-Leber, 5-Niere, 6-Darm, 7-Herz, 8-Blase, 9- A375-pIRES-Tumor und 10-A375-EphB4-Tumor.

In **Abbildung 3-18 (A)** ist die Aktivitätskonzentration von [^{18}F]FDG in den Tumoren zwei repräsentativer Mäuse (#588 und #590) über einen Zeitraum von 120 min dargestellt. Dabei wird deutlich, dass sich das Akkumulationsverhalten von [^{18}F]FDG in den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren, insbesondere in der frühen Distributionsphase, unterscheidet. In den A375-EphB4-Tumoren weisen die Kurven der [^{18}F]FDG-Anreicherung einen flacheren Anstieg auf als in den A375-pIRES-Tumoren, was auf ein vermindertes „Anfluten“ des Radiotracers in den A375-EphB4-Tumoren hinweist. Dies könnte die Folge einer schlechteren Gefäßversorgung der A375-EphB4-Tumoren sein.

Die Auswertung aller untersuchten Mäuse ($n=10$) ergab, dass der Quotient aus der Aktivität im A375-EphB4- und im A375-pIRES-Tumor über den gesamten Messzeitraum von 120 min im Mittel kleiner als eins war (**Abbildung 3-18 (B)**). Demzufolge kam es im Vergleich zu den A375-pIRES-Tumoren nicht nur in der Distributions-, sondern auch in der Eliminationsphase zu einer geringeren Anreicherung von [^{18}F]FDG in den A375-EphB4-Tumoren. Dies weist auf eine verminderte Perfusion der A375-EphB4-Tumoren im Vergleich zu den A375-pIRES-Tumoren hin, da die Perfusion der Tumoren limitierend auf die Akkumulation eines Radiotracers wirkt.

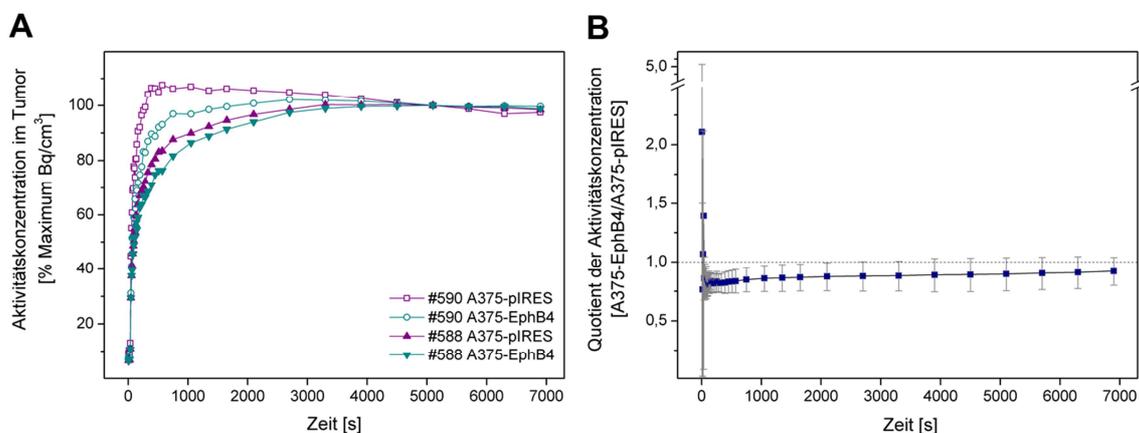


Abbildung 3-18: Aktivitätskonzentration bzw. Quotient der Aktivitätskonzentration von [^{18}F]FDG in den subkutanen A375-pIRES- bzw. A375-EphB4-Tumoren von NMRI (*nu/nu*)-Nacktmäuse über einen Zeitraum von 120 min [^{18}F]FDG wurde intravenös injiziert und die Aktivitätskonzentration in den Tumor-Mäusen mittels PET bestimmt. Mit Hilfe der Software Rover 2.0.50 wurden im Bereich der subkutanen A375-pIRES/EphB4-Tumoren geeignete ROIs definiert und die akkumulierte Aktivität im ROI bestimmt. (A) Für zwei repräsentative Mäuse (#588 und #590) wurde die Aktivität im jeweiligen ROI des A375-EphB4- und des A375-pIRES-Tumors als Prozentwert der maximal angereicherten Aktivität (Bq/cm^3) über einen Zeitraum von 120 min (7.200 s) dargestellt. (B) Aus der akkumulierten Aktivität (Bq/cm^3) im ROI des A375-EphB4- und A375-pIRES-Tumors aller untersuchten Mäuse wurde der Quotient berechnet und dieser über einen Zeitraum von 120 min (7.200 s) graphisch dargestellt (Mittelwerte \pm Standardabweichungen, $n=10$).

Angesichts der Ergebnisse der [^{18}F]FDG-PET-Untersuchungen scheint die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese zu einer verminderten Perfusion der A375-EphB4-Tumoren geführt zu haben. Dies könnte durch eine schlechtere Gefäßversorgung der A375-EphB4-Tumoren verursacht gewesen sein. Die Akkumulation von [^{18}F]FDG in den Tumoren wird jedoch neben der Vaskularisierung der Tumoren auch von der metabolischen Aktivität von Tumor- und Entzündungszellen sowie von der Fenestrierung des Endothels beeinflusst. [^{18}F]FDG ist daher nur ein Surrogatmarker für die Gewebepfusion. Um diesen Befund zu verifizieren, sollten in weiterführenden Untersuchungen Radiotracer, wie z.B. [^{15}O]H₂O, zum Einsatz kommen, die als Perfusionsmarker besser geeignet sind. Alternativ könnte auch radioaktiv markiertes Albumin verwendet werden, da dessen Tumoranreicherung allein von der Perfusion der Tumoren und nicht von der Aufnahme durch die Tumorzellen abhängig ist.

3.7.4 Charakterisierung der Tumorperfusion mit Hoechst 33342

Um die mit [^{18}F]FDG-identifizierten Unterschiede in der Perfusion der A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren zu verifizieren, wurde den Tumor-Mäusen im Anschluss an die PET-Untersuchung der DNA-Farbstoff Hoechst 33342 intravenös injiziert (siehe 2.5.4). Um eine Diffusion von Hoechst 33342 zu verhindern, wurden die Mäuse exakt 1 min nach der Injektion des Farbstoffes getötet, die Tumoren unverzüglich entnommen, bei -28°C eingefroren und geschnitten (siehe 2.7.1).

Wie **Abbildung 3-19 (A/B)** zeigt, wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen eine spezifische Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffes im Randbereich von perfundierten Blutgefäßen erreicht. Die quantitative Auswertung der Tumoren von sieben Mäusen ergab einen signifikanten Unterschied im prozentualen Anteil der Hoechst 33342-positiven Areale an der Gesamttumorfläche zwischen den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren ($13,4 \pm 2,8\%$ versus $7,0 \pm 5,1\%$; $p \leq 0,05$; $n=7$). Wie in **Abbildung 3-19 (C)** zu erkennen ist, waren die EphB4-exprimierenden A375-Tumoren im Vergleich zu den A375-pIRES-Tumoren bei fünf der sieben untersuchten Mäuse schwächer perfundiert. Während bei einer Maus (#627) kein nennenswerter Unterschied festgestellt wurde, war bei einem weiteren Tier (#588) ein größerer Anteil des A375-EphB4-Tumors mit Hoechst 33342 gefärbt als im A375-pIRES-Tumor. Im Rahmen der PET wurde jedoch auch in diesem Tier eine langsamere Anreicherung von [^{18}F]FDG im A375-EphB4-Tumor beobachtet (**Abbildung 3-18 (C)**).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mittels [^{18}F]FDG-PET gefundenen Unterschiede in der Blutperfusion der A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren mit Hilfe der Hoechst 33342-Färbung bestätigt wurden.

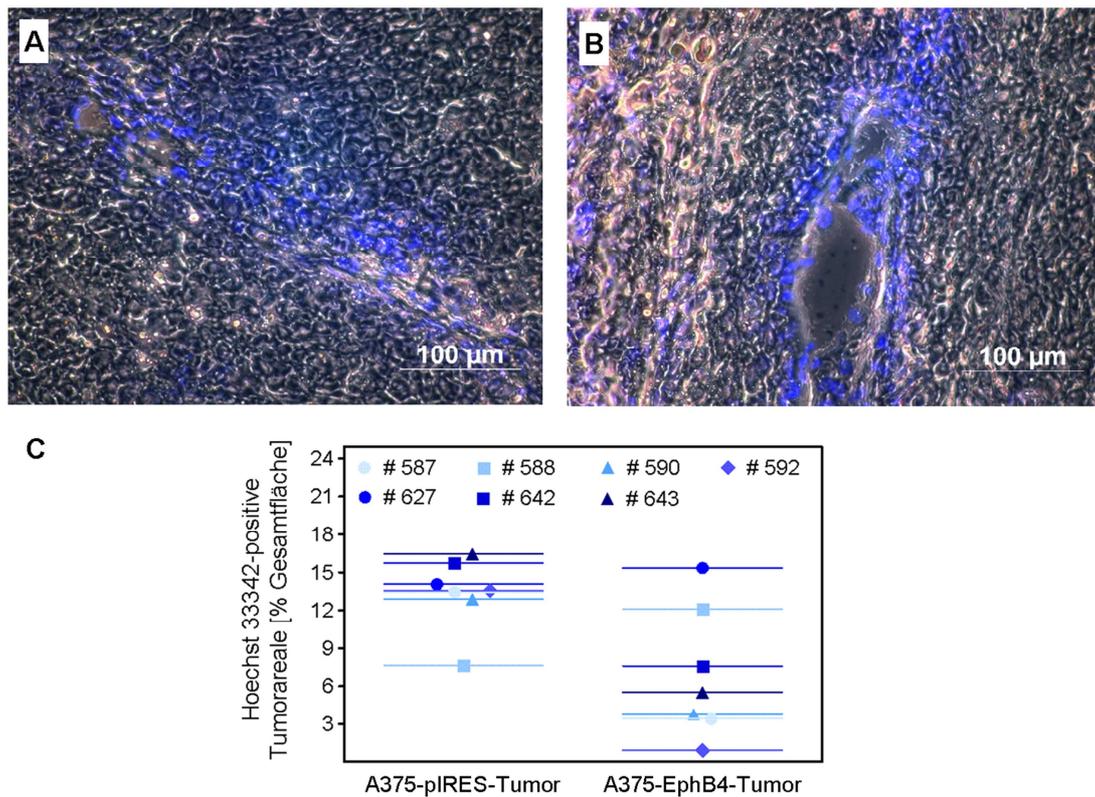


Abbildung 3-19: Färbung von Blutgefäßen und Blutgefäß-umgebendem Gewebe mittels Hoechst 33342 in Gefrierschnitten von A375-pIRES- (A) bzw. A375-EphB4-Tumoren (B) und quantitative Auswertung (C) Zur Charakterisierung der Blutperfusion in den Tumor-tragenden Mäusen wurde diesen jeweils 1 min vor der Tötung Hoechst 33342 (30 mg/kg Körpergewicht) in die Schwanzvene injiziert. Nach der Tötung der Tiere wurden die Tumoren entnommen, eingefroren und die getrockneten Gefrierschnitte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops auf die Hoechst 33342-Verteilung untersucht. Mit Hilfe der Axiovision-Software wurde schließlich der prozentuale Anteil der Hoechst 33342-positiven Tumoreale in einem Tumorschnitt je Tier bestimmt (n=7).

3.7.5 Charakterisierung der CD31-Proteinbiosynthese

Darüber hinaus wurde bei den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren die CD31-Proteinbiosynthese mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion untersucht (siehe 2.4.4 und 2.4.5). CD31 ist ein Zelladhäsionsprotein, das der Verbindung benachbarter Endothelzellen dient und daher vorrangig in deren Kontaktbereich synthetisiert wird. Die Untersuchung der CD31-Proteinbiosynthese sollte Aufschluss darüber geben, ob die Perfusionsunterschiede zwischen den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren durch Unterschiede in der Menge Endothelzell-ausgekleideter Blutgefäße bedingt war. Parallel dazu wurden EphB4 und Aktin in den Tumorlysaten detektiert.

Wie **Abbildung 3-20** zeigt, war die CD31-Proteinbiosynthese in drei der vier untersuchten Mäuse bei den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren vergleichbar. Da auch in einem zweiten unabhängigen Experiment (n=6) keine Unterschiede in der

CD31-Proteinbiosynthese zwischen den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren zu erkennen waren, ist davon auszugehen, dass die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese bei den A375-EphB4-Tumoren keinen Einfluss auf die Anzahl intratumoralen, Endothelzell-ausgekleideter Blutgefäße und damit auf die Proteinbiosynthese des Endothelzellmarkers CD31 hatte. Jedoch sollte dieses Ergebnis mit einer größeren Anzahl an Tumormäusen und unter Einsatz von immunhistologischen Färbetechniken verifiziert werden.

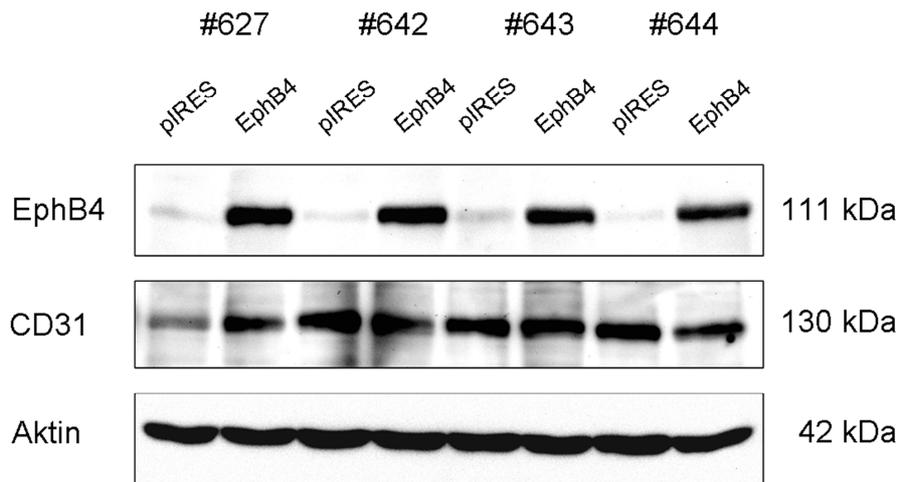


Abbildung 3-20: Proteinbiosynthese von EphB4, CD31 und Aktin in den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren von vier repräsentativen NMRI (*nu/nu*)-Tumormäusen Die Proteinbiosynthese von EphB4, CD31 und Aktin wurde mittels SDS-PAGE, Western Blotting und anschließender Immundetektion bestimmt. Aktin diente dabei als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinkonzentrationen. Dargestellt sind Ausschnitte eines repräsentativen Blots aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.7.6 Charakterisierung hypoxischer Areale mit [¹⁸F]FMISO

Mit Hilfe von [¹⁸F]FMISO sollte untersucht werden, ob die A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren über hypoxische Areale verfügten. [¹⁸F]FMISO diffundiert in vitale Zellen, beispielsweise innerhalb eines Tumors, und kann diese bei ausreichender Gewebsoxygenierung auch wieder verlassen. In hypoxischen Arealen hingegen wird der Radiotracer durch Nitroreduktasen zu Amin-Derivaten reduziert. Letztere binden kovalent an intrazelluläre Makromoleküle, wodurch der Radiotracer die Tumorzellen nicht wieder verlassen kann und in hypoxischen Arealen akkumuliert.

Die Auswertung der [¹⁸F]FMISO-Verteilung erfolgt erst nach einer vergleichsweise langen Aufnahmezeit von 240 min (14.400 s). Die maximale Intensitätsprojektion der Tumormäuse 240 min nach Injektion von [¹⁸F]FMISO zeigt eine Akkumulation des Radiotracers, insbesondere in den A375-EphB4-Tumoren (**Abbildung 3-21 (A)**). Die

quantitative Auswertung zwei repräsentativer Tumormäuse ergab, dass es nach 240 min bei beiden Tieren zu einer stärkeren Akkumulation des Hypoxie-Markers in den A375-EphB4-Tumoren als in den A375-pIRES-Tumoren kam (**Abbildung 3-21 (B)**). Demzufolge scheint die niedrigere Perfusion der A375-EphB4-Tumoren zu hypoxischen Arealen innerhalb des Tumors geführt zu haben, die mittels $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ nachgewiesen wurden. Die Autoradiographie der entnommenen Tumoren (**Abbildung 3-21 (C)**) ermöglicht eine hochaufgelöstere Darstellung der $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ -Verteilung in den Tumoren.

Da die Untersuchungen mit $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ in der zur Verfügung stehenden Zeit nur an drei Mäusen durchgeführt werden konnten, handelt es sich allerdings um vorläufige Daten, die mit Hilfe einer größeren Anzahl an Versuchstieren verifiziert werden sollten.

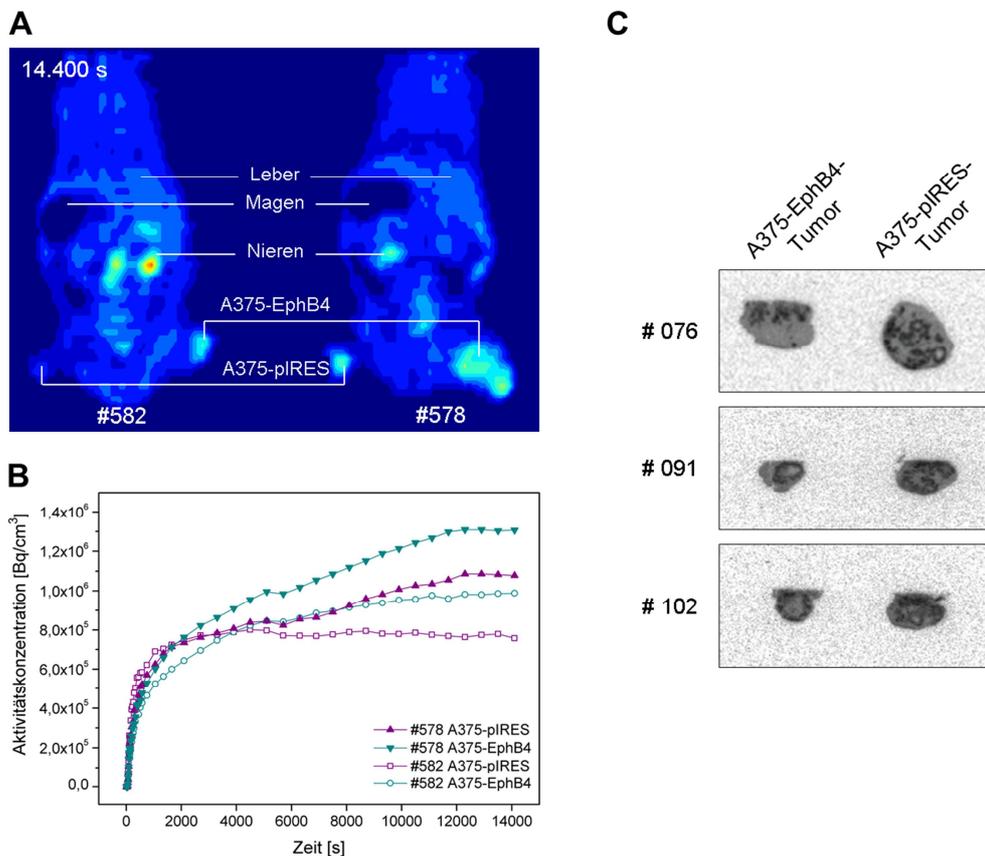


Abbildung 3-21: PET (A), Aktivitätskonzentration (B) und Autoradiographie (C) von $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ in den subkutanen A375-pIRES- bzw. A375-EphB4-Tumoren von NMRI (*nu/nu*)-Nacktmäusen

(A) $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ wurde intravenös injiziert und die Aktivitätskonzentration in den Tumor-Mäusen mittels PET (Maximum-Intensitäts-Projektion) bestimmt. Mit Hilfe der Software Rover 2.0.50 wurden im Bereich der subkutanen A375-pIRES/EphB4-Tumoren geeignete ROIs definiert und die akkumulierte Aktivität im ROI bestimmt. (B) Für zwei repräsentative Mäuse (#582 und #578) wurde die Aktivität im jeweiligen ROI des A375-pIRES/EphB4-Tumors als angereicherte Aktivität (Bq/cm³) über einen Zeitraum von 240 min (7.200 s) dargestellt. (C) Die Verteilung von $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ in den Tumoren 240 min nach der Injektion des Radiotracer wurde mittels Autoradiographie bestimmt.

Aufgrund des heterogenen Wachstumsverhaltens der A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren bei den verschiedenen Mäusen, muss zusammenfassend zu den Kapiteln 3.7.3 bis 3.7.6 gesagt werden, dass die Versuche mit [^{18}F]FDG, [^{18}F]FMISO und Hoechst 33342 in weiterführenden Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Tieren wiederholt werden sollten, um die statistische Sicherheit der Ergebnisse zu erhöhen.

3.8 Charakterisierung eines neuen, ^{18}F -radiomarkierten EphB4-Kinaseinhibitors als Radiotracer zur Bildgebung von EphB4 mittels Kleintier-PET

3.8.1 Einfluss von Verbindung 2 auf die Zellproliferation und Zellvitalität

Ausgehend von einem bereits beschriebenen EphB4-Kinaseinhibitor (Verbindung 1), der durch eine 2,4-*bis*-Anilinopyrimidin-Struktur charakterisiert ist [104], wurde ein neuer, potentieller EphB4-Kinaseinhibitor synthetisiert (Verbindung 2, siehe 2.6.1) In Vorbereitung auf zelluläre Experimente wurde zunächst der Einfluss von Verbindung 2 auf die Vitalität und Morphologie verschiedener Zelllinien untersucht (siehe 2.6.2). Verbindung 1 diente dabei als Vergleichssubstanz.

Wie in **Abbildung 3-22 (A)** exemplarisch für A375-Melanomzellen dargestellt, kam es bereits nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit 0,1 μM Verbindung 1 zu einer geringen, aber signifikanten Verminderung der Zellproliferation bzw. -vitalität. Ab einer Konzentration von 10 μM führten sowohl Verbindung 1 als auch Verbindung 2 innerhalb von 24 h zu einer signifikanten Reduktion der zellulären Vitalität sowie zu morphologischen Veränderungen der Zellen (**Abbildung 3-22 (B)**). Je länger die Zellen nach einer einmaligen Applikation von Verbindung 1 und 2 kultiviert wurden, desto niedriger war die Konzentration, bei der es zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Zellproliferation und -vitalität kam (**Abbildung 3-22 (A)**).

Da die Vitalität der Zellen bei einer Konzentration von 1 μM nur wenig bzw. nicht beeinflusst wurde und diese Konzentration deutlich über dem für Verbindung 1 beschriebenen IC_{50} -Wert für EphB4 von 90 ± 50 nM [104] lag, wurden die A375-Zellen in weiterführenden Experimenten für 24 h mit 1 μM Verbindung 1 bzw. 2 inkubiert.

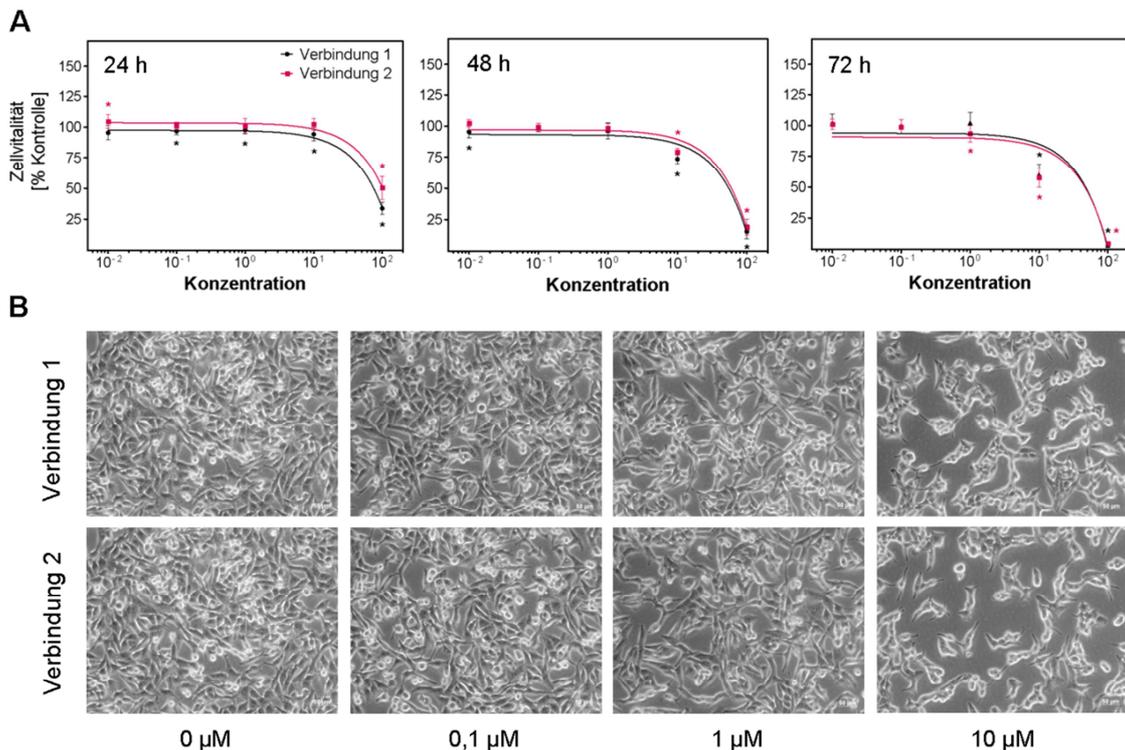


Abbildung 3-22: Zelluläre Vitalität (A) und Morphologie (B) von A375-Melanomzellen nach 24, 48 und 72 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Verbindung 1 bzw. 2 (A) Die Zellen wurden in 24well-Platten für 24, 48 oder 72 h mit verschiedenen Konzentrationen von Verbindung 1 und 2 kultiviert und die zelluläre Vitalität mittels MTT-Test kolorimetrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten ($n=12$). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-*Post-Hoc*-Test; $p \leq 0,05$). (B) Die Zellen wurden in 24well-Platten für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Verbindung 1 und 2 kultiviert und die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch beurteilt.

3.8.2 Einfluss von Verbindung 2 auf die EphB4-Phosphorylierung

Um auszuschließen, dass die für eine ^{18}F -Radiomarkierung nötigen, strukturellen Veränderungen in Verbindung 2 Einfluss auf deren Kinase-inhibitorische Wirkung nehmen, wurde mit Hilfe eines pEphB4-spezifischen ELISA die Konzentration von pEphB4 in A375-, A375-pIRES- und A375-EphB4-Melanomzellen untersucht, nachdem diese für 24 h mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen kultiviert worden waren (siehe 2.4.6.2). Verbindung 1 diente wiederum als Vergleichssubstanz.

Verbindung 1 bewirkte bei allen drei Zelllinien bereits ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ eine signifikant verminderte Phosphorylierung von Tyrosinresten des EphB4-Proteins (**Abbildung 3-23 (A)**). Mit Ausnahme der A375-pIRES-Zellen führte auch Verbindung 2 ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ zu einer signifikant verminderten EphB4-Phosphorylierung. Somit konnte die Kinase-inhibitorische Wirkung von Verbindung 2 bestätigt werden. Um auszuschließen, dass Verbindung 1 und 2 neben der Phosphorylierung auch die Proteinbiosynthese von EphB4

beeinflussen, wurde EphB4 mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion (siehe 2.4.4 und 2.4.5) in den Zelllysaten, die auch für den pEphB4-ELISA verwendet wurden, nachgewiesen. Beide EphB4-Kinaseinhibitoren zeigten erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Proteinbiosynthese von EphB4 (**Abbildung 3-23 (B)**). Unter Verwendung des pEphB4-ELISA konnte bei den A375-EphB4-Zellen trotz einer erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese keine erhöhte EphB4-Aktivierung nachgewiesen werden, das heißt die pEphB4-Konzentration war in allen drei Zelllinien vergleichbar. Im Gegensatz dazu wurden mittels Immunpräzipitation in den A375-EphB4-Zellen deutlich höhere pEphB4-Konzentrationen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

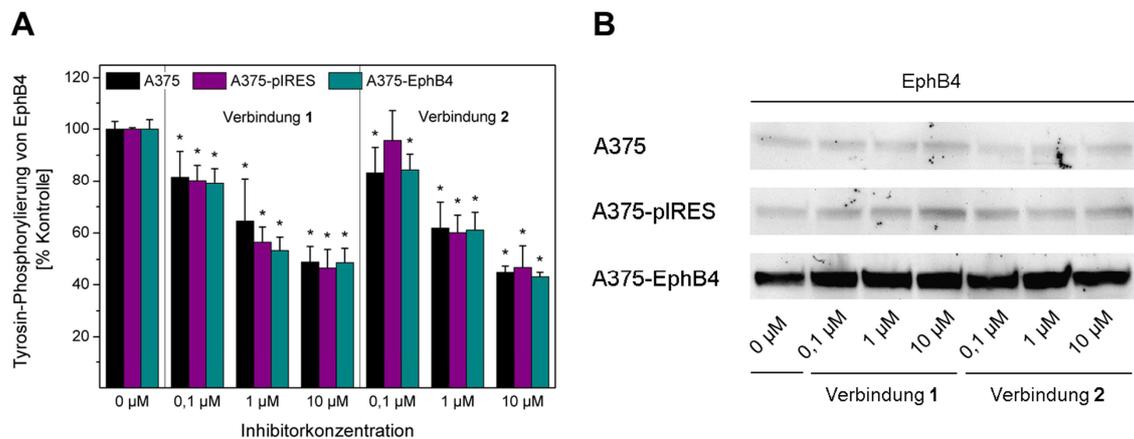


Abbildung 3-23: Relative Konzentration von pEphB4 (A) und EphB4 (B) in Zelllysaten von A375-, A375-pIRES- und A375-EphB4-Zellen, die zuvor für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Verbindung 1 und 2 kultiviert worden waren Die nativen und transfizierten A375-Melanomzellen wurden in 25 cm²-Flaschen für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Verbindung 1 und 2 kultiviert und anschließend lysiert. Die relative Konzentration von pEphB4 (A) und EphB4 (B) wurde mittels pEphB4-ELISA (A) bzw. SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion (B) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (0 µM) ermittelt. (A) Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test; p ≤ 0,05).

3.8.3 Charakterisierung der Zellaufnahme von Verbindung [¹⁸F]2

Um die Eignung von [¹⁸F]2 als Radiotracer zu prüfen, wurde die zelluläre Bindung und Aufnahme bei A375-, A375-pIRES- und A375-EphB4-Zellen untersucht. Bei allen drei Zelllinien stieg die gebundene bzw. aufgenommene Aktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit signifikant an. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den nativen und pIRES2-AcGFP1-transfizierten A375-Zellen sowie den A375-EphB4-Zellen beobachtet (**Abbildung 3-24 (A)**). Die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese führte also nicht zu einer verstärkten [¹⁸F]2-Bindung und -Internalisierung. Aufgrund dessen ist es denkbar, dass nicht die Bindung an EphB4, sondern der Bindung vorgeschaltete Aufnahmemechanismen geschwindigkeitsbestimmend auf die Zellaufnahme wirkten.

Um Hinweise auf mögliche Aufnahmemechanismen zu erlangen, wurde die Bindung und Internalisierung von [^{18}F]2 nach 60 min in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren untersucht (**Abbildung 3-24 (B)**).

- Aufgrund ihrer ähnlichen bzw. gleichen chemischen Struktur sollten Verbindung **1** bzw. **2** zu einer kompetitiven Inhibierung von [^{18}F]2 führen. Mit Ausnahme der A375-pIRES-Zellen führte die Inkubation mit 100 μM Verbindung **1** bzw. **2** zu einer signifikant reduzierten Bindung und Aufnahme von [^{18}F]2. Bei allen drei Zelllinien führte Verbindung **2** zu einer signifikant stärkeren Hemmung der [^{18}F]2-Aufnahme und -Bindung als Verbindung **1**.
- Da kleine Moleküle wie Verbindung **1** und **2** potentielle Substrate für MDR-Proteine darstellen, sollten diese Transporter durch den Einsatz von Verapamil und Cyclosporin A inhibiert werden. Die Zugabe von 10 μM Verapamil und 10 μM Cyclosporin A führte bei allen drei Zelllinien zu einer signifikant verminderten [^{18}F]2- Bindung und -Aufnahme.
- Zur Charakterisierung der Energieabhängigkeit der [^{18}F]2-Aufnahme wurden die Melanomzellen mit Natriumazid inkubiert, da das Azid-Ion die Sauerstoffbindungsstelle des aktiven Zentrums der Cytochrom-c-Oxidase blockiert und somit die ATP-Produktion zum Erliegen bringt. Die 15 mM Natriumazid-Lösung führte bei allen drei Zelllinien zu einer signifikant verminderten [^{18}F]2-Aufnahme.

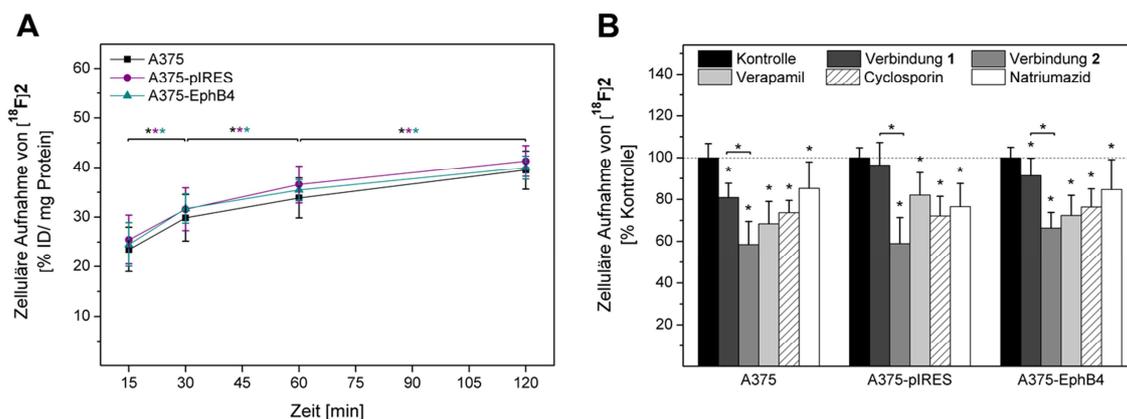


Abbildung 3-24: Zelluläre Bindung und Aufnahme von [^{18}F]2 (A) und Hemmung durch verschiedene Inhibitoren (B) Die nativen und transfizierten A375-Melanomzellen wurden in 24well-Platten kultiviert und nach 30-minütiger Vorinkubation mit den entsprechend verdünnten Inhibitoren bzw. DMSO (Kontrolle) für 15, 30, 60 und 120 min mit Verbindung [^{18}F]2 kultiviert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen wurden diese durch Zugabe von NaOH-SDS lysiert, um im Anschluss daran die Aktivität und Proteinkonzentration des Zelllysates zu bestimmen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (n=12). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * gekennzeichnet (einfache ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test; $p \leq 0,05$).

3.8.4 Charakterisierung des In-vivo-Metabolismus von Verbindung [^{18}F]2 im A375-pIRES/EphB4-Tumor-Xenograft-Modell

3.8.4.1 Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographie

Die Charakterisierung des In-vivo-Metabolismus von Verbindung [^{18}F]2 erfolgte mittels Kleintier-PET (siehe 2.6.4).

Verbindung [^{18}F]2 wurde 100 s nach dessen Injektion insbesondere in den aufsteigenden Blutgefäßen, aber auch in der Lunge detektiert (**Abbildung 3-25 (A)**). Wie in **Abbildung 3-25 (B)** dargestellt ist, kam es nach 30 min (1.800 s) zur Anreicherung in der Lunge, der Leber, dem Darm und in geringeren Mengen auch in der Blase. Dies deutet darauf hin, dass es nach dieser Zeit bereits zur Ausscheidung von Verbindung [^{18}F]2 oder deren Metaboliten gekommen war. In den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren hingegen wurde nur wenig Aktivität detektiert, was möglicherweise auf die schnelle Exkretion des Radiotracers zurückzuführen ist.

Die in **Abbildung 3-25 (D)** dargestellten Zeit-Aktivitätskurven der A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren unterscheiden sich nicht, so dass davon auszugehen ist, dass es unter den gewählten Versuchsbedingungen zu keiner spezifischen Anreicherung von [^{18}F]2 in den EphB4-überexprimierenden A375-Tumoren gekommen war. Der Vergleich mit der Zeit-Aktivitätskurve einer Vene deutet jedoch darauf hin, dass die in den Tumoren gefundene Aktivität nicht nur auf die Tumorperfusion zurückzuführen ist, sondern dass es zu einer geringen Anreicherung des Radiotracers gekommen war. Die Maximum-Intensitäts-Projektion verdeutlicht, dass Verbindung [^{18}F]2 über den gesamten Untersuchungszeitraum von 120 min (7.200 s) vorrangig hepatobiliär ausgeschieden wurde und die renale Exkretion eine untergeordnete Rolle spielte (**Abbildung 3-25 (C)**).

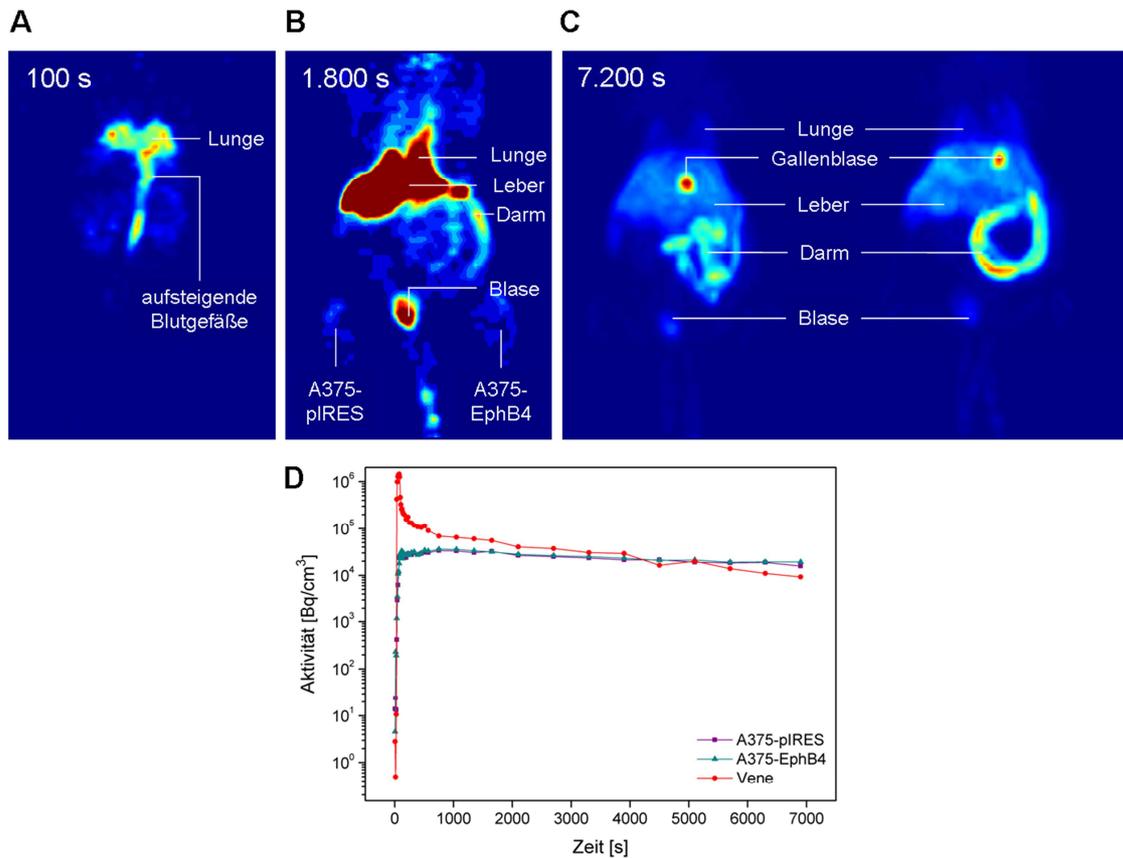


Abbildung 3-25: PET (Maximum-Intensitäts-Projektion) 100 s (A), 1.800 s (B) und 7.200 s (C) nach Injektion von $[^{18}\text{F}]2$ in Nacktmäuse mit subkutanen A375-pIRES- (links) bzw. A375-EphB4-Tumoren (rechts) und quantitative Auswertung der in den Tumoren bzw. in den aufsteigenden Blutgefäßen akkumulierten Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit (D) (A-C) $[^{18}\text{F}]2$ wurde intravenös injiziert und die Verteilung mittels PET 100 s, 1.800 s (30 min) und 7.200 s (120 min) nach Injektion des Radiotracers bestimmt. (D) Mit Hilfe der Software Rover 2.0.50 wurden im Bereich der subkutanen A375-pIRES/EphB4-Tumoren sowie im Bereich der aufsteigenden Blutgefäße geeignete ROIs definiert und die akkumulierte Aktivität (Bq/cm^3) im jeweiligen ROI über einen Zeitraum von 7.200 s (120 min) graphisch dargestellt.

3.8.4.2 Autoradiographie

Im Anschluss an die $[^{18}\text{F}]2$ -PET-Untersuchungen wurde mit Gefrierschnitten der ganzen Maus bzw. der entnommenen Tumoren eine Autoradiographie durchgeführt (siehe 2.6.7).

Wie in **Abbildung 3-26 (A)** gezeigt ist, konnte dabei sowohl die hepatobiliäre Exkretion als auch die sehr geringe Anreicherung des Radiotracers in den Tumoren bestätigt werden. Die Verteilung von $[^{18}\text{F}]2$ in den Tumorschnitten erscheint heterogen, was auf eine ungleichmäßige Perfusion der Tumoren oder aber auf eine variierende spezifische Anreicherung hindeutet (**Abbildung 3-26 (B)**).

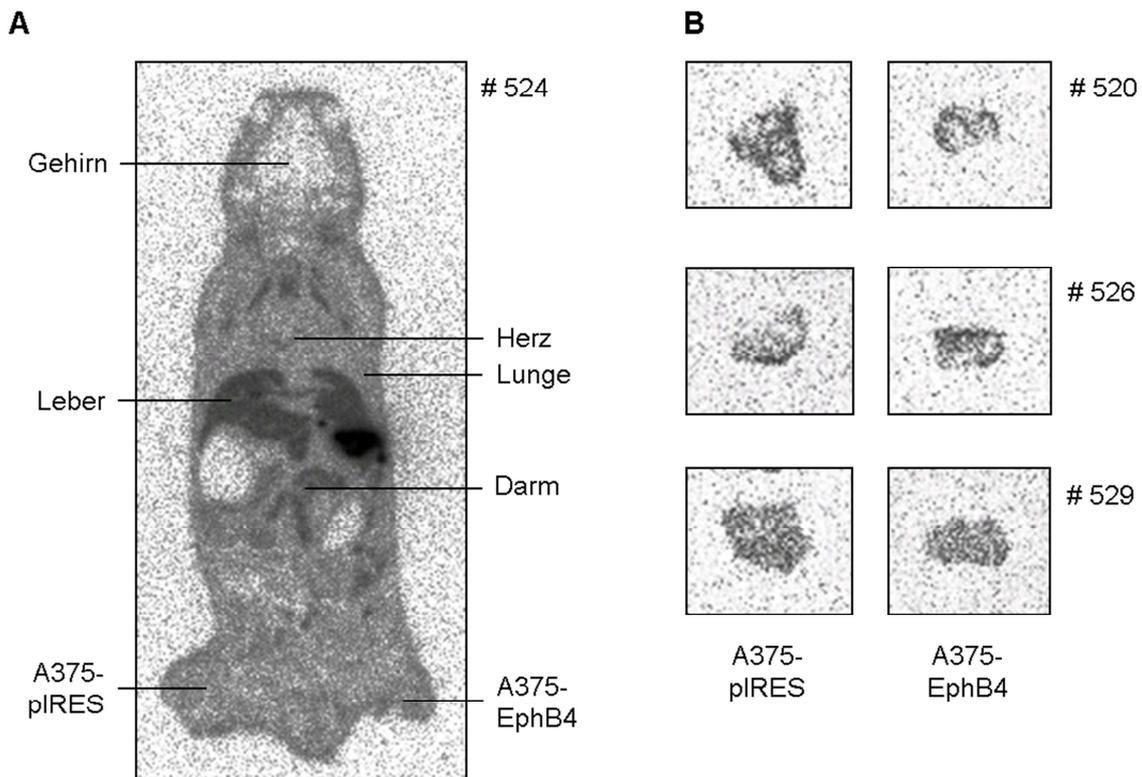


Abbildung 3-26: Autoradiographie einer NMRI (*nu/nu*)-Maus mit subkutanen A375-pIRES- (links) und A375-EphB4-Tumoren (rechts) (A) bzw. der entnommenen Tumoren (B) 120 min nach der Injektion von $[^{18}\text{F}]\text{2}$. Die Tumor-Mäuse wurden im Anschluss an die PET-Untersuchungen getötet und Ganztierschnitte (80 μm) (A) bzw. Schnitte der entnommenen Tumoren (10 μm) (B) angefertigt. Die getrockneten Schnitte wurden für 80 min (A) bzw. 60 min (B) im Dunkeln mit einer Phosphor-Radioluminographie-Detektionsplatte inkubiert. Die Auswertung der Autoradiographie erfolgte am Radioluminographie-Scanner BAS 5000.

3.8.4.3 Bioverteilung

Vergleichend zur Untersuchung des In-vivo-Metabolismus mittels PET wurde die Bioverteilung von Verbindung $[^{18}\text{F}]\text{2}$ 5 min bzw. 60 min nach dessen Injektion bestimmt (**Abbildung 3-27**). Bereits nach 5 min kam es zur stärksten Anreicherung des Radiotracers in der Leber. Noch nach 60 min befand sich die meiste Aktivität in der Leber, aber auch in den Nieren. Im Gegensatz dazu war der SUV der A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren sehr niedrig, was wiederum die Ergebnisse der PET und Autoradiographie bestätigt. Da im Femur keine nennenswerte Aktivität gefunden wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es nicht zur Defluorierung des Radiotracers $[^{18}\text{F}]\text{2}$ gekommen war.

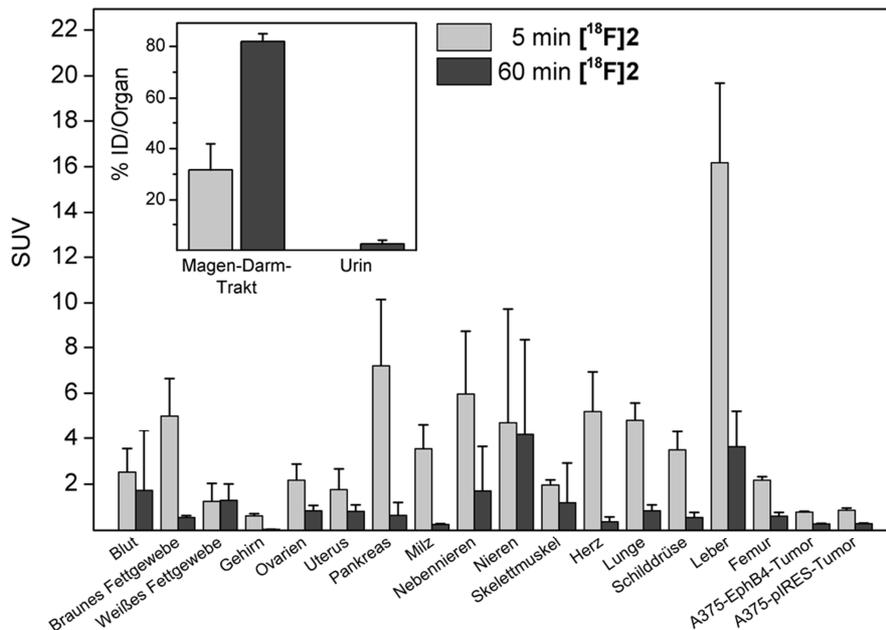


Abbildung 3-27: Bioverteilung von $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ bei NMRI (*nu/nu*)-Mäusen mit subkutanen A375-piRES- und A375-EphB4-Tumoren 5 min bzw. 60 min nach Injektion des Radiotracers Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n=3$) als standardisierte Aufnahmewerte (SUV).

3.8.4.4 Metabolitenanalyse

Des Weiteren wurde die metabolische Stabilität von Verbindung $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ überprüft. Dazu wurde Verbindung $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ intravenös in Ratten injiziert. Nach 120 min konnten noch etwa 85% der Aktivität im Plasma von arteriellem Rattenblut der Verbindung $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ zugeordnet werden. Im Dünndarminhalt wurden radioaktive Metaboliten des neuen Radiotracers gefunden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter charakterisiert werden konnten.

Obwohl ^{18}F -radiomarkierte EphB4-Kinaseinhibitoren einen vielversprechenden Ansatz für die In-vivo-Bildgebung von EphB4 darstellen, verdeutlichten sowohl die Ergebnisse der PET als auch der Bioverteilungsexperimente, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierte Verbindung $[^{18}\text{F}]\mathbf{2}$ als Radiotracer ungeeignet ist. Dies könnte dadurch begründet sein, dass Radiotracer, die gegen eine intrazelluläre Domäne ihrer Zielstruktur gerichtet sind, neben einer günstigen Pharmakokinetik auch über die Fähigkeit zur Membranpermeation verfügen müssen. Eine alternative Strategie zur In-vivo-Bildgebung des Eph-Ephrin-Systems könnten lösliche Eph-Rezeptoren bzw. Ephrine darstellen, da deren Zielstruktur die extrazellulär lokalisierte Eph-Rezeptor- bzw. Ephrin-Bindungsdomäne ist.

3.9 Reinigung und Charakterisierung rekombinanter, löslicher Eph-Rezeptoren

3.9.1 Proteinbiosynthese und Sekretion von sEphB4 und sEphB6

Zur Gewinnung der rekombinanten, löslichen Eph-Rezeptoren sEphB4 und sEphB6 wurden COS-7-Zellen mit den Expressionsvektoren pSecTag2B-sEphB4 bzw. -sEphB6 transfiziert und jeweils ein geeigneter Zellklon für weiterführende Experimente ausgewählt (siehe 2.3.4).

Wie in **Abbildung 3-28 (A)** dargestellt, konnte in nativen COS-7-Zellen erwartungsgemäß keine Proteinbiosynthese von sEphB4 oder sEphB6 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde sEphB4 bzw. sEphB6 nach der Transfektion mit dem entsprechenden Plasmid sowohl im Zelllysat als auch im Zellkulturüberstand der COS-7-Zellen detektiert. Um eine Kontamination der rekombinanten Proteine mit Albumin zu vermeiden, musste die FKS-Konzentration im Zellkulturmedium so weit wie möglich reduziert werden. Aufgrund dessen wurde die Sekretion der löslichen Eph-Rezeptoren in Abhängigkeit von der FKS-Konzentration im Zellkulturmedium untersucht. Wie in **Abbildung 3-28 (B)** zu sehen ist, führte die Reduktion der FKS-Konzentration im Zellkulturmedium von 10% auf 1% bzw. 0% zu einer deutlich stärkeren Sekretion von sEphB4 und sEphB6 in den COS-7-Zell-Überstand. Aufgrund dessen wurde fortan für die Dauer der sEphB4- und sEphB6-Gewinnung auf den Zusatz von FKS zum Zellkulturmedium verzichtet.

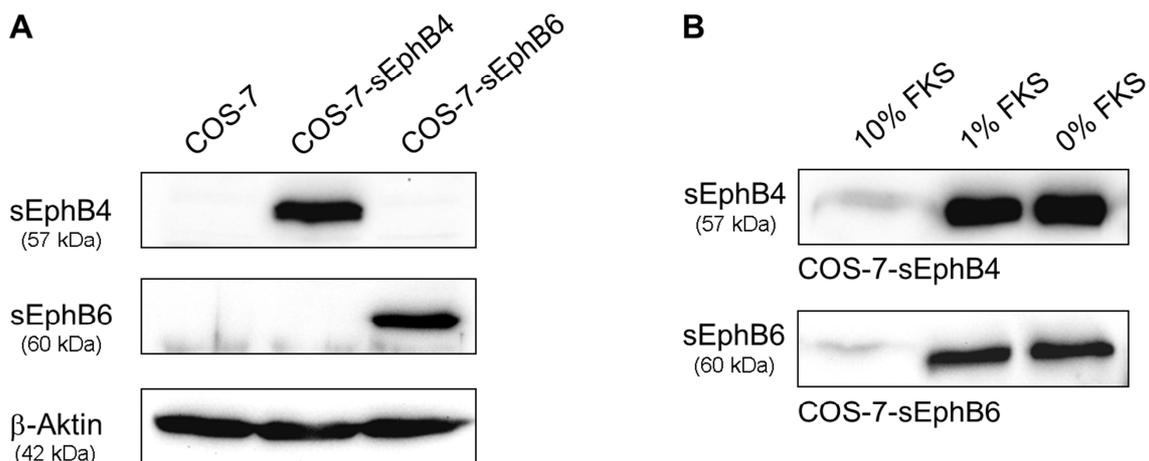


Abbildung 3-28: Nachweis von sEphB4, sEphB6 und β-Aktin in Zelllysaten (A) und Zellkulturüberständen (B) von nativen und transfizierten COS-7-Zellen Die Proteinbiosynthese von sEphB4, sEphB6 und β-Aktin bzw. die Sekretion von sEphB4 und sEphB6 in den Zellüberstand wurde mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Immundetektion bestimmt. β-Aktin diente bei der Untersuchung der Zelllysate als Kontrolle für den Auftrag gleicher Proteinkonzentrationen. Dargestellt sind Ausschnitte je eines repräsentativen Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

3.9.2 Reinigung von rekombinantem sEphB4 und sEphB6 aus COS-7-Zellkulturüberständen

Die Reinigung der rekombinanten, löslichen Eph-Rezeptoren sEphB4 und sEphB6, die C-terminal an einen His₆-Tag gebunden sind, erfolgte mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie (siehe 2.4.7). Bei dieser Form der Metall-Affinitätschromatographie kommt es zur Komplexierung von Histidin-Resten des His₆-Tags der rekombinanten Proteine mit Ni²⁺-Ionen, die wiederum durch NTA komplexiert und damit an die Säulenmatrix gebunden sind.

Für die Reinigung von sEphB4 und sEphB6 aus den COS-7-Zellkulturüberständen stand neben einer kommerziell erhältlichen, fertig gepackten HisTrap™ FF crude-Säule (**Abbildung 2-10 (A)**) Ni²⁺-NTA-Agarose der Firma Qiagen zum Befüllen von Chromatographie-Säulen zur Verfügung. Mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Agarose wurden die rekombinanten Proteine im kontinuierlichen (**Abbildung 2-10 (B)**) oder diskontinuierlichen (*Batch*-) Verfahren (**Abbildung 2-10 (C)**) gereinigt.

Hinsichtlich der praktischen Durchführung und der erzielten Reinigungswirkung erwies sich das kontinuierliche Verfahren mit der Ni²⁺-NTA-Agarose (**Abbildung 2-10 (B)**) als am besten geeignet. Durch die Verwendung von 5 mM Imidazol im Bindungspuffer und 100 mM Imidazol im Elutionspuffer konnte eine optimale Elution von sEphB4 und sEphB6 bei gleichzeitig möglichst geringer unspezifischer Bindung anderer Proteine erreicht werden¹¹. Dank dem Einsatz einer peristaltischen Pumpe und der daraus resultierenden langsamen, aber kontinuierlichen Beladung der Ni²⁺-NTA-Matrix kam es zu einer fast vollständigen Bindung des im COS-7-Zellkulturüberstand enthaltenen sEphB4 bzw. sEphB6 (**Abbildung 3-29 (A/C)**), während sich andere Proteine im Durchlauf befanden oder während der Waschschriffe eluiert wurden (**Abbildung 3-29 (B/D)**). Aufgrund der erhöhten Imidazolkonzentration im Elutionspuffer kam es schließlich zur Verdrängung der über den His₆-Tag gebundenen, rekombinanten Proteine von der Ni²⁺-NTA-Phase und damit zu deren Elution. Wie in den entsprechenden Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gelen in **Abbildung 3-29 (B/D)** zu erkennen ist, wiesen die Eluate keine nennenswerten Konzentrationen anderer Proteine auf.

¹¹ Die Optimierung und der Vergleich der Ni²⁺-Affinitätschromatographie-Methoden sowie die Entsalzung der rekombinanten Proteine erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Frau Dipl.-Chem. (FH) Katharina Müller, die von der Autorin der vorliegenden Arbeit betreut wurde.

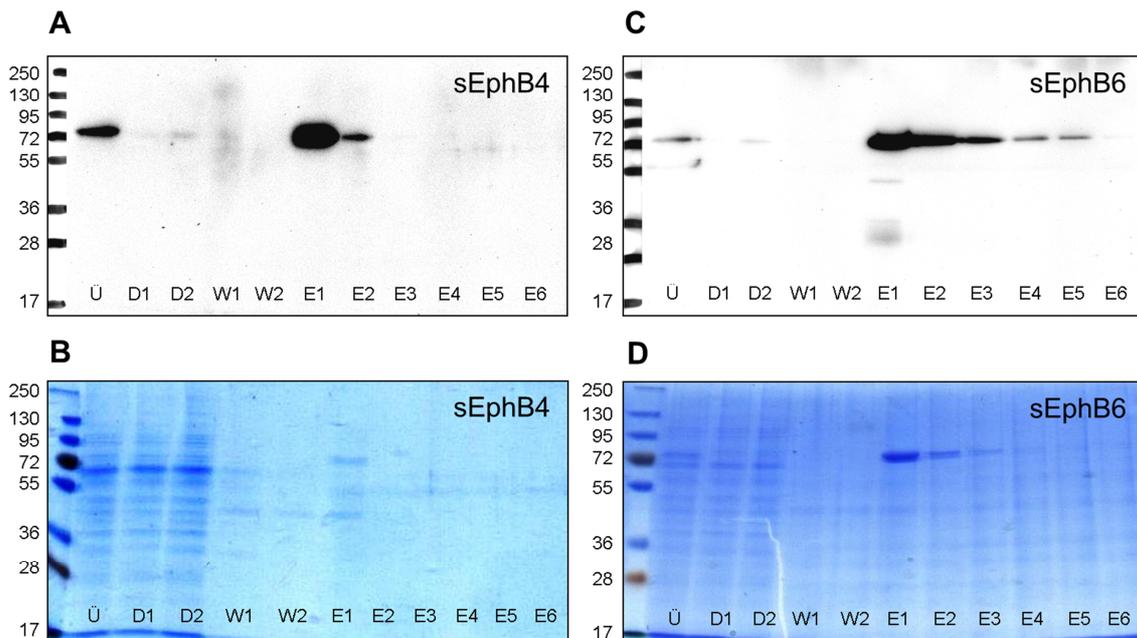


Abbildung 3-29: Nachweis von sEphB4 (A/B) und sEphB6 (C/D) im COS-7-Zellkulturüberstand (Ü) sowie im Durchlauf 1 und 2 (D1/D2), Waschschrift 1 und 2 (W1/W2) und den sechs Eluaten (E1-E6) der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie Die Proben wurden mit fünffach-konzentriertem Probenpuffer versetzt, 7 min bei 99°C gehalten und anschließend in jeweils zwei Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Während ein Polyacrylamid-Gel zum Protein-Nachweis mit Coomassie Brilliantblau gefärbt wurde (B/D), erfolgte mit Hilfe des zweiten Gels der spezifische Nachweis von sEphB4 bzw. sEphB6 mittels Western Blotting und Immundetektion (A/C).

Um einen Einfluss auf nachfolgende Untersuchungen auszuschließen, sollten die im Elutionspuffer enthaltenen Salze (NaCl , NaH_2PO_4) und das Imidazol im Anschluss an die Ni^{2+} -Affinitätschromatographie mittels FPLC entfernt werden. Unter Verwendung einer HiTrap™ Desalting-Säule (Bettvolumen: 5 ml, Ausschlussgröße: 5 kDa) konnte jedoch keine vollständige Trennung von den Salzen erreicht werden (Daten nicht im Detail dargestellt). Aufgrund dessen wurde die Superdex™ 75 10/300 GL-Gelfiltrationssäule (Bettvolumen: 24 ml, Trennbereich: 3 - 70 kDa) getestet. Diese führte zwar zu einer erfolgreichen Entsalzung der Proteine, jedoch war die Proteinkonzentration in den erhaltenen Eluaten sehr gering, so dass sich diese Methode auch als unpraktikabel erwies (Daten nicht im Detail dargestellt). Alternativ zur FPLC wurde die Entfernung von Salzen und Imidazol schließlich durch den Einsatz von Vivaspin-6-Zentrifugalkonzentratoren erreicht. Zur dauerhaften Lagerung wurden die rekombinanten Proteine anschließend gefriergetrocknet (siehe 2.4.7.6). Auf diese Weise konnten mit jeweils sieben Reinigungen etwa 0,66 mg sEphB4 und 1,75 mg sEphB6 gewonnen werden, die nun für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Methoden zur Reinigung von sEphB4 und sEphB6 etabliert wurden und sich schließlich das kontinuierliche Verfahren mit der Ni^{2+} -NTA-Agarose als geeignetste Methode erwies. Mit Hilfe dieser Reinigungsmethode können die rekombinanten Proteine in ausreichender Reinheit und Ausbeute für nachfolgende Untersuchungen bereitgestellt werden. Somit wurden die Voraussetzungen geschaffen, um sEphB4 und sEphB6 in weiterführenden Experimenten mit einem Radionuklid, wie z.B. ^{18}F , zu markieren und anschließend auf ihre Eignung als Radiotracer für die In-vivo-Bildgebung von EphrinB2 zu prüfen. Da beim Melanom eine positive Korrelation zwischen der EphrinB2-Expression und den prometastatischen Eigenschaften von Melanom-Zelllinien sowie dem klinischen Fortschreiten beim Patienten festgestellt wurde und EphrinB2 somit einen potentiellen diagnostischen und prognostischen Marker darstellt [82], könnten sich die ^{18}F -markierten, rekombinanten Proteine sEphB4 und sEphB6 als Radiotracer für die In-vivo-Bildgebung maligner Melanome und deren Metastasen eignen.

Leider gelang es bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit nicht, rekombinantes sEphrinB2 zu gewinnen. Dieses könnte nach einer entsprechenden Radiomarkierung mit ^{18}F die In-vivo-Bildgebung von EphB4 und EphB6 ermöglichen und somit eine Alternative zu dem bereits diskutierten, ^{18}F -markierten EphB4-Kinaseinhibitor darstellen. Aufgrund dessen sollte das Ziel weiterführender Experimente die erfolgreiche Klonierung von sEphrinB2 und nachfolgend dessen Gewinnung, Reinigung und Radiomarkierung sein.

4 Diskussion

4.1 Therapiemöglichkeiten und Bedeutung von Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen beim malignen Melanom

Beim Melanom handelt es sich um eine aggressive und früh metastasierende Tumorentität. Aufgrund dessen ist eine exakte Beurteilung des Tumorstadiums, beispielsweise für die Planung der Therapie, wichtig. Im Stadium 0, dem Melanom *in situ*, ist die Ausbreitung der Tumorzellen auf die Epidermis begrenzt und das Risiko für ein Rezidiv nach der chirurgischen Entfernung des Melanoms ist sehr gering. Auch bei einem Melanom im Stadium I ist das Metastasierungs- und Rezidiv-Risiko noch gering. In diesem Stadium wird jedoch bereits die Identifizierung und Biopsie der Sentinel- oder Wächterlymphknoten empfohlen [115]. Hierbei handelt es sich um mindestens einen das jeweilige Hautareal primär drainierenden Lymphknoten, der als wahrscheinlichster Ort einer frühen Metastasierung gilt. Mit dem Übergang ins Stadium II, in dem per Definition noch keine Metastasen diagnostiziert wurden, steigt das Risiko für eine Metastasierung bereits an. Aufgrund dessen umfasst die Therapie eines solchen Melanoms neben der chirurgischen Entfernung des Tumors auch die Gabe von Immunsystem-aktivierenden Substanzen, wie z.B. IFN- α , um die Immunreaktion gegen eventuell noch vorhandene Tumorzellen zu fördern. Bei einem Melanom im Stadium III bzw. IV wurden bereits Metastasen in direkt angrenzenden Hautarealen, abführenden Lymphgefäßen und/oder Lymphknoten (Stadium III) bzw. in entfernt gelegenen Organen (Stadium IV) diagnostiziert [115, 116]. Obwohl die prognostische Aussagekraft und der therapeutische Einfluss einer vollständigen Entfernung der Sentinel-Lymphknoten umstritten ist, wird diese aufgrund der Schmerzlindernden Wirkung ab Stadium III empfohlen [29, 115].

Während die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit einem weniger als 1 mm dicken, primären Melanom nach dessen chirurgischer Entfernung mit circa 97% gut ist, ändert sich dies dramatisch, sobald es zur Metastasierung kommt. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit metastasierendem Melanom sinkt auf unter 10% und die mittlere Überlebenszeit beträgt nur vier bis sechs Monate [3, 4, 29, 116]. Die Ursache dafür liegt in der begrenzten Wirksamkeit bisher bekannter Therapieansätze, wie z.B. der Chemotherapie, der Immuntherapie mit IFN- α oder IL-2 aber auch der neu

entwickelten Substanzen wie Ipilimumab (Inhibitor des zytotoxischen T-Lymphozyten-Antigens 4) und Vemurafenib (B-Raf-Inhibitor).

Adaptive Zelltherapie

Einen vielversprechenden, therapeutischen Ansatz hingegen stellt die adaptive Zelltherapie dar, die in vereinfachter Form bereits 1988 publiziert wurde [117, 118]. Hierbei werden dem Patienten Melanom-Metastasen mit einem Durchmesser von mindestens 2 cm entnommen. Aus diesen werden Tumor-infiltrierende T-Lymphozyten (TIL) isoliert, die *in vitro* und damit fernab von den im Körper vorhandenen, immunsuppressiven Einflussfaktoren vermehrt werden. Derartige gegen den Tumor gerichtete T-Lymphozyten kommen interessanterweise nur beim Melanom und zwar bei etwa 80% aller Patienten in signifikanter Anzahl natürlich vor [117, 119]. Nach einer vollständigen Lymphdepletion des Patienten, die mit Hilfe einer Kombination aus Chemotherapie und Ganzkörper-Bestrahlung (2 bzw. 12 Gy) erreicht wird, werden dem Patienten die aktivierten T-Lymphozyten gemeinsam mit IL-2 injiziert. IL-2 fördert das Wachstum und die Reifung von T- und B-Lymphozyten und bewirkt somit eine Aktivierung des Immunsystems [3]. Bei der adaptiven Zelltherapie verbleiben die aktivierten T-Lymphozyten über einen Zeitraum von etwa einem Monat in der Blutzirkulation und können in dieser Zeit zur Tumorabwehr beitragen. Auf diese Weise konnte, in Abhängigkeit der zur Lymphdepletion gewählten Bestrahlungsdosis, bei etwa 50% (0 und 2 Gy) bzw. 72% (12 Gy) der Patienten ein Rückgang des Tumors erreicht werden. Bei 12% (0 Gy) bis 40% (12 Gy) der Patienten wurde auf diese Weise sogar eine Rezidiv-freie Überlebenszeit von drei bis sechs Jahren und damit möglicherweise eine komplette Heilung erreicht. Die Patienten befinden sich derzeit noch in der Nachbeobachtungsphase. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Ergebnisse durch Rosenberg und Kollegen lag die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei 29%. Somit stellt die adaptive Zelltherapie aktuell eine der besten bisher bekannten Therapiemöglichkeiten beim metastasierenden Melanom dar, insbesondere dann, wenn andere Therapieansätze keine Wirkung gezeigt haben [117, 120].

Gleichzeitig gibt der Erfolg der adaptiven Zelltherapie Hinweise auf die Bedeutung des Immunsystems für die Progression und Metastasierung des malignen Melanoms und stellt dessen Potential für die Entwicklung neuer Therapien heraus. Darüber hinaus deuten das Vorhandensein eines inflammatorischen Tumoringfiltrats sowie die Expression von T-Zell-aktivierenden Antigenen auf den Tumorzellen darauf hin, dass es sich beim Melanom um einen antigenen und immunogenen Tumor handelt. Zudem gehört das Melanom zu den Neoplasien, bei denen es am häufigsten zur Regression,

das heißt zur spontanen Rückbildung kommt, was möglicherweise auf eine erfolgreiche Immunabwehr zurückzuführen ist [29, 121, 122].

Derzeit sind die einzelnen Komponenten des inflammatorischen Tumordinfiltrats beim Melanom und deren Bedeutung sowie die damit assoziierten molekularen Mechanismen noch unzureichend geklärt. In diesem Zusammenhang ist eine Beteiligung des Eph-Ephrin-System denkbar, da diese Proteine bei einer Reihe von hämatopoetischen Zellen und dem Thymus exprimiert werden [73, 78, 123-125]. Darüber hinaus wurde, insbesondere für EphB6, eine funktionelle Bedeutung für das Immunsystem beschrieben [77].

Ausgehend von diesem Hintergrund wurde folgende Hypothese formuliert: Die Eph-Ephrin-vermittelte Interaktion von Melanomzellen und Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen beeinflusst die Progression und Metastasierung des malignen Melanoms. Im Speziellen sollte die Bedeutung der Rezeptoren EphB4 und EphB6 und deren Ligand EphrinB2 geprüft werden. Da die Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden im Gegensatz zu den meisten anderen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) primär nicht als onkogene Wachstumsfaktoren wirken und somit nicht vorrangig Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen [92], lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf anderen protumorigenen Wirkmechanismen, wie der Beeinflussung der Invasivität der Melanomzellen und der Beeinflussung der Tumorangiogenese.

4.2 Vorkommen von EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei humanen Melanomzellen und inflammatorischen Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die ausgewählten Zellmodelle zunächst auf das Vorkommen von EphB4, EphB6 und EphrinB2 untersucht. Dabei wurde sowohl die mRNA-Expression (siehe 2.2.3) als auch die Proteinbiosynthese (siehe 2.4.4 und 2.4.5) analysiert. Die verwendeten humanen Melanomzelllinien waren Mel-Juso, A375 und A2058. Als Modell für Tumor-assoziierte inflammatorische Zellen dienten die humanen Leukämiezelllinien HL-60 und THP-1, die zu Makrophagen-(HL-60(M), THP-1(M)) bzw. Granulozyten-artigen Zellen (HL-60(G)) differenziert wurden (siehe 2.3.9 und 2.3.10).

Vorkommen von EphB4 bei Melanomzellen

Die Mel-Juso-, A375- und A2085-Melanomzellen zeigten eine deutliche EphB4-mRNA-Expression, die auch auf Proteinebene verifiziert wurde (siehe 3.1 und 3.2). Bei den A375-Zellen wurde tendenziell die höchste und bei den A2058-Zellen die niedrigste EphB4-Proteinbiosynthese nachgewiesen, womit die auf mRNA-Ebene identifizierten

Trends bestätigt wurden. Die EphB4-Proteinbiosynthese in den genannten Melanomzelllinien wurde im Rahmen anderer Untersuchungen am Institut für Radiopharmazie verifiziert [126].

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit konnte die Arbeitsgruppe um Martiny-Baron in A375-Melanomzellen keine EphB4-mRNA-Expression nachweisen [62] und auch Heroult und Kollegen stellten fest, dass die Proteinbiosynthese von EphB4 und EphrinB2 in A375-Melanomzellen an bzw. unter der Nachweisgrenze liegt [70]. Yang und Kollegen fanden bei einer Reihe anderer Melanomzellen eine starke positive Korrelation zwischen der EphB4-Proteinbiosynthese und der Malignität der Melanomzellen [68].

Vorkommen von EphB6 bei Melanomzellen

Im Gegensatz zu EphB4 wurde EphB6 von allen drei Melanomzelllinien nur sehr schwach exprimiert (siehe 3.1). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zwischen Mel-Juso-, A375- und A2058-Zellen keine signifikanten Unterschiede in der EphB6-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Tendenziell exprimierten A2058-Zellen, die aus der Hirnmetastase eines Melanopatienten stammen [89], jedoch weniger EphB6 als A375-Zellen, so dass eine Korrelation zwischen der EphB6-Expression und der Malignität der Zellen vermutet werden kann. Aufgrund des Fehlens geeigneter Antikörper bzw. der zu geringen Syntheserate konnte die Proteinbiosynthese von EphB6 bei den Melanomzellen nicht verifiziert werden.

Die derzeitigen Kenntnisse zur Bedeutung von EphB6 beim malignen Melanom gehen auf Untersuchungen durch Hafner und Kollegen zurück. Diese zeigten, dass in der gesunden Haut nach dem Thymus die zweitstärkste EphB6-mRNA-Expression zu finden ist [72] und dass es im Verlauf der Melanomprogression zu einer deutlichen Abnahme der EphB6-Expression kommt [75]. Im Vergleich zu gutartigen Nävi, welche die höchste EphB6-mRNA-Expression zeigten, wurde in primären Melanomen eine tendenziell verminderte EphB6-mRNA-Expression nachgewiesen, die jedoch relativ starken interindividuellen Schwankungen unterlag. In den Melanom-Metastasen hingegen kam es im Vergleich zu den gutartigen Nävi zu einer signifikanten Reduktion der EphB6-mRNA-Expression. Die gleiche Tendenz wurde *in vitro* bei der Untersuchung von Melanomzelllinien festgestellt. Melanomzellen mit metastatischem Potential, wie z.B. A375-Zellen, exprimierten signifikant weniger EphB6 als Melanomzelllinien primärer Melanome oder als Melanozyten. Analog zu den Gewebeproben zeigten auch die Melanomzelllinien, die aus Primärtumoren stammten, eine starke Heterogenität bezüglich der EphB6-Expression [75].

Vorkommen von EphrinB2 bei Melanomzellen

Sowohl EphB4 als auch EphB6 stellen potentielle Rezeptoren für EphrinB2 dar, wobei EphB4 eine erhöhte Bindungsaffinität für EphrinB2 aufweist und daher als bevorzugter Rezeptor diskutiert wird. EphrinB2 wurde bei allen drei Melanomzelllinien nachgewiesen (siehe 3.1). A2058-Zellen, welche aus einer Hirnmetastase isoliert wurden [89], wiesen im Vergleich zu Mel-Juso- und A375-Zellen, die aus Primärtumoren stammen [87, 88], signifikant höhere EphrinB2-mRNA-Konzentrationen auf. Dies deutet auf eine Korrelation zwischen der EphrinB2-Expression und der Malignität von Melanomzellen hin.

Auch Vogt und Kollegen stellten die Hypothese auf, dass es einen positiven Zusammenhang zwischen der EphrinB2-Expression und dem Tumorwachstum sowie der Malignität von humanen Melanomen gibt. Im Vergleich zu gutartigen Nävi fanden sie in fortgeschrittenen primären Melanomen und deren Metastasen eine erhöhte EphrinB2-mRNA-Expression. Darüber hinaus ergab der Vergleich verschiedener Melanom-Zelllinien, dass es auch *in vitro* einen positiven Zusammenhang zwischen der Malignität der Melanomzellen und ihrer EphrinB2-Expression gibt. A375-Melanomzellen, die auch für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, wiesen dabei eine vergleichsweise hohe EphrinB2-mRNA-Expression auf [82]. In fortführenden, immunhistologischen Untersuchungen zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass EphrinB2, zusammen mit EphB2, vorrangig an der invasiven Front der malignen Melanome exprimiert wird, was eine Beteiligung von EphrinB2 an der Zellmigration und ECM-Interaktion vermuten lässt. Da an der invasiven Front gleichzeitig eine verstärkte Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) nachgewiesen wurde, könnte diese eine der molekularen Schnittstellen zwischen der EphrinB2-Signalgebung und der Regulation des Zytoskeletts, beispielsweise während der Zelladhäsion und Zellmigration, darstellen [52, 83].

Bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit lagen keine Veröffentlichungen über den Nachweis von EphB4, EphB6 oder EphrinB2 bei den Melanomzelllinien Mel-Juso und A2058 vor.

Einfluss der Differenzierung von HL-60- bzw. THP-1-Zellen auf die mRNA-Expression von EphB4, EphB6 und EphrinB2

Als Modell für Tumor-assoziierte inflammatorische Zellen dienten die humanen Leukämiezelllinien HL-60 und THP-1, die zu Makrophagen- (HL-60(M), THP-1(M)) bzw. Granulozyten-artigen Zellen (HL-60(G)) differenziert wurden.

Die nativen HL-60- und THP-1-Zellen wiesen eine vergleichbare EphB4-mRNA-Expression auf, während die EphB6- und EphrinB2-mRNA-Konzentration bei den THP-1-Zellen signifikant niedriger war als bei HL-60-Zellen (siehe 3.1).

Die Differenzierung der THP-1-Zellen zu THP-1(M) führte zu einer signifikant verminderten EphB4-mRNA-Expression bei einer gleichzeitig signifikant erhöhten EphrinB2-mRNA-Expression. Die THP-1- und THP-1(M)-Zellen wurden jedoch für alle fortführenden Experimente nicht weiter genutzt.

Die Differenzierung der HL-60-Zellen sowohl zu HL-60(M) als auch zu HL-60(G) ging mit einer signifikanten Reduktion der EphB4-mRNA-Expression einher. Im Gegensatz dazu war die EphB6- und EphrinB2-mRNA-Expression bei HL-60(M) signifikant höher als bei HL-60-Zellen. Die Differenzierung zu HL-60(G) hingegen hatte keinen Einfluss auf die EphB6- und EphrinB2-mRNA-Konzentration. Aufgrund der interessanten gegenläufigen Regulation der Rezeptoren EphB4 und EphB6 bei der Differenzierung der HL-60-Zellen zu HL-60(M) sollte dieses Zellmodell im Fokus nachfolgender Untersuchungen stehen. Darüber hinaus könnten EphB4 und EphB6 möglicherweise als Differenzierungsmarker für HL-60-Zellen dienen.

Der Nachweis der EphB4-, EphB6- und EphrinB2-Proteinbiosynthese gelang in keiner der Leukämiezellen, was wahrscheinlich auf deren insgesamt sehr geringe Transkription und Translation zurückzuführen ist.

Vorkommen von EphB6 bei hämatopoetischen Zellen

Obwohl bereits bekannt war, dass Eph-Rezeptoren und Ephrine bei einer Reihe von hämatopoetischen Zellen und dem Thymus exprimiert werden [73, 78, 123-125], wurde im Jahr 2001 durch die Arbeitsgruppe um Luo erstmalig die funktionelle Bedeutung eines Eph-Rezeptors für das Immunsystem beschrieben. Luo und Kollegen zeigten, dass EphB6, trotz des Fehlens einer funktionstüchtigen Kinasedomäne, nach der Interaktion mit CD3 zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung assoziierter Signalproteine führt. Dies resultierte in einem veränderten Lymphokin-Sekretionsmuster und führte, wahrscheinlich in Abhängigkeit vom Ausmaß der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung, zur Stimulation von normalen T-Zellen bzw. zur Apoptose der T-Zell-Leukämiezelllinie Jurkat. Die Autoren schlussfolgerten, dass EphB6 die Bindung und Aktivierung des T-Zell-Rezeptors verstärkt und somit zur Aktivierung von T-Lymphozyten beiträgt [77, 127]. EphB6 scheint jedoch primär für die T-Zell-vermittelte Immunantwort von Bedeutung zu sein, da er ausschließlich von normalen und transformierten T-Lymphozyten exprimiert wird. Darüber hinaus wurde EphB6 vor allem bei unreifen, intrathymischen CD4⁺CD8⁺-T-Lymphozyten, nicht aber bei reifen, postthymischen CD4⁺- oder CD8⁺-T-Lymphozyten, nachgewiesen. Dies deutet auf eine

Regulation des EphB6-Rezeptors im Verlauf der T-Zell-Entwicklung hin. Insgesamt betrachtet exprimierten nur 1,5% bzw. 0,57% aller Knochenmarkszellen bzw. peripheren Leukozyten EphB6 [78]. Vergleichbar mit der vorliegenden Arbeit gelang auch Luo und Kollegen der Nachweis einer schwachen EphB6-mRNA-Expression in HL-60-Zellen [127]. Dennoch konnte auch die Arbeitsgruppe um Shimoyama keine Proteinbiosynthese von EphB6 bei den myelomonozytischen Zelllinien HL-60 und THP-1 nachweisen [78]. Obwohl EphB6 offensichtlich nur sehr schwach exprimiert wird, kann eine Bedeutung dieses Eph-Rezeptors für hämatopoetische Zellen der myelomonozytischen Linie nicht ausgeschlossen werden.

Vorkommen von EphB4 bei hämatopoetischen Zellen

Wie Untersuchungen von Inada und Kollegen ergaben, ist der prozentuale Anteil EphB4-exprimierender Knochenmarkszellen mit 5% etwas höher als der der EphB6-positiven Zellen. Dabei handelte es sich vorrangig um Erythrozyten- und nicht um Granulozyten- oder Monozyten-Vorläuferzellen. Aufgrund dessen wird eine regulative Beteiligung von EphB4 an der Erythropoese angenommen [123]. Bennett und Kollegen zeigten, dass auch periphere Blutmonozyten und myelomonozytische THP-1- und U937-Zellen EphB4 exprimieren [53, 91].

Vorkommen von EphrinB2 bei hämatopoetischen Zellen

EphrinB2, das sowohl für EphB4 als auch für EphB6 den wichtigsten Liganden darstellt, wurde *in vivo* in einer Reihe lymphatischer Organe, wie z.B. Milz, Lymphknoten und Thymus sowie in Knochenmarksstromazellen nachgewiesen, so dass es in diesen Organen zur Aktivierung von Eph-Rezeptoren führen kann [123, 128]. Aufgrund der Expression von EphrinB2 in hämatopoetischen Stromazellen und dem Vorkommen von EphB4 auf monozytischen Zellen, wird eine Beteiligung dieses Rezeptor-Ligand-Paares bei der Monozyten-Proliferation und -Reifung angenommen [91]. Beispielsweise zeigten Pfaff und Kollegen, dass von Endothelzellen synthetisiertes EphrinB2 für die Adhäsion und Transmigration von EphB-exprimierenden Monozyten von Bedeutung ist und somit die Extravasation von zirkulierenden Leukozyten kontrolliert [84]. Darüber hinaus wurde EphrinB2 von T-Lymphozyten synthetisiert und schien, insbesondere im Zusammenspiel mit EphB6, auf deren Funktion Einfluss zu nehmen. Infolge einer Aktivierung des CD3-T-Zell-Rezeptor-Komplexes auf T-Lymphozyten kam es zur Kolokalisation des T-Zell-Rezeptors mit EphrinB2-bindenden Rezeptoren, vorrangig mit EphB4 und EphB6, in *lipid rafts*. Dies hatte eine Kostimulation des T-Zell-Rezeptors und die Aktivierung von Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-assoziierten Signalwegen zur Folge. Auf

diese Weise bewirkte EphrinB2, unabhängig von CD4⁺-T-Helferzellen, die Proliferation von T-Zellen und die Differenzierung von CD8⁺-Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten [128].

Eignung von Aktin als Haushaltsprotein

Im Rahmen der Untersuchung der Proteinbiosynthese bei den Melanom- und Leukämiezelllinien wurde deutlich, dass Aktin als Haushaltsprotein, insbesondere für vergleichende Untersuchungen zwischen diesen Zellen, nur bedingt geeignet ist (siehe 3.2). Trotz der Auftragung gleicher Proteinkonzentrationen wiesen die THP-1- und HL-60-Zellen in drei unabhängigen Experimenten eine stärkere Aktin-Bande auf als die Melanomzellen.

Auch die vergleichende Untersuchung von Leukozyten aus dem Blut Ungeborener, Kinder und Erwachsener hatte kürzlich ergeben, dass insbesondere bei Monozyten die konstitutive β -Aktin-mRNA-Expression aufgrund von posttranslationalen Regulationsmechanismen nicht immer in einer konstitutiven Proteinbiosynthese resultiert. Die Proteinbiosynthese der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) hingegen unterlag keinerlei Veränderungen [129]. Auch bei der Gegenüberstellung der Proteinbiosynthese verschiedener renaler Tumorzelllinien bzw. Organe erschien die GAPDH, im Vergleich zu β -Aktin und β -Tubulin, als stabilstes Haushaltsprotein. Nur beim Vergleich von Nieren-Tumoren mit normalem Nierengewebe erwies sich die GAPDH als unzweckmäßig, da die Tumoren, möglicherweise aufgrund des Warburg-Effektes, stets eine höhere GAPDH-Proteinbiosynthese aufwiesen [130, 131].

Aufgrund dessen wäre zu prüfen, ob die GAPDH auch für die vergleichende Untersuchungen der Proteinbiosynthese in Leukämie- und Melanomzellen ein geeigneteres Haushaltsprotein als Aktin darstellt.

4.3 Einfluss der Kokultur von Melanomzellen mit HL-60(M) auf die metastatischen und inflammatorischen Eigenschaften der Zellen

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) repräsentieren dank ihrer Phagozytoseaktivität den wichtigsten Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr gegenüber Tumorzellen. Gleichzeitig sind sie, in Form von Antigen-präsentierenden Zellen, aber auch essentiell für die Aktivierung von T-Lymphozyten und damit für die Auslösung einer spezifischen Immunantwort gegenüber Tumorzellen. Allerdings können TAM sowohl anti- als auch

protumorigen wirken, was als Makrophagen-Balance-Hypothese bezeichnet wird [11, 22]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit dienten HL-60(M)-Zellen als Modell für TAM. Aufgrund der interessanten Interaktionsmöglichkeiten zwischen Melanomzellen und HL-60(M), die sich aus den Untersuchungen der mRNA-Expression und Proteinbiosynthese ergeben hatten, sollte der Einfluss der HL-60(M)-Zellen auf die metastatischen und inflammatorischen Eigenschaften der Melanomzellen untersucht werden.

Bedeutung der Adhäsion bei der Melanomentstehung und –progression

Die Adhäsion von Melanomzellen spielt sowohl bei der malignen Transformation von Melanozyten als auch bei der Metastasierung der Melanomzellen eine bedeutende Rolle. Im *Stratum basale* der Haut sind Melanozyten und Keratinozyten in epidermalen Melanineinheiten organisiert, in denen ein Melanozyt durchschnittlich 36 Keratinozyten mit Melanin-haltigen Melanosomen versorgt und diese mitotisch aktiven Basalzellen somit vor UV-induzierten DNA-Schäden schützt [132]. Innerhalb der epidermalen Melanineinheit kontrollieren die Keratinozyten wiederum die Proliferation der Melanozyten. Dabei spielen neben parakrin wirkenden Wachstumsfaktoren, intrazellulären *second messenger* und Signalkaskaden, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle eine Rolle. Maßgebliche Adhäsionsmoleküle auf Tumorzellen sind Cadherine, Integrine und Proteine der Immunglobulin-Familie, wie z.B. CD31 [133].

Während der Melanomentstehung kommt es beispielsweise zum Verlust von E-Cadherin, das für die Kommunikation mit und die Adhäsion an Keratinozyten essentiell ist. Der Verlust der E-Cadherin-vermittelten Adhäsion der Melanozyten an die Keratinozyten entlässt Erstere aus der strukturellen und funktionellen Regulation durch die Keratinozyten. Dies führt zur unkontrollierten Proliferation sowie zur erhöhten Motilität und Invasivität der Melanozyten und somit zur Melanomentstehung und -progression [8-10, 134]. Der Verlust von E-Cadherin geht mit einer erhöhten Expression des neuronalen Cadherins (N-Cadherin) und des *melanoma cell adhesion molecule* (Mel-CAM) einher. Diese sind für die Interaktion von Melanomzellen mit Zellen des Tumorstromas, wie z.B. Fibroblasten und Endothelzellen, von Bedeutung [133].

Darüber hinaus kommt es während der Melanomprogression zu einer veränderten Biosynthese von Proteinen der Integrin-Familie, welche die Adhäsion der Zellen an Bestandteile der ECM, wie z.B. Fibronectin, bewirken.

Interessanterweise ist für die Invasion von Tumorzellen eine moderate Adhäsion optimal, die zwar die Ablösung von der ECM erlaubt, gleichzeitig aber genug Zugkraft für eine gerichtete Zellbewegung ermöglicht [10]. Durch bisher nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen kommt es während der Invasion von Melanomzellen zu einer ständigen Reorganisierung ihrer Adhäsion und der sie umgebenden ECM, was schließlich zum Abbau von Gewebsbarrieren und zur Metastasierung der Melanomzellen führt [83].

In diesem Zusammenhang ist die Beteiligung von Eph-Rezeptoren und deren Ephrin-Liganden denkbar, da beispielsweise EphrinB2 FAK-vermittelt Einfluss auf die Integrin-Funktion und -Signalgebung nimmt [83, 135]. Da es sich bei den Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden um membranständige Proteine handelt, wurde bei allen Experimenten zwischen Zell-Zell-Kontakt-bedingten Effekten und Effekten bedingt durch lösliche Faktoren unterschieden. Dazu wurden die Melanomzellen für 24 h gemeinsam mit HL-60(M)-Zellen bzw. mit deren Überstand kultiviert.

Einfluss der Kokultur mit HL-60(M) auf die Adhäsion von Melanomzellen

Die Kokultivierung mit HL-60(M)-Zellen bzw. die Kultur in HL-60(M)-konditioniertem Medium hatte keinen Einfluss auf die Adhäsion der Mel-Juso-Zellen. Im Gegensatz dazu führte die 24-stündige Kokultur mit HL-60(M)-Zellen sowohl bei den A375- als auch bei den A2058-Zellen zu einer signifikant verminderten Adhäsion der Zellen an das ECM-Protein Fibronektin (siehe 3.3.2).

Dies könnte auf eine verminderte Verankerung mit der Basalmembran und damit auf ein erhöhtes Invasions- und Metastasierungspotential der Melanomzellen infolge des Kontakts mit HL-60(M)-Zellen hinweisen. Da die Inkubation der A375- und A2058-Zellen mit dem Überstand der HL-60(M) zu keiner Reduktion der Adhäsion führte, schien der Effekt gänzlich durch Zell-Zell-Interaktionen und membranständige Proteine bedingt gewesen zu sein.

Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit lagen keine Veröffentlichungen vor, die ähnliche Untersuchungen beschreiben und somit einen Vergleich der Daten ermöglicht hätten.

Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf die Adhäsion von Melanomzellen

Um den Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf die Adhäsion der Melanomzellen untersuchen zu können, wurden A375-Melanomzellen mit entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert, was in einer erhöhten EphB4-, EphB6- bzw. EphrinB2-mRNA-Expression und einer entsprechenden Proteinbiosynthese resultierte (siehe 3.4).

Während die erhöhte Expression von EphB6 und EphrinB2 unter Monokulturbedingungen keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der A375-Zellen hatte, führte die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese zu einer signifikant verstärkten Adhäsion der A375-Zellen an Fibronectin und somit möglicherweise zu einem verminderten Invasionspotential der Zellen (siehe 3.5.1.1). Es gibt allerdings auch Veröffentlichungen, die eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit von Tumorzellen als proinvasiv einstufen, wenn diese mit einer erhöhten Migration der Zellen einhergeht [83]. Aufgrund dessen ist eine abschließende Interpretation der Ergebnisse des Adhäsionsassays erst im Zusammenhang mit den Ergebnissen des Migrationsassays möglich.

Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen zeigten Noren und Kollegen, dass EphB4, sowohl abhängig als auch unabhängig von seiner Aktivierung durch EphrinB2, eine verminderte Adhäsion von Tumorzellen an Fibronectin und Kollagen bewirkt. Als Mechanismus hierfür wurde die EphB4-induzierte Herunterregulation von β 1-Integrinen, die wiederum wichtige zelluläre Adhäsionsmoleküle für Fibronectin und Kollagen darstellen, diskutiert. Im Gegensatz dazu verstärkte die Integrin-vermittelte Adhäsion von Zellen die EphrinB2-induzierte EphB4-Tyrosinphosphorylierung und stellte somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar. Die Verminderung der Integrin-vermittelten Adhäsion von EphB4-exprimierenden Tumorzellen würde nach Ansicht der Autoren deren Metastasierungspotential verringern, da Integrine für die Malignität der meisten Tumorzellen von großer Bedeutung sind [136]. Durch den Einsatz von EphrinB2-Fc könnte in weiterführenden Experimenten geprüft werden, ob die erhöhte Adhäsion der A375-EphB4-Zellen abhängig von der EphB4-Vorwärtssignalgebung war.

Eine Untersuchung mit EphB6-überexprimierenden HEK293T-Zellen ergab, dass EphB6, trotz des Fehlens einer funktionstüchtigen Kinasedomäne, die Adhäsion und Migration von Zellen beeinflusst. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen nicht die Adhäsion an Fibronectin, sondern die Adhäsion an eine EphrinB2-beschichtete Oberfläche bzw. die Migration der Zellen durch eine EphrinB2-beschichtete Membran untersucht. Der dabei beobachtete Effekt war in Abhängigkeit der EphrinB2-Konzentration, die für die Rezeptor-Aktivierung zur Verfügung stand, biphasisch. Während niedrige Konzentrationen von EphrinB2 ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$) zu einer verstärkten Adhäsion bzw. Migration der Zellen an bzw. durch die EphrinB2-beschichtete Oberfläche bzw. Membran führten, kam es bei höheren EphrinB2-Konzentrationen ($\geq 5 \mu\text{g/ml}$) zu einer verminderten Adhäsion und schließlich sogar zur Repulsion der Zellen. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die extrazelluläre Domäne des

EphB6-Rezeptors zur verstärkten Adhäsion und Migration als Antwort auf geringe EphrinB2-Konzentrationen führt. Im Gegensatz dazu war die zytoplasmatische Domäne und deren Aktivierung durch andere Tyrosin-Kinasen essentiell für die durch hohe EphrinB2-Konzentrationen ausgelöste Repulsion und verminderte Migration der Zellen [137]. EphB6 scheint also, hauptsächlich nach der Aktivierung durch EphrinB2, Einfluss auf das Adhäsionsverhalten von Zellen zu nehmen. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass sich die Adhäsion der EphB6-transfizierten A375-Melanomzellen an Fibronectin unter Monokulturbedingungen nicht von der der anderen Zellen unterschied.

Während in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss von EphrinB2 auf die Adhäsion der Melanomzellen an Fibronectin beobachtet wurde, ergaben In-vitro-Experimente mit EphrinB2-überexprimierenden, murinen B16-Melanomzellen eine signifikant erhöhte, β 1-Integrin-vermittelte Adhäsion an die ECM-Proteine Fibronectin und Laminin. Diese wurde durch die Stimulation mit rekombinanten EphB4-Fc weiter verstärkt. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Adhäsion von Melanomzellen an Fibronectin auf EphrinB2-nachgeschaltete Signalwege zurückzuführen ist [83], während EphB4-nachgeschaltete Signalwege, ebenfalls β 1-Integrin-vermittelt, zu einer verminderten Adhäsion an das ECM-Protein Fibronectin führten [136]. Die Transfektion der B16-Zellen mit EphrinB2 ging mit einer veränderten Zellmorphologie einher, die durch Lamellipodien und Stressfasern gekennzeichnet war. Dies lässt auf Veränderungen im Zytoskelett schließen [83]. Derartige Veränderungen der Zellmorphologie wurden bei den für die vorliegende Arbeit generierten A375-EphrinB2-Zellen nicht beobachtet, was auch die unterschiedliche Reaktion der Zellen im Adhäsionsassay erklären könnte. Der Grund hierfür könnten Zelllinien-spezifische Unterschiede, beispielsweise in der Koexpression weiterer Eph-Rezeptoren oder Ephrine, sein.

Einfluss der Kokultur mit HL-60(M) auf die Adhäsion von EphB4-, EphB6- bzw. EphrinB2-überexprimierenden Melanomzellen

Bezogen auf die Adhäsion unter Monokulturbedingungen führte die Kokultur mit HL-60(M) bei allen transfizierten Zellen analog zu den nicht-transfizierten A375-Melanomzellen zu einer signifikant verminderten Adhäsion an Fibronectin (siehe 3.5.3). Dabei wurden jedoch keine Unterschiede zwischen den transfizierten Zellen beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Adhäsion der A375-Melanomzellen an Fibronectin auch unter Kokulturbedingungen nicht maßgeblich von der EphB4-, EphB6- und EphrinB2-Proteinbiosynthese beeinflusst wurde.

Stattdessen wäre es denkbar, dass der Zell-Zell-Kontakt zwischen HL-60(M)-Zellen und Melanomzellen zur vermehrten Sekretion löslicher Faktoren geführt hatte, die wiederum die Adhäsion der Melanomzellen beeinflussten. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Melanomzellen ein 12 kDa-Protein sezernieren, das deren Adhäsion an Fibronektin inhibiert und daher als Melanom-inhibitorische Aktivität (MIA) bezeichnet wurde. Makrophagen wiederum fördern bei Melanomzellen die Sekretion von MIA und könnten somit eine verminderte Adhäsion Letzterer bewirken [138].

Bedeutung der Migration bei der Melanomprogression

Die Migration stellt einen weiteren kritischen Schritt bei der Metastasierung von Tumorzellen dar [139]. Durch das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen könnten Rückschlüsse auf molekulare Komponenten gezogen und daraus mögliche Therapieansätze abgeleitet werden. Auf diese Weise könnte die Kontrolle der Tumorzellmotilität möglicherweise zur Verbesserung der Tumorthherapie beitragen.

Einfluss der Kokultur mit HL-60(M) auf die Migration von Melanomzellen

Die Migrationsfähigkeit der A375-Zellen blieb sowohl infolge der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen als auch infolge einer chemotaktischen Wirkung der HL-60(M) unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten Mel-Juso- und A2058-Zellen nach der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen eine signifikant verminderte Migration (siehe 3.3.2.2). Die Migration der A2058-Melanomzellen war ebenfalls signifikant vermindert, wenn sich HL-60(M) als chemotaktischer Stimulus im unteren Kompartiment der Kavität befanden. Dies spricht dafür, dass der Effekt bei den A2058-Zellen, die aus einer Hirnmetastase isoliert wurden, durch lösliche Faktoren bedingt war, während bei den Mel-Juso-Zellen direkte Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle gespielt hatten.

Bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit lagen keine Veröffentlichungen vor, in denen die Migration von Melanomzellen nach der Kokultur mit inflammatorischen Zellen beschrieben wurde.

Die Arbeitsgruppe um Liotta hatte jedoch gezeigt, dass A2058-Melanomzellen sensitiv für den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) sind. Dieser wird unter anderem durch Makrophagen sezerniert und löste in A2058-Zellen eine verstärkte Migration aus [140]. Darüber hinaus wurde die Motilität von A2058-Zellen auch durch den autokrinen Motilitätsfaktor (AMF) stimuliert [141]. Möglicherweise hatten die HL-60(M) über einen löslichen Faktor die Sekretion des AMF vermindert und infolgedessen die Migration der A2058-Zellen inhibiert. Da die verminderte Migration der Mel-Juso-Melanomzellen hingegen durch Membran-assoziierte Faktoren ausgelöst worden sein musste, lässt sich vermuten, dass die

Migration von Melanomzellen aus Tumoren des frühen Stadiums (Primärtumor) und des späten Stadiums (metastasierendes Melanom) über unterschiedliche Mechanismen reguliert wird.

Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf die Migration von Melanomzellen

Die Überexpression von EphB4 führte zu einer signifikant erhöhten Migration der A375-Melanomzellen im Boyden-Kammer-Assay, während die EphrinB2-transfizierten Zellen unter den gewählten Versuchsbedingungen tendenziell am langsamsten migrierten (siehe 3.5.2.1).

Im Gegensatz zum Boyden-Kammer-Assay migrierten die mit EphB4 transfizierten A375-Zellen im Wundheilungsassay jedoch signifikant langsamer als die A375-pIRES-Zellen (siehe 3.5.2.2). Trotz einer Reduktion der FKS-Konzentration im Zellkulturmedium auf 5% wird das Verhalten der Zellen im Wundheilungsassay neben der Migration auch von deren Proliferation beeinflusst. Da die A375-EphB4-Zellen unter den transfizierten Zellen tendenziell am stärksten proliferierten (siehe 3.4.4), gleichzeitig nach 24 h jedoch die größte Kratzerbreite aufwiesen, schien die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese der Zellen deren Motilität deutlich zu vermindern. Dies würde eine Reduktion des Metastasierungspotentials nahelegen.

Auch Noren und Kollegen beobachteten einen inhibitorischen Einfluss von EphB4 auf die Motilität von Tumorzellen. Dementsprechend verstärkte die *small interfering RNA* (siRNA)-vermittelte Herunterregulierung von EphB4 in MDA-MB-435-Melanom- und MCF-7-Brustkrebszellen deren Migration auf einer mit Fibronectin beschichteten Oberfläche [136, 142]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beobachtete die Arbeitsgruppe um Hérault bei A375-Melanomzellen mit einer erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese, dass diese im Wundheilungsassay signifikant schneller migrierten. Da auch die Migration von sEphB4-transfizierten A375-Melanomzellen erhöht war und sich die Migration beider Zelllinien nicht durch die Stimulation mit EphrinB2-Fc verstärken lies, schien der Effekt durch die EphB4-vermittelte Aktivierung von EphrinB2 und EphrinB2-nachgeschalteten Signalwege bedingt zu sein [70].

Unter den gewählten Versuchsbedingungen war der Kratzer im Wundheilungsassay bei den EphB6- und EphrinB2-transfizierten A375-Zellen nach 24 h schmaler als bei den A375-pIRES-Zellen, was auf eine erhöhte Migration der Zellen infolge der Überexpression von EphB6 und EphrinB2 hinweist.

Die insbesondere bei den A375-EphB4-Zellen beobachteten Unterschiede zwischen dem Migrationsverhalten im Boyden-Kammer- und im Wundheilungsassay lassen sich möglicherweise damit erklären, dass sich die Zellen bei Letzterem in einem intakten

Zellverband befinden [99], in dem es zu ausgeprägten Zell-Zell-Interaktionen und somit beispielsweise zur Interaktion von EphB4 und EphrinB2 kommen kann. In diesem Zusammenhang wären die Signalwege, die zur EphB4-induzierten Regulation der zellulären Migration geführt hatten, von Interesse. Eine Untersuchung mit EphB1-überexprimierenden Zellen, in denen eine EphrinB2-induzierte Stimulation der Adhäsion und Migration von Zellen beobachtet wurde, hatte ergeben, dass die Beeinflussung der Migration, nicht aber der Adhäsion, durch ERK1/2 und c-Src vermittelt wurde [143]. Da auch EphB4 und EphB6 über entsprechende Src-Kinase-Bindungsmotive in ihrer Proteinsequenz verfügen (EphB4: Y₅₉₀IDP und Y₅₉₆EDP, EphB6: Y₆₃₀IDP und Y₆₃₆EDP) [144, 145], könnten ERK1/2 und c-Src auch an den Effekten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet wurden, beteiligt gewesen sein. Dies könnte mit Hilfe geeigneter Antikörper für ERK1/2 und c-Src und deren Phosphorylierungsformen näher charakterisiert werden.

Einfluss der Kokultur mit HL-60(M) auf die Migration von EphB4-, EphB6- bzw. EphrinB2-überexprimierenden Melanomzellen

Die Kokultivierung mit HL-60(M) führte nur bei den A375-EphB4- und A375-EphrinB2-Zellen zu einer signifikant verminderten Migration (siehe 3.5.3). Bei den pIRES2-AcGFP1- und EphB6-transfizierten A375-Zellen hingegen kam es sowohl infolge der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen als auch infolge des HL-60(M)-konditionierten Mediums zu einer tendenziell verstärkten Migration der Melanomzellen. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Expression von EphB4 und EphB6 die Melanomzellen zu einer gegensätzlichen Regulation ihres Migrationsverhaltens infolge der Kokultur mit HL-60(M) befähigt. Diese Effekte wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher charakterisiert.

Einfluss der Kokultur mit HL-60(M) auf die IL-6-Sekretion von Melanomzellen

IL-6 ist eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine. Es wird durch eine Reihe von Zellen sezerniert, die auch für die Melanomentstehung und -progression von Bedeutung sind, so z.B. durch Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, T- und B-Lymphozyten sowie durch Monozyten und Makrophagen [146]. Keratinozyten z.B. sezernieren vermehrt IL-6, wenn sie UV-Licht ausgesetzt sind und tragen somit zur Proliferation und malignen Transformation von Melanozyten bei [20]. Auch Melanomzellen, insbesondere bei fortgeschrittenen Melanomen, sezernieren IL-6 und nehmen dadurch wiederum Einfluss auf Zellen des Tumorstromas [22, 146, 147].

Die Kokultivierung von HL-60(M)-Zellen mit A375- bzw. A2058-Melanomzellen, nicht jedoch mit Mel-Juso-Melanomzellen, führte zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-

Sekretion (siehe 3.3.3). Interessanterweise schien das sezernierte IL-6 nicht vorrangig von den HL-60(M)-Zellen zu stammen, da die Kultivierung dieser Zellen in A375- bzw. A2058-konditioniertem Zellkulturmedium zu einem vergleichsweise geringen Anstieg der IL-6-Sekretion führte. Vielmehr schien ein von den HL-60(M)-Zellen sezernierter Faktor zur IL-6-Sekretion durch die A375- und A2058-Melanomzellen geführt zu haben. Da die Inkubation mit zwei EphB4-Kinase-Inhibitoren (Verbindung 1 und 2) keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion unter Kokulturbedingungen hatte (siehe 3.3.3), war eine Beteiligung von EphB4-nachgeschalteten Signalwegen unwahrscheinlich.

Einfluss der Kokultur mit HL-60(M) auf die IL-6-Sekretion von EphB4-, EphB6- bzw. EphrinB2-überexprimierenden Melanomzellen

In den Kokultivierungsexperimenten hatte sich gezeigt, dass insbesondere die Migration der EphB4- und EphrinB2-überexprimierenden A375-Melanomzellen auch von Faktoren im Überstand der HL-60(M)-Zellen beeinflusst wurde. Aufgrund dessen erfolgte die Untersuchung der IL-6-Sekretion der transfizierten A375-Zellen unter vergleichbaren Versuchsbedingungen zu den nicht-transfizierten Melanomzellen.

Die Überexpression von EphB4, EphB6 und EphrinB2 in den A375-Melanomzellen hatte keinen Einfluss auf die IL-6-Sekretion (siehe 3.6). In der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen kam es bei allen transfizierten Zellen, analog zu den nicht-transfizierten A375-Zellen, zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Sekretion. Im Gegensatz zu den nicht-transfizierten A375-Zellen gab es jedoch keinen Unterschied zwischen der IL-6-Sekretion in der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen und in der Kultur der Melanomzellen mit HL-60(M)-konditioniertem Medium. Dies deutet darauf hin, dass der Effekt gänzlich auf einen Faktor zurückzuführen war, der von den HL-60(M)-Zellen sezerniert wurde und die Melanomzellen zur IL-6-Sekretion stimuliert hatte.

Im Gegensatz dazu fanden Tat und Kollegen Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Eph- bzw. Ephrin-Expression und der IL-6-Sekretion, allerdings bei humanen Chondrozyten und Osteoblasten. Sie beobachteten, dass die Aktivierung von EphB4 durch EphrinB2 zu einer verminderten IL-6-mRNA-Expression führt [148, 149]. Es wird angenommen, dass sich IL-6 während der malignen Transformation von Melanozyten von einem parakrin wirkenden Wachstumsinhibitor zu einem autokrin wirkenden Wachstumsstimulator entwickelt [146]. Grundlage für diese Hypothese waren die Arbeiten von Kerbel und Kollegen, die festgestellt hatten, dass die Kokultivierung mit Fibroblasten bzw. die Kultivierung in Fibroblasten-konditioniertem Medium zur Wachstumsinhibierung von Melanozyten und nicht-metastasierenden Melanomzellen führt, während metastatische Melanomzellen in ihrem Wachstum gefördert werden [150]. In weiterführenden Untersuchungen wurde IL-6 als der

verantwortliche, lösliche Faktor identifiziert, der einen G1/G0-Arrest der nicht-metastasierenden Melanomzellen bewirkt [146, 151]. In primären Melanomen mit einer Dicke von circa 1 mm kam es zur verstärkten Proteinbiosynthese des IL-6-Rezeptors. Aufgrund dessen wirkte IL-6 in diesen Tumorzellen als autokriner Wachstumsfaktor und machte sie zunehmend unabhängig von äußeren Wachstumsfaktoren. Aufgrund der Korrelation zwischen der IL-6-Sekretion und der Malignität der Tumorzellen könnte IL-6 als prognostischer Marker für die Melanomprogression dienen [147].

Angesichts dieser Erkenntnisse und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich vermuten, dass die durch HL-60(M)-Zellen verstärkte IL-6-Sekretion eher zu einer Wachstumsstimulation der A375- und A2058-Melanomzellen und somit zu einer protumorigenen Wirkung führen könnte. Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse von Fontaine und Kollegen, die bei einer IL-6-Konzentration von 1 ng/ml im Zellkulturmedium eine um 80% verminderte Proliferation von A375-Zellen beobachtet hatten [152]. Aufgrund dessen können die Konsequenzen der erhöhten IL-6-Sekretion, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, ohne weiterführende Untersuchungen nur schwer abgeschätzt werden.

Da erste Experimente mit EphB4-Kinase-Inhibitoren keinen Zusammenhang zwischen der HL-60(M)-induzierten IL-6-Sekretion und dem Eph-Ephrin-System ergaben, wurden diese Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter vertieft. Dennoch handelt es sich beim IL-6 um einen sehr interessanten und wichtigen Einflussfaktor auf die Melanomprogression.

Abgeleitet aus den vorgestellten Ergebnissen, lässt sich zusammenfassend zu Kapitel 4.3 sagen, dass die Überexpression von EphB6 und EphrinB2 unter den gewählten Versuchsbedingungen einen geringen bis keinen Einfluss auf Metastasierungs-relevante Eigenschaften der A375-Melanomzellen hatte. Nur die erhöhte Proteinbiosynthese von EphB4 schien einen gewissen Effekt zu haben, denn die verstärkte Adhäsion an das ECM-Protein Fibronectin sowie die langsamere Migration der EphB4-transfizierten A375-Melanomzellen deuten auf ein vermindertes Invasions- und Metastasierungspotential dieser Zellen hin. Darüber hinaus kam es in der Kokultur mit HL-60(M) zu einer verstärkten IL-6-Sekretion, vorrangig durch die Melanomzellen, die eine vielfältige, bisher nicht bewertbare Einflussnahme auf das Tumorstroma ermöglicht.

4.4 Einfluss von EphB4 auf das Wachstum und die Vaskularisierung von A375-Tumoren *in vivo*

Da EphB4 insbesondere an der Angiogenese, aber auch an der Tumorangiogenese beteiligt ist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein murines Tumor-Xenograft-Modell mit subkutanen A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren etabliert. Dazu wurden A375-pIRES- bzw. A375-EphB4-Zellen subkutan in den linken bzw. rechten Oberschenkel von NMRI (*nu/nu*)-Mäusen injiziert, so dass sich an den entsprechenden Stellen innerhalb von circa drei Wochen Tumoren mit einem Volumen von etwa 300 mm³ entwickelten. Dieses Tumor-Xenograft-Modell ermöglicht die Untersuchung des Einflusses von EphB4 auf das Tumorstadium und die Tumorangiogenese sowie die Testung EphB4-spezifischer Radiotracer.

Einfluss von EphB4 auf das Tumorstadium

Während die EphB4-überexprimierenden A375-Zellen im Vergleich zu den A375-pIRES-Zellen *in vitro* stärker proliferierten, wuchsen die entsprechenden Tumoren *in vivo* tendenziell langsamer (siehe 3.4.4 und 3.7.1).

Im Gegensatz dazu fand die Arbeitsgruppe um Augustin in der zwei- und dreidimensionalen Zellkultur keinen Einfluss von EphB4 bzw. sEphB4 auf das Proliferationsverhalten von A375-Zellen [70]. Letzteres bestätigt die Hypothese, dass Eph-Rezeptoren und Ephrine, im Gegensatz zu anderen RTK, nicht vorrangig Einfluss auf die Zellproliferation nehmen [92]. Vielmehr kontrollieren sie die Bewegung von Zellen und sind für die Angiogenese, insbesondere während der Embryonalphase, von essentieller Bedeutung [153, 154]. Speziell das Rezeptor-Ligand-Paar EphB4-EphrinB2 ermöglicht eine Differenzierung von arteriellen und venösen Gefäßen und somit die Ausbildung eines adäquaten Blutgefäßsystems [154, 155].

Die therapeutische Inhibierung des EphB4-EphrinB2-Signalweges mit Hilfe von Albumin-fusioniertem sEphB4 führte zu kleineren und schwächer perfundierten Gefäßen [156]. Somit wurde bestätigt, dass die Interaktion von EphB4 mit seinem Liganden EphrinB2 auch für die Tumorangiogenese von Bedeutung ist. Noren und Kollegen zeigten, dass EphB4 das Wachstum von MDA-MB-435-Tumoren fördert, indem es EphrinB2-vermittelt eine verstärkte Tumorangiogenese bewirkt. Als zugrunde liegender Mechanismus wurde die vermehrte Rekrutierung und Stimulation EphrinB2-exprimierender Endothelzellen infolge der Synthese des EphB4-Rezeptors bei Tumorzellen diskutiert [157].

Einfluss von EphB4 auf die Tumorperfusion

Im Gegensatz zu den durch Noren und Kollegen publizierten Ergebnissen [157], ergab sowohl die Auswertung der [¹⁸F]FDG- als auch der H33342-Verteilung im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine verminderte Perfusion der A375-EphB4-Tumoren im Vergleich zu den A375-pIRES-Tumoren (siehe 3.7.3 und 3.7.4). Die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese schien also im verwendeten A375-Tumor-Xenograft-Modell zu einer schlechteren Vaskularisierung und Perfusion und infolgedessen zu tendenziell kleineren Tumoren geführt zu haben. Diese Ergebnisse deuten auf eine antitumorigene Wirkung von EphB4 beim Melanom hin.

Sowohl die Überexpression eines vollständigen EphB4-Rezeptors im Rahmen der vorliegenden Arbeit als auch die Überexpression von sEphB4 durch die Arbeitsgruppe um Martiny-Baron [62] hatte, im Vergleich zu den jeweiligen A375-Kontroll-Tumoren, zu tendenziell kleineren Tumoren mit einer verminderten Gefäßdichte geführt. Daher liegt es nahe, dass die beobachteten Effekte von der EphB4-nachgeschalteten Signaltransduktion selbst unabhängig waren und stattdessen auf eine Aktivierung von EphrinB2 und assoziierten Signalwegen zurückzuführen sind. Durch den Einsatz von EphrinB2-Fc oder sEphB4 könnte dies in weiterführenden Experimenten verifiziert werden.

Kertesz und Kollegen zeigten mit Hilfe eines murinen MCF-7 (Mammakarzinom)- und SCC-15 (Plattenepithelkarzinom des Mund-Rachen-Bereichs)-Xenograft-Modells, dass es neben dem Melanom auch in anderen Tumorentitäten zur sEphB4-induzierten Inhibierung des Tumorwachstums kommt. Darüber hinaus stellten sie fest, dass die Vaskularisierung der sEphB4-behandelten Tumoren stark vermindert war und die Tumoren große nekrotische Areale aufwiesen [159]. Im Gegensatz dazu fördert die Überexpression von EphB4 in einer Reihe von anderen Tumorentitäten, wie z.B. bei Tumoren der Brust, des Kolons und der Blase, das Überleben von Tumorzellen durch eine verminderte Apoptose und durch eine Stimulation der Tumorangio-genese [158].

Einfluss von EphB4 auf die Tumovaskularisierung

Um zu prüfen, ob die Perfusionsunterschiede zwischen den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren durch Unterschiede in der Menge Endothelzell- ausgekleideter Blutgefäße bedingt war, wurde die Proteinbiosynthese des Endothelzellmarkers CD31 bei den Tumoren untersucht. In zwei unabhängigen Experimenten waren jedoch keine Unterschiede zwischen den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren zu erkennen. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese in den A375-EphB4-Tumoren keinen Einfluss auf die Anzahl intratumoraler Blutgefäße hatte, die mit CD31-exprimierenden Endothelzellen ausgekleidete waren. Dieser

Befund sollte jedoch mit Hilfe immunhistologischer Färbetechniken verifiziert werden, da diese neben der Quantifizierung der CD31-positiven Blutgefäße auch eine Aussage über die Größe und Verteilung der Blutgefäße ermöglichen.

Tumoren sind in der Regel durch ein unregelmäßig verzweigtes Blutgefäßsystem ohne klare venöse und arterielle Unterteilung charakterisiert. Die Blutgefäße sind chaotisch angeordnet, verlaufen stark gewunden und enden oft blind, so dass die Blutversorgung in den verschiedenen Tumorarealen temporär sehr variabel ist und es sogar zum Erliegen oder zur Umkehr des Blutflusses kommt [160]. Die Gefäßwand von Tumorblutgefäßen kann aus Endothel- und/oder Tumorzellen bestehen [161]. Darüber hinaus sind die Gefäße größtenteils nicht von perivaskulären Zellen umgeben. Aufgrund von ungewöhnlich großen Lücken zwischen den Endothelzellen und einer veränderten Basalmembran ist das Gefäßsystem außerdem durch eine erhöhte Permeabilität gekennzeichnet [160].

Tumorperfusion durch vasculogenic mimicry

Da die Perfusions-Unterschiede zwischen den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren höchstwahrscheinlich nicht auf eine unterschiedliche Vaskularisierung mit Endothelzell-ausgekleideten Blutgefäßen zurückzuführen sind, stellt sich die Frage nach alternativen Möglichkeiten der Tumorperfusion.

Insbesondere bei aggressiven, metastasierenden Melanomen zeigte sich, dass die Tumoren von einem Netz aus ECM durchzogen sind, in denen sich Erythrozytenhaltige, Blutgefäß-artige Strukturen befinden, die jedoch keine Endothelzellschicht aufweisen. Vielmehr waren die aggressiven Melanomzellen, im Gegensatz zu weniger aggressiven Melanomzellen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage, zu pluripotenten, embryonalartigen Zellen zu dedifferenzieren und selbst Blutgefäß-artige Strukturen auszubilden. Dieses Phänomen bezeichnet man als *vasculogenic mimicry* [162-165]. Die vermehrte Phosphorylierung von Tyrosinkinasen, insbesondere von EphA2, in derartigen Gefäßen deutet auf einen Zusammenhang zwischen dem Eph-Ephrin-System und der *vasculogenic mimicry* hin [166].

Auch im vorliegenden Tumor-Xenograft-Modell waren Areale aus A375-pIRES- bzw. A375-EphB4-Melanomzellen von Bindegewebe flankiert, in dem Erythrozytenenthaltende Blutgefäße beobachtet wurden. Mit Hilfe immunhistologischer Färbetechniken konnten in diesen Bindegewebssträngen auch CD31-positive Gefäße nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). Ob die Perfusion der A375-pIRES/EphB4-Tumoren allein durch diese echten Blutgefäße sichergestellt wird oder ob das Phänomen der *vasculogenic mimicry* auch im vorliegenden Tumor-

Xenograft-Modell eine Rolle für die Tumorperfusion spielt, müsste im Rahmen weiterführender Untersuchungen geklärt werden.

Tumorlymphangiogenese

Neben den Blutgefäßen stellen die Lymphgefäße eines Tumors potentielle Wege der Metastasierung dar. In primären Melanomen erwies sich das Ausmaß der Lymphangiogenese sogar als ein stärkerer Risikofaktor für das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen als die Tumordicke und ging mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit der Patienten einher [27]. Darüber hinaus zeigte die Arbeitsgruppe um Rinderknecht, dass sich Tumorzellen, noch bevor sie selbst metastasieren, durch die Ausschüttung von VEGF-C in nahe gelegenen Lymphknoten ein geeignetes Mikromillieu schaffen, um dort ihr Überleben nach erfolgreicher Invasion und Extravasation zu erleichtern [28]. Aufgrund dessen wäre im Rahmen weiterführender Experimente die Quantifizierung intratumoraler Lymphgefäße interessant. Dies könnte beispielsweise durch den immunhistologischen Nachweis des Lymphgefäßmarkers LYVE-1 erfolgen.

4.5 Kinaseinhibitoren als potentielle Radiotracer für die In-vivo-Bildgebung von Eph-Rezeptoren

Obwohl immer mehr Untersuchungen zeigen, dass Eph-Rezeptoren, wie z.B. EphB4 oder auch EphA2, in einer Vielzahl von Tumoren verstärkt exprimiert werden und in die Tumorprogression, Tumorangio-genese und Metastasierung involviert sind, wurde das Potential dieser RTK als Zielmoleküle für die In-vivo-Bildgebung erst kürzlich erkannt. Derzeit existieren nur Veröffentlichungen von zwei weiteren Arbeitsgruppen, die sich ebenfalls mit der Entwicklung Eph-gerichteter Radiotracer beschäftigen [167-169]. Durch die nicht-invasive, semi-quantitative Darstellung der Eph-Proteinbiosynthese in Tumoren erhofft man sich die Auswahl von Patienten, beispielsweise für eine Eph-gerichtete, personalisierte Tumorthherapie. Gleichzeitig könnte die nicht-invasive Bildgebung der Eph-Rezeptoren mittels PET zur Therapie-Beobachtung genutzt werden, wie dies mit Hilfe des [¹⁸F]FDG-PET schon seit längerem für konventionelle Tumorthapien erfolgt [167, 168, 170]. Darüber hinaus könnten solche PET-Tracer als Basis für die Entwicklung entsprechender Radiotherapeutika dienen.

Unter Verwendung eines monoklonalen EphA2-Antikörpers, der mit dem ⁶⁴Cu-komplexierenden Chelator 1,4,7,10-Tetraazacyclododekan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA) funktionalisiert ist, fanden Cai und Kollegen im Jahr 2007 erstmalig eine

Korrelation zwischen der EphA2-Proteinbiosynthese und der Anreicherung des Radiotracers im PET bei verschiedenen murinen Tumor-Xenograft-Modellen [167].

Im Jahr 2011 veröffentlichte die Arbeitsgruppe um Li eine nicht-invasive Darstellung der EphB4-Proteinbiosynthese mittels PET bzw. SPECT in murinen Tumor-Xenograft-Modellen. Dazu wurde das ^{64}Cu -DOTA-markierte EphB4-spezifische, mimetische Peptid TNYLFSPNGPIARAW (im Folgenden kurz als TNYL-RAW bezeichnet) bzw. ^{111}In -markierte TNYL-RAW-Nanopartikel verwendet [54, 168]. Die ausführlichere Diskussion der damit erlangten Ergebnisse erfolgt in diesem Kapitel. Neben den bereits genannten Antikörpern und mimetischen Peptiden werden weitere Ansätze zur Bildgebung und therapeutischen Manipulation von Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden verfolgt.

Im Allgemeinen lassen sich die Eph- bzw. Ephrin-Theragnostika aufgrund ihrer Wirkweise in zwei Gruppen unterteilen.

- Zum einen gibt es die Gruppe der extrazellulär wirkenden Theragnostika, zu denen neben den Antikörpern und mimetischen Peptiden auch Partikel-fusionierte oder lösliche Eph-Rezeptoren oder Ephrine gehören [171].
- Zum anderen kommen intrazellulär wirkende Kinaseinhibitoren mit variierender Substratselektivität für diagnostische und therapeutische Zwecke zum Einsatz.

Intrazellulär wirkende EphB4-Theragnostika

Die Verwendung von Kinaseinhibitoren für die In-vivo-Bildgebung von Eph-Rezeptoren beruht auf der Affinität Ersterer zur ATP-Bindungstasche, beispielsweise des EphB4-Rezeptors, und bedarf einer Membranpassage der Substanzen [172]. Niedermolekulare Radiotracer verteilen sich sehr schnell im Blutkreislauf, lösen im Gegensatz zu Antikörpern keine Immunreaktion aus und werden nach ihrer Metabolisierung schließlich renal oder hepatobiliär ausgeschieden. Somit ist die Strahlenbelastung des Patienten gewöhnlich gering. Allerdings müssen die Kinaseinhibitoren in der Lage sein, Zellmembranen zu durchdringen, um ihre intrazellulär lokalisierte Zielstruktur, beispielsweise die Kinasedomäne von Eph-Rezeptoren, zu erreichen.

Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit gab es keine Veröffentlichungen, die sich niedermolekulare Verbindungen zur Bildgebung von EphB4 mittels PET zu Nutze machten. Allerdings wurden im Hinblick auf therapeutische Ansätze in den letzten Jahren vermehrt Verbindungen vorgestellt, auf deren Basis Radiotracer entwickelt werden könnten. Die Herausforderung hierbei besteht allerdings in der starken Konservierung der ATP-Bindungstasche innerhalb der mindestens 518

Kinasen des menschlichen Kinoms. Aufgrund dessen verfügen die meisten bisher bekannten Verbindungen über keine ausreichende Substratselektivität [173].

Beispielsweise beschrieben Miyazaki und Kollegen im Jahr 2007 ein 4-Amino-5-arylfuro[3,2-c]pyrimidin, das neben EphB4 auch den VEGFR2 sowie den Angiopoetin-Rezeptor Tie2 im nanomolaren Bereich ($IC_{50} = 0,4; 4,2$ bzw. 17 nM) inhibierte (**Abbildung 4-1 (A)**) [174]. In den darauf folgenden Jahren wurde durch die Arbeitsgruppe um Lafleur ein Xanthin-Derivate dargestellt, das eine hohe Affinität für die ATP-Bindungstasche fast aller Eph-Rezeptoren sowie einer Reihe von *abelson murine leukemia viral oncogene homolog* (Abl)- und Src-Kinasen sowie der *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase* (Lck) aufwies (**Abbildung 4-1 (B)**) [172, 175]. Eine durch Mitchell und Kollegen im Jahr 2009 vorgestellte Verbindung (**Abbildung 4-1 (C)**) inhibierte neben EphB4 auch die Angiogenese-relevanten RTK EphA2, VEGFR2, VEGFR3 und Tie2.

Eine derartige Kombinationswirkung erwies sich für den Erfolg einer antiangiogenen Therapie als vorteilhaft [176]. Im Hinblick auf eine selektive Bildgebung von EphB4 ist sie jedoch kritisch zu bewerten, da sie keine klare Abgrenzung von Tumoren mit einer erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese von Tumoren mit einer erhöhten Proteinbiosynthese der anderen Kinasen, für welche die Verbindung ebenfalls selektiv ist, erlaubt. Wenn eine Tumorentität allerdings mehrere Kinasen gleichzeitig in erhöhtem Maße synthetisiert und das Ziel der Bildgebung nicht die alleinige Darstellung von EphB4 ist, könnten sich aufgrund des stärkeren Signals im Tumor auch weniger selektive Verbindungen als günstig erweisen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die In-vivo-Bildgebung von Tumoren mit einer erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese. Aufgrund dessen wurde ein neuer, potentieller EphB4-Kinaseinhibitor (Verbindung **2**) charakterisiert, der sich von einem durch Bardelle und Kollegen beschriebenen EphB4-Kinaseinhibitor (Verbindung **1**, **Abbildung 4-1 (D)**) [104]) ableitet. Unter Nutzung eines Derivats von Verbindung **1** wurde für Markierungszwecke Verbindung **2** entwickelt. Letztere war durch eine 2,4-bis-Anilinopyrimidin-Struktur charakterisiert und konnte mit dem Positronen-emittierenden Radionuklid ^{18}F markiert werden. Die dabei entstehende Verbindung [^{18}F]**2** (**Abbildung 4-1 (E)**) ist für die Bildgebung mittels PET geeignet [105]. Im Rahmen der Untersuchungen durch Bardelle und Kollegen ergab Verbindung **1** in einem Kinaseassay mit EphB4-überexprimierenden CHO-K1-Zellen einen IC_{50} -Wert von 190 ± 70 nM. Unter Verwendung der intrazellulären Domäne von rekombinant hergestelltem EphB4 konnte ein IC_{50} -Wert von 90 ± 50 nM ermittelt werden. Mit

Ausnahme von EphB2 und Src verfügte Verbindung **1** über eine hinreichend hohe Selektivität gegenüber anderen Kinasen [104].

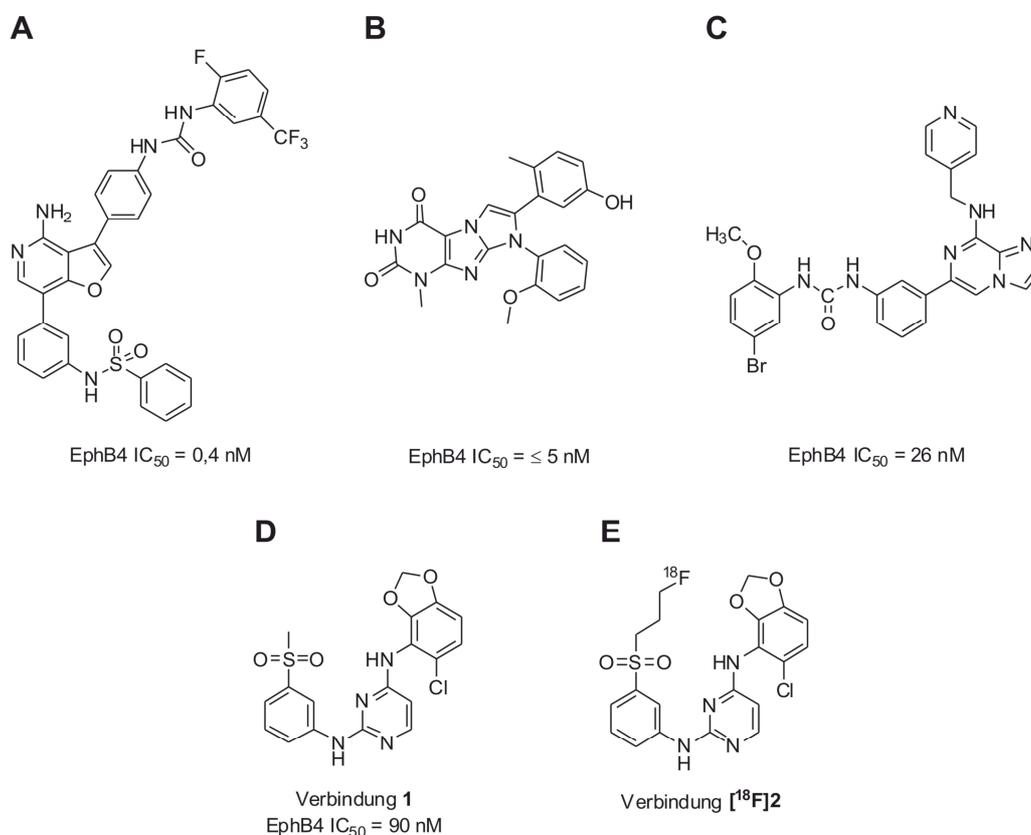


Abbildung 4-1: Struktur und IC₅₀-Werte ausgewählter EphB4-Kinaseinhibitoren [104, 172, 174-176]

Zytotoxische und EphB4-Kinase-inhibitorische Wirkung von Verbindung **2**

In Vorbereitung der Tierexperimente wurde Verbindung **2** zunächst *in vitro* auf seine zytotoxische und EphB4-Kinase-inhibitorische Wirkung getestet. Verbindung **1** diente dabei als Vergleichssubstanz.

Ab einer Konzentration von 10 µM führten beide Verbindungen zu einer signifikanten Reduktion der zellulären Vitalität sowie zu morphologischen Veränderungen der Zellen (siehe 3.8.1). Trotz einer einmaligen Applikation verstärkte sich der zytotoxische Effekt bei beiden Verbindungen mit fortschreitender Inkubationszeit, was auf eine zunehmende intrazelluläre Akkumulation des Wirkstoffes oder auf eine langsame Wirkung hindeutet. Im Hinblick auf Tumorzellen ist die Zytotoxizität der Verbindungen positiv zu bewerten.

Da sowohl Verbindung **1** als auch Verbindung **2** bereits ab einer Konzentration von 0,1 µM eine signifikant verminderte EphB4-Phosphorylierung und damit -Aktivierung

bewirkten (siehe 3.8.2), kann davon ausgegangen werden, dass die für die ^{18}F -Radiomarkierung nötigen, strukturellen Veränderungen in Verbindung **2** keinen Einfluss auf deren Kinase-inhibitorische Wirkung hatten. Im Gegensatz dazu wurde die Proteinbiosynthese von EphB4 selbst, den Erwartungen entsprechend, durch keine der beiden Verbindungen beeinflusst. Folglich stellt Verbindung **2** sowohl einen wirksamen EphB4-Kinaseinhibitor als auch, nach der Radiomarkierung mit ^{18}F , einen potentiellen PET-Tracer dar.

Wie von Bardelle und Kollegen gezeigt, verfügt Verbindung **1** über eine vergleichbare Selektivität gegenüber EphB4, EphB2 und der Src-Kinase [104]. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass auch Verbindung **2** nicht ausschließlich an EphB4 bindet. Eigene Untersuchungen ergaben jedoch, dass die verwendeten A375-Zellen kein EphB2 synthetisieren und dass sowohl Verbindung **1** als auch Verbindung **2** nur eine sehr schwache Inhibierung der Src-Phosphorylierung bewirken [105]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachteten Effektivität vorrangig auf eine EphB4-inhibitorische Wirkung zurückzuführen sind. Nichts desto trotz sollte die Selektivität von Verbindung **2** in weiterführenden Untersuchungen überprüft werden.

Aufnahme und Bindung von Verbindung [^{18}F]2 durch Melanomzellen

Als nächstes wurde überprüft, ob Verbindung [^{18}F]2 *in vitro* von humanen Melanomzellen aufgenommen wird und ob es bei den A375-Melanomzellen mit einer erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese zu einer verstärkten Anreicherung des Radiotracers kommt.

In Abhängigkeit der Zeit kam es bei den A375-, A375-pIRES- und A375-EphB4-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Bindung und/oder Aufnahme von [^{18}F]2 (siehe 3.8.3). Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den nicht-transfizierten und den mock-transfizierten A375-Zellen sowie den A375-Zellen mit der erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese.

Im Gegensatz dazu beobachtete die Arbeitsgruppe um Li sowohl mit dem ^{64}Cu -markierten DOTA-TNYL-RAW als auch mit den ^{111}In -markierten TNYL-RAW-Nanopartikeln eine Abhängigkeit der zellulären Radiotracer-Aufnahme von der EphB4-Proteinbiosynthese [69, 168].

Daher muss davon ausgegangen werden, dass es unter den gewählten Versuchsbedingungen zu keiner selektiven Bindung von Verbindung [^{18}F]2 an den EphB4-Rezeptor gekommen war. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Interaktion des Radiotracers mit anderen Proteinen, wie z.B. der Src-Kinase, sein. Andererseits könnte auch der Transport durch die Zellmembran und nicht die Bindung an die

EphB4-Kinasedomäne die Geschwindigkeit und die maximale Anreicherung des Radiotracers in den Zellen bestimmt haben.

Grundsätzlich wurde die zelluläre Aufnahme der EphB4-Kinaseinhibitoren, allerdings in einem Zeitraum von 24 h, auch durch den pEphB4-ELISA bestätigt (siehe 3.8.2). Die 24-stündige Inkubation mit Verbindung **1** und **2** führte zu einer signifikant verminderten Phosphorylierung der intrazellulären EphB4-Kinasedomäne, was eine Internalisierung der Verbindungen voraussetzt. Gewissheit über die Internalisierung und gegebenenfalls über die intrazelluläre Lokalisation der EphB4-Kinaseinhibitoren in den A375-Melanomzellen könnte eine konfokalmikroskopische Analyse der Zellen nach der Inkubation mit Fluoreszenz-markierter Verbindung **1** und **2** geben.

Um Hinweise über mögliche Aufnahmemechanismen zu erlangen, wurde die Bindung und/oder Aufnahme von [^{18}F]**2** nach 60 min in Anwesenheit spezifischer Inhibitoren untersucht.

Hemmung mit Verbindung 1 und 2

Aufgrund ihrer ähnlichen bzw. gleichen chemischen Struktur sollten Verbindung **1** und **2** zu einer kompetitiven Inhibierung der Bindung und/oder Aufnahme von [^{18}F]**2** führen. Beide Verbindungen bewirkten in allen drei untersuchten Zelllinien eine signifikante Inhibierung der [^{18}F]**2**-Aufnahme, die jedoch bei Verbindung **2** signifikant stärker war als bei Verbindung **1** (siehe 3.8.3). Die Daten legen nahe, dass Verbindung [^{18}F]**2** durch spezifische Aufnahmemechanismen internalisiert wurde und eine unspezifische Membranbindung nicht maßgeblich beteiligt war, denn diese hätte nicht so stark inhibiert werden können.

Das unterschiedliche Ausmaß der Hemmwirkung von Verbindung **1** und **2** deutet darauf hin, dass die beiden Verbindungen nicht ausschließlich die gleichen Transportmechanismen nutzten. Alternativ könnte sich die finale Konzentration der nicht-radioaktiven Verbindungen **1** und **2** unterscheiden haben, da beide sehr lipophil waren (mit ChemDraw berechneter dekadischer Logarithmus des n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P) von Verbindung **1** bzw. **2**: 4,01 bzw. 5,42). Aufgrund dessen wurde die für die Inhibierungsversuche angestrebte Konzentration von 100 μM im Zellkulturmedium nicht erreicht und es ist davon auszugehen, dass für beide Verbindungen eine gesättigte Lösung mit unbekannter Konzentration vorlag. Die durch Bardelle und Kollegen beschriebene Löslichkeit von Verbindung **1** in einer wässrigen Lösung mit pH 7,4 lag bei 30 μM [104]. Da Verbindung **1** jedoch etwas hydrophiler ist als Verbindung **2**, wäre zu erwarten, dass deren Löslichkeit im Zellkulturmedium etwas höher ist und somit die geringere Inhibitorwirkung nicht auf eine geringere

InhibitorKonzentration zurückzuführen war. Es lag also nahe, dass für Verbindung **[¹⁸F]2** ein zusätzlicher Transportmechanismus zur Verfügung stand, der von Verbindung **1** nicht inhibiert wurde.

Hemmung mit Verapamil und Cyclosporin

Kleine Moleküle wie Verbindung **[¹⁸F]2** sind potentielle Substrate für membranständige Phosphoglykoproteine der ABC-Transporter-Superfamilie, die häufig zu einer Chemotherapie-assoziierten Zytostatika-Resistenz (*multidrug resistance* (MDR)) führen. Diese MDR-Proteine transportieren eine Reihe von chemisch sehr unterschiedlichen Verbindungen entgegen eines bestehenden Konzentrationsgradienten und unter Verbrauch von ATP aktiv aus Zellen heraus. Somit verhindern sie die intrazelluläre Akkumulation, beispielsweise von chemotherapeutischen Wirkstoffen, wodurch die Tumorzellen vor deren toxischer Wirkung geschützt werden. Eines der klinisch relevantesten MDR-Proteine ist das P-Glykoprotein (Pgp), das auch als MDR1-Protein bezeichnet wird.

Das Pgp-Substratspektrum umfasst neutrale und kationische, amphiphile, organische Verbindungen [106]. Somit ist Verbindung **[¹⁸F]2**, die in wässriger Lösung höchstwahrscheinlich neutral vorliegt und schwach amphiphil ist, auch ein potentielles Substrat des Pgp.

Aus der klinischen Relevanz der MDR heraus kam es zur Entwicklung von Substanzen, die zur kompetitiven Inhibierung des Pgp und anderer MDR-Transporter führen und somit die Exkretion der Chemotherapeutika verhindern [106]. Verapamil und Cyclosporin A gehören zur ersten Generation derartiger Verbindungen. In der onkologischen Klinik wurden sie jedoch durch besser wirksame, selektivere und weniger toxische Verbindungen ersetzt [106, 107, 177, 178]. Verapamil inhibiert darüber hinaus spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle des L-Typs und verhindert damit den Transport von Ca²⁺ ins Zytosol [177, 179].

Da die klassische Funktion der MDR-Proteine im Transport von Substanzen aus der Zelle heraus besteht, wäre zu erwarten gewesen, dass die Inkubation mit Verapamil und Cyclosporin A zu einer erhöhten zellulären Anreicherung von **[¹⁸F]2** führt. Im Gegensatz dazu bewirkte sowohl Verapamil als auch Cyclosporin A eine signifikant geringere **[¹⁸F]2**-Aufnahme bei den A375-, A375-pIRES- und A375-EphB4-Zellen (siehe 3.8.3). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Pgp auch an der Aufnahme von **[¹⁸F]2** beteiligt war oder aber, dass die A375-Melanomzellen kein Pgp exprimierten und der Effekt durch die Inhibierung anderer, beispielsweise Ca²⁺-abhängiger, Transportmechanismen bedingt war. Zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit lagen keine Berichte über die Expression des Pgp durch A375-Melanomzellen

vor. Verschiedene Untersuchungen hatten jedoch ergeben, dass weniger als 10% der primären Melanome und der Melanom-Metastasen Pgp synthetisieren [180, 181]. Andererseits kann eine Beteiligung von ABC-Transportern an der Internalisierung von Verbindung [^{18}F]2 nicht ausgeschlossen werden, da Melanomzellen eine ganze Reihe solcher Proteine synthetisieren [182].

Hemmung mit Natriumazid

Durch die inhibitorische Wirkung von Natriumazid in allen drei Zelllinien wurde die ATP-Abhängigkeit der [^{18}F]2-Aufnahme bestätigt (siehe 3.8.3). Das Azid-Ion blockiert die Sauerstoffbindungsstelle des aktiven Zentrums der Cytochrom-c-Oxidase und führt somit zum Erliegen der ATP-Produktion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der neue EphB4-Kinaseinhibitor, der gleichzeitig ein potentieller Radiotracer für die Bildgebung von EphB4 mittels PET ist, zwar über einen ATP-abhängigen Transportmechanismus aktiv in Melanomzellen aufgenommen wurde, es dort aber, möglicherweise aufgrund einer limitierten Transportgeschwindigkeit, zu keiner selektiven Akkumulation in Zellen mit einer erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese kam. Eine exakte Identifizierung der zugrunde liegenden Transportmechanismen wäre interessant, war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Tumoranreicherung und In-vivo-Metabolismus von Verbindung [^{18}F]2 im A375-pIRES/EphB4-Tumor-Xenograft-Modell

Im Anschluss an die Zellexperimente wurde Verbindung [^{18}F]2 *in vivo* hinsichtlich seiner Tumoranreicherung, Bioverteilung und Metabolisierung charakterisiert. Mit Hilfe der PET, der Autoradiographie und der Bioverteilung konnte nur eine sehr geringe Anreicherung des ^{18}F -markierten EphB4-Kinaseinhibitors in den subkutanen A375-Tumoren beobachtet werden (siehe 3.8.4). Die Anreicherung war zudem unabhängig von der EphB4-Proteinbiosynthese in den Tumoren. Stattdessen kam es zu einer raschen Anreicherung des Radiotracers in der Leber, der Gallenblase, dem Darm und zu einem kleineren Teil auch in der Blase. Somit verdeutlichen die Ergebnisse der PET, dass Verbindung [^{18}F]2, wahrscheinlich aufgrund seiner hohen Lipophilie, kurz nach der Injektion vorrangig hepatobiliär ausgeschieden wurde. Aufgrund dessen zirkulierte bereits nach kurzer Zeit nur noch wenig Radiotracer im Blut und stand damit zur Anreicherung im Tumor zur Verfügung.

Dennoch war Verbindung [^{18}F]2 im Blut weitestgehend metabolisch stabil, da nach 120 min noch 85% der Aktivität im Blut dem intakten Radiotracer zugeordnet werden

konnten. Im Darminhalt hingegen wurden drei radioaktive Metaboliten von Verbindung **[¹⁸F]2** nachgewiesen, die auf eine Metabolisierung des Radiotracers in der Leber hindeuten. Die nähere Charakterisierung der Metaboliten war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Da keine nennenswerte Aktivität in den Knochen gefunden wurde, kann eine Defluorierung des Radiotracers ausgeschlossen werden.

Verbindung **1**, welche die Leitstruktur für Verbindung **[¹⁸F]2** darstellt, zeigte in den Untersuchungen durch Bardelle und Kollegen eine geringfügig bessere Affinität zu den Kinasedomänen von EphB2 und Src (IC₅₀-Werte: 50 bzw. ≤100 nM) als zu der von EphB4 (IC₅₀-Wert: 190 ± 70 nM). Dies ist wahrscheinlich durch die hohe Sequenzhomologie von EphB2 (85%) bzw. Src (44%) zu EphB4 bedingt [104, 183, 184]. Eine Erklärung dafür, dass es in den A375-EphB4-Tumoren zu keiner spezifischen Anreicherung gekommen war, könnte sein, dass EphB2 und Src in den A375-pIRES- und A375-EphB4-Tumoren in vergleichbarem oder gar stärkerem Ausmaß als EphB4 synthetisiert wurden und somit zur quantitativen Bindung des Radiotracers geführt hatten. In diesem Zusammenhang ergaben eigene Untersuchungen, dass die A375-EphB4-Melanomzellen zwar hinreichend viel Src, jedoch kein EphB2 synthetisieren [105].

Eine weitere, wenn auch wenig wahrscheinliche Erklärung für die vergleichbare Akkumulation von Verbindung **[¹⁸F]2** in den A375-pIRES- und den A375-EphB4-Tumoren könnte die hohe intrazelluläre ATP-Konzentration sein. Diese könnte, insbesondere während der relativ kurzen Dauer der PET-Messung von 120 min, die Bindung der Inhibitoren an die ATP-Bindungstasche der RTK aufgrund einer kompetitiven Hemmung verhindert haben [170]. Bei längeren Inkubationszeiten hingegen scheint die intrazelluläre ATP-Konzentration keinen Einfluss zu haben, da beispielsweise mit Hilfe des pEphB4-ELISA gezeigt wurde, dass sowohl Verbindung **1** als auch Verbindung **2** nach 24 h eine signifikante Inhibierung der intrazellulär lokalisierten EphB4-Kinasedomäne bewirkten.

Darüber hinaus stellt die schnelle hepatobiliäre Ausscheidung von Verbindung **[¹⁸F]2** ein zentrales Problem dar, welches der radiopharmazeutischen Anwendung von Verbindung **[¹⁸F]2** im Weg steht. Aufgrund dessen sollten sich zukünftige Untersuchungen mit der chemischen Modifikation von Verbindung **[¹⁸F]2** beschäftigen, mit dem Ziel die Lipophilie und damit die biologische Halbwertszeit des Radiotracers zu verbessern.

Dennoch stellen Tyrosinkinase interessante Zielmoleküle für die nuklearmedizinische Diagnostik dar, was durch eine Vielzahl von Untersuchungen bestätigt wird [170]. Jedoch gelang es, trotz vielfältiger Bemühungen durch eigene und andere

Arbeitsgruppen, bisher nicht, einen Radiotracer auf der Basis von RTK-Inhibitoren zu etablieren, der beispielsweise gegen Angiogenese-relevante RTK oder aber gegen den EGFR gerichtet ist und *in vivo* eine spezifische Anreicherung im Tumorgewebe zeigt [170]. Dies ist sowohl auf Probleme hinsichtlich der radiopharmakologischen Eigenschaften der Radiotracer als auch auf Probleme bezüglich der Rezeptoraffinität und –selektivität der Verbindungen zurückzuführen [170, 185, 186]. Insbesondere die Selektivität von RTK-Inhibitoren scheint ein allgemeines Problem bei der Entwicklung entsprechender Radiotracer darzustellen.

Extrazellulär wirkende EphB4-Theragnostika

Im Gegensatz zu den intrazellulär wirkenden Theragnostika war die Entwicklung, beispielsweise von EGFR-spezifischen Radiotracern auf der Basis von Antikörpern, Affibodies oder Peptiden, die an die extrazelluläre Domäne der RTK binden, deutlich erfolgreicher.

Diese Tendenz ist auch bei EphB4-spezifischen Radiotracern zu beobachten. Während der Nachweis von EphB4 mit Hilfe des ^{18}F -markierten EphB4-Kinaseinhibitors nicht gelang, ermöglichte der Einsatz des ^{64}Cu -markierten EphB4-bindenden Peptides DOTA-TNYL-RAW die spezifische Detektion von Tumoren mit einer erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese mittels PET [168]. TNYL-RAW enthält das FSPN-Bindungsmotiv, das auch in der 15 Aminosäuren umfassenden GH-Schleife des EphrinB2 enthalten ist. Letztere wiederum ist für die Bindung an den EphB4-Rezeptor essentiell. Auf diese Weise ahmt TNYL-RAW die GH-Schleife des EphrinB2 nach und zeigt mit 15 nM eine ähnliche EphB4-Bindungsaffinität wie EphrinB2 (10 nM) [54]. Während ^{64}Cu -markiertes DOTA-TNYL-RAW, das an die extrazelluläre Ligand-Bindungsdomäne des EphB4-Rezeptors bindet, nur mit Hilfe des Blutstroms zu den Zellen gelangen muss, bedarf Verbindung [^{18}F]2 zusätzlich einer Internalisierung durch die Zellen, um mit der intrazellulären Kinasedomäne des EphB4-Rezeptors interagieren zu können.

Die Konjugation des TNYL-RAW-Peptides mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat und der ^{64}Cu -komplexierenden Chelateinheit DOTA ermöglichte die Detektion des Peptides *in vitro* und *in vivo*. Mittels Oberflächenplasmonresonanz wurde nachgewiesen, dass die Markierung des TNYL-RAW-Peptides mit dem ^{64}Cu -DOTA-Komplex zu keiner messbaren Beeinträchtigung der EphB4-Bindungsaffinität führt (K_D TNYL-RAW = 1,98 nM versus K_D ^{64}Cu -DOTA-TNYL-RAW = 3,06 nM). In Abhängigkeit vom Ausmaß der Rezeptorbiosynthese kam es bereits nach ein bis vier Stunden zur Akkumulation von ^{64}Cu -markiertem DOTA-TNYL-RAW im EphB4-exprimierenden PC-3M

(Prostatakarzinom)- und CT26 (Kolonkarzinom)- Tumor-Xenograft-Modell. Das resultierende Tumor-zu-Muskel-Verhältnis lag bei etwa zehn. Im Gegensatz dazu war die Akkumulation von ^{64}Cu -markiertem DOTA-TNYL-RAW im A549 (Lungenadenokarzinom)-Tumor-Xenograft-Modell, das durch eine sehr geringe EphB4-Proteinbiosynthese gekennzeichnet ist, entsprechend niedrig. Allerdings kam es in allen Tumor-Xenograft-Modellen nach 24 h zu einer stärkeren Akkumulation des Radiotracers in der Leber, den Nieren und der Milz als in den Tumoren [168].

Eine deutliche Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften des TNYL-RAW-Peptides wurde durch die Konjugation mit Polyethylenglykol-Nanopartikeln erreicht. Diese waren mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 7 und dem ^{111}In -komplexierenden Chelator Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) funktionalisiert, was die Detektion der Nanopartikel *in vivo* und *in vitro* mittels SPECT und Fluoreszenz-basierten Bildgebungsmethoden ermöglichte.

Alles in allem weisen diese Untersuchungen darauf hin, dass EphB4 als Zielmolekül für die Tumordiagnostik durchaus geeignet ist, vorausgesetzt, der Radiotracer zeigt eine günstige Verweilzeit im Blut und eine entsprechend affine und selektive Bindung an den EphB4-Rezeptor.

4.6 Entwicklung löslicher Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden als Grundlage für die In-vivo-Bildgebung des Eph-Ephrin-Systems

Als Alternative zu den radiomarkierten RTK-Inhibitoren könnte die In-vivo-Bildgebung des Eph-Ephrin-Systems mit Hilfe löslicher Eph-Rezeptoren (sEph) und Ephrine (sEphrin) erfolgen. Diese interagieren mit der extrazellulären Ligand- bzw. Rezeptor-Bindungsdomäne eines entsprechenden Bindungspartners.

Im Gegensatz zu anderen RTK-Liganden wirken Ephrine nicht wie üblich in löslicher Form. Stattdessen müssen sie Membran-gebunden oder in Form eines Fusionsproteins mit dem Fc-Fragment von humanem IgG1 vorliegen, um Rezeptoren aktivieren zu können. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass es nur in gebundener Form zur Dimerisierung und/oder Multimerisierung und damit zur Aktivierung der Rezeptoren kommt [187]. Aufgrund dessen ermöglichen lösliche Eph-Rezeptoren bzw. Ephrine eine Inhibierung der Rezeptor-Ligand-Interaktion, wohingegen lösliche Eph-Rezeptoren bzw. Ephrine nach der Fusionierung, beispielsweise mit dem Fc-Fragment von Antikörpern, zur Rezeptor- bzw. Ligandaktivierung führen.

Bennet und Kollegen zeigten, dass auch der Überstand von EphrinB2-transfizierten COS-7-Zellen, insbesondere nach Stimulation der Zellen mit TNF- α , eine Phosphorylierung von EphB4 bewirkt. Das Ausmaß der Phosphorylierung war zwar gering, aber diese Ergebnisse geben Hinweise auf die Sekretion einer löslichen, wirksamen Form des EphrinB2 [91].

Insbesondere EphB4 und EphrinB2 werden beim Melanom mit fortschreitender Tumorprogression vermehrt synthetisiert. Darüber hinaus werden sie bei der Interaktion von Tumorzellen mit Zellen des Tumorstromas, beispielsweise an der invasiven Front eines Tumors, verstärkt aktiviert [82, 83]. Die lösliche Form des entsprechenden Bindungspartners, d.h. sEphrinB2 bzw. sEphB4, könnte nach der Radiomarkierung, beispielsweise mit ^{18}F , die Bildgebung von EphB4 bzw. EphrinB2 mittels PET ermöglichen. Darüber hinaus stellen Letztere interessante Zielmoleküle für therapeutische Interventionen dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, die extrazelluläre Domäne des EphB4- (Leu₁₆ – Gln₅₃₇) und EphB6-Rezeptors (Leu₁₇ – Arg₅₇₇) in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2B zu klonieren und somit die löslichen, mit einem His₆-Tag-ausgestatteten Rezeptoren sEphB4 und sEphB6 mit Hilfe von COS-7-Zellen rekombinant zu gewinnen. Um eine Aktivierung von EphrinB2 zu vermeiden, wurde bewusst auf die Nutzung von kommerziell erhältlichem, Fc-fusioniertem sEphB4 bzw. sEphB6 verzichtet und stattdessen die Gewinnung und Reinigung von löslichem sEphB4 und sEphB6 etabliert. Im SDS-Gel wurden sEphB4 und sEphB6 trotz ihrer Molmasse von etwa 60 kDa vergleichbar mit 70 kDa-Proteinen aufgetrennt, was auf eine Glykosylierung der rekombinanten Proteine hinweist. Dies konnte bereits durch Kertesz und Kollegen bestätigt werden [159]. Durch die Verwendung eines eukaryotischen Expressionssystems wurde eine adäquate posttranslationale Modifikation der Proteine und somit eine wichtige Voraussetzung für deren Funktionalität gewährleistet. Durch den Einsatz des Glykosylierungsinhibitors Tunikamyzin [188] oder mit Hilfe von spezifischen Endo- oder Exoglykosidasen sowie der Glykoprotein-spezifischen Färbemethode nach Emerald Green [189] könnte die Glykosylierung der rekombinanten Proteine sEphB4 und sEphB6 verifiziert und näher charakterisiert werden.

Die rekombinanten Proteine wurden unter milden, nativen Bedingungen mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie effizient aus dem Zellkulturüberstand der transfizierten COS-7-Zellen gereinigt und von im Elutionspuffer enthaltenen Salzen sowie Imidazol mittels FPLC oder Ultrafiltration getrennt. Da insbesondere EphB4 (Bindungsaffinität 40 nM), aber auch EphB6, EphrinB2 mit relativ hoher Affinität bindet, stellen die

löslichen Rezeptoren sEphB4 und sEphB6 nach der Radiomarkierung potentielle Radiotracer zur Bildgebung von EphrinB2 *in vivo* dar. EphrinB2 wiederum korreliert beim Melanom mit dessen Progression und Invasivität und könnte somit als prognostischer Marker dienen [82, 83].

Eine Radiomarkierung von sEphB4 und sEphB6 könnte mittels Succinimidyl-4- ^{18}F fluorbenzoat (^{18}F SFB) und 4- ^{18}F Fluorbenzaldehyd-O-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihydropyrrol-1-yl)-hexyl)oxim (^{18}F FBAM) erfolgen, wobei z.B. im Protein enthaltende Lysin- bzw. Cystein-Reste markiert werden [190].

In Vorbereitung der In-vivo-Experimente müsste jedoch zunächst die Bindung von sEphB4 und sEphB6 an EphrinB2 verifiziert werden. Derartige Bindungsassays könnten unter Verwendung von kommerziell erhältlichem, rekombinantem EphrinB2 oder EphrinB2-überexprimierenden A375-Zellen mit Hilfe von MaxiSorpTM-Platten oder Oberflächenplasmonresonanz erfolgen. Im Anschluss daran könnten die ^{18}F -radiomarkierten Rezeptoren sEphB4 und sEphB6 zur In-vivo-Bildgebung mittels PET genutzt werden. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, analog zu dem A375-EphB4-Tumor-Xenograft-Modell, ein transgenes Tiermodell mit subkutanen A375-EphrinB2-Tumoren zu etablieren.

Da keine spezifische Anreicherung des ^{18}F -markierten EphB4-Kinaseinhibitors in Tumoren mit einer erhöhten EphB4-Proteinbiosynthese erreicht wurde, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit rekombinantes sEphrinB2 gewonnen werden, um dieses anschließend mit einem geeigneten Radionuklid, beispielsweise mit ^{18}F , zu markieren. Da sowohl EphB4 als auch EphB6 spezifische Rezeptoren für EphrinB2 darstellen, könnte ^{18}F -markiertes sEphrinB2 bei entsprechend guter Pharmakokinetik die Bildgebung dieser beiden Proteine *in vivo* ermöglichen. Trotz intensiver Versuche gelang es jedoch nicht, sEphrinB2 in der zur Verfügung stehenden Zeit in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2B zu klonieren. Daher sollten sich weiterführende Experimente mit der Klonierung, Gewinnung und Reinigung von sEphrinB2 beschäftigen, um einen alternativen Radiotracer zum ^{18}F -markierten EphB4-Kinaseinhibitor zu erhalten.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf die Metastasierung des malignen Melanoms, insbesondere in Gegenwart Tumor-assoziiertes inflammatorischer Zellen, untersucht.

Zunächst wurde gezeigt, dass EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei den ausgewählten humanen Melanomzellen und den inflammatorischen Zellen exprimiert werden und somit potentielle Interaktionsmöglichkeiten dieser Zellen darstellen. Die Expression aller drei Gene unterlag bei der Differenzierung der HL-60- und THP-1-Leukämiezellen zu HL-60(M), HL-60(G) und THP-1(M) einer zum Teil starken Regulation und könnte somit als Differenzierungsmarker für diese Zellen dienen. Die verwendeten HL-60(M), HL-60(G) und THP-1(M) dienen als Modell für Tumor-assoziierte inflammatorische Zellen.

Die Kokultivierung von Melanomzellen und Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen beeinflusste, in Abhängigkeit von der verwendeten Melanomzelllinie, sowohl die Adhäsion als auch die Migration der Melanomzellen sowie die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6. Um den Einfluss von EphB4, EphB6 und EphrinB2 auf die metastatischen Eigenschaften der A375-Melanomzellen untersuchen zu können, wurden diese mit den entsprechenden Vektoren transfiziert, was in einer erhöhten mRNA-Expression und Proteinbiosynthese des jeweiligen Eph-Rezeptors bzw. Ephrins resultierte.

Die erhöhte Proteinbiosynthese von EphB4 führte zu einer verstärkten Adhäsion der A375-Zellen an das ECM-Protein Fibronectin und zu einer verminderten Migration der Zellen im Wundheilungsassay. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese die Metastasierung der Melanomzellen beeinträchtigt.

In weiterführenden Experimenten könnte der Einfluss der Kokultur mit HL-60(M) auf das Verhalten der Melanomzellen im Wundheilungsassay untersucht werden. Um potentiell migrierende HL-60(M)-Zellen von den zu untersuchenden Melanomzellen unterscheiden zu können, sollten Letztere zuvor, beispielsweise mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein-AM, markiert werden. In dem sich anschließenden Wundheilungsassay wäre es nun möglich, speziell die Migration der Calcein-AM-gefärbten Melanomzellen unter Kokulturbedingungen zu untersuchen. Gleichmaßen wäre eine Kokultur mit Endothelzellen oder anderen Zellen des Tumorstromas denkbar. Hierfür bietet der Wundheilungsassay, im Gegensatz zum Boyden-Kammer-Assay, wiederum geeignetere Bedingungen, da es in der gemischten Zellpopulation zu

ausgeprägten Zell-Zell-Interaktionen oder, sofern vorhanden, zu Zell-Matrix-Interaktionen kommen kann.

Da insbesondere dem Rezeptor-Ligand-Paar EphB4-EphrinB2 eine regulative Beteiligung bei der Transmigration von Monozyten [84], aber auch bei der Metastasierung von Tumorzellen [70] zugesprochen wird, sollten weiterführende Experimente außerdem die Adhäsion bzw. Migration von EphB4-, EphB6- und EphrinB2-überexprimierenden A375-Melanomzellen an bzw. durch Endothelzellen untersuchen. Eine verstärkte Adhäsion an Endothelzellen könnte die Extravasation und somit die Metastasierung der Melanomzellen begünstigen.

Eine regulative Beteiligung von EphB6 an den EphB4-induzierten Effekten könnte mit Hilfe von EphB4/EphB6-kotransfizierten Zellen im Vergleich zu normal transfizierten Zellen untersucht werden. Alternativ könnte EphB6 in einen induzierbaren Expressionsvektor, wie z.B. den pTet-On-Vektor (Clontech), kloniert werden, was die Induktion der EphB6-Proteinbiosynthese durch die Zugabe von Doxycyclin ermöglicht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, ein murines Xenograft-Modell mit subkutanen A375-pIRES- bzw. A375-EphB4-Tumoren zu etablieren. Dieses ermöglicht neben der Untersuchung des Einflusses von EphB4 auf die Tumorprogression und Tumorangiogenese beim malignen Melanom auch die Testung EphB4-spezifischer Radiotracer. Mit Hilfe dieses Modells wurde gezeigt, dass die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese zu tendenziell kleineren Tumoren führte, die signifikant schwächer perfundiert waren. Somit zeigte EphB4 neben seiner antimetastatischen Wirkung *in vitro* auch eine antitumorogene Wirkung *in vivo*.

Fortführende Experimente könnten sich mit der Entwicklung analoger Tiermodelle, beispielsweise mit EphB6- oder EphrinB2-überexprimierenden Tumoren, beschäftigen, um auch deren Einfluss auf das Wachstum und die Perfusion maligner Melanome zu untersuchen. Um hingegen den Einfluss von EphB4 oder EphrinB2 auf die Metastasierung der Melanomzellen näher charakterisieren zu können, müssten geeignetere Tiermodelle etabliert werden. Beispielsweise könnten die EphB4- oder EphrinB2-überexprimierenden A375-Melanomzellen arteriell injiziert werden, um das Extravasationsverhalten in geeigneten Zielorganen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wäre der Einfluss von Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen auf die Metastasierung der Melanomzellen von besonderem Interesse, da Erstere *in vitro* einen deutlichen Einfluss auf die metastatischen Eigenschaften der Melanomzellen hatten.

Des Weiteren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neuer EphB4-spezifischer Radiotracer charakterisiert. Obwohl dieser die Phosphorylierung von EphB4 signifikant inhibierte, kam es aufgrund der hohen Lipophilie von Verbindung [^{18}F]2 und der damit einhergehenden schnellen hepatobiliären Exkretion sowie der wahrscheinlich unzureichenden Selektivität nur zu einer marginalen Anreicherung des Radiotracers in den subkutanen A375-Tumoren, die darüber hinaus unabhängig von der EphB4-Proteinbiosynthese in den Tumoren war. Deswegen sollten sich zukünftige Arbeiten mit der Entwicklung neuer Radiotracer zur Bildgebung des Eph-Ephrin-Systems mittels PET auseinandersetzen. Die Herausforderung bei der Entwicklung von Radiotracern auf der Basis von RTK-Inhibitoren besteht allerdings in der Darstellung von Verbindungen mit einer hinreichend großen Substrataffinität und vor allem Substratselektivität, da die ATP-Bindungstasche innerhalb des menschlichen Kinoms stark konserviert ist.

Um dieses Problem zu umgehen, könnten alternativ Radiotracer entwickelt werden, die gegen die extrazelluläre Domäne der Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden gerichtet sind. Neben Antikörpern und mimetischen Peptiden könnten dies auch lösliche Eph-Rezeptoren (sEph) und Ephrine (sEphrin) sein. Leider war es in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht möglich, die löslichen RTK sEphB4 und sEphB6, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert wurden, im Hinblick auf ihre Eignung als Radiotracer für die In-vivo-Bildgebung zu untersuchen. Dies sollte unter Verwendung eines A375-EphrinB2-Tumor-Xenograft-Modells erfolgen. Zuvor sollten allerdings die Affinitäten von sEphB4 und sEphB6 zu ihrem Liganden EphrinB2 *in vitro* verifiziert werden. Dies könnte mit Hilfe eines Bindungsassays auf der Basis von rekombinantem EphrinB2 oder mit EphrinB2-überexprimierenden A375-Melanomzellen geschehen.

Darüber hinaus wäre es wichtig die Umklonierung von sEphrinB2 in den eukaryotischen Expressionsvektor pSecTag2B voranzutreiben, so dass auch sEphrinB2 rekombinant gewonnen und gereinigt werden kann. Da insbesondere EphB4, aber auch EphB6 selektive Rezeptoren für EphrinB2 darstellen, sollte ^{18}F -markiertes sEphrinB2 bei entsprechend guter Pharmakokinetik die Bildgebung dieser beiden Proteine *in vivo* ermöglichen und somit, zumindest im Hinblick auf die Bildgebung von EphB4, eine Alternative zum ^{18}F -markierten EphB4-Kinaseinhibitor darstellen.

6 Zusammenfassung

Aufgrund der frühen Metastasierung und der Resistenz gegenüber den bisher bekannten Therapieansätzen stellt das maligne Melanom eine der aggressivsten Tumorentitäten dar. Allerdings handelt es sich beim Melanom um einen antigenen und immunogenen Tumor. Dies schürt die Hoffnung, dass durch das bessere Verständnis der Mechanismen, die der Metastasierung, aber auch der Dysregulation des Immunsystems zugrunde liegen, Rückschlüsse auf neue Therapieansätze, beispielsweise unter Einbeziehung der Immunabwehr, gezogen werden können. Darüber hinaus würde die Entwicklung von Radiotracer, die eine frühzeitige Diagnose und möglicherweise auch die Auswahl von Patienten für eine personalisierte Tumorthherapie ermöglichen, die Heilungschancen beim malignen Melanom wesentlich verbessern. Das Eph-Ephrin-System wiederum stellt ein vielfältiges Zellkommunikations-System dar, das in eine Reihe von lebenswichtigen, aber auch pathologischen Prozessen involviert ist. Beispielsweise regulieren Eph-Rezeptoren und Ephrine die gerichtete Bewegung von neuronalen, endothelialen und inflammatorischen Zellen, aber auch von Tumorzellen.

Angesichts dessen wurde die Hypothese formuliert, dass die Eph-Ephrin-vermittelte Interaktion von Melanomzellen und Tumor-assoziierten inflammatorischen Zellen die Progression und Metastasierung des malignen Melanoms beeinflusst. Im Speziellen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob die Rezeptor-Tyrosinkinase EphB4 im Zusammenspiel mit seinem Liganden EphrinB2 die Progression und Metastasierung des malignen Melanoms fördert. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob der Rezeptor EphB6, der ebenfalls zur Bindung von EphrinB2 fähig ist, aber über eine mutierte und damit funktionsunfähige Kinasedomäne verfügt, eine regulative Rolle übernimmt und antitumorigen wirkt. Aufbauend auf den Erkenntnissen zur Bedeutung von EphB4, EphB6 und EphrinB2 beim malignen Melanom sollten verschiedene Ansätze zur Bildgebung der oben genannten Eph-Rezeptoren und Ephrine mittels PET etabliert und geprüft werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass EphB4, EphB6 und EphrinB2 bei den ausgewählten humanen Melanomzellen und den inflammatorischen Zellen exprimiert werden und somit potentielle Interaktionsmöglichkeiten dieser Zellen darstellen. Infolge der Kokultur mit HL-60(M)-Zellen, die als Modell für Tumor-assoziierte Makrophagen dienen, kam es zu einer verminderten Adhäsion und/oder Migration der Melanomzellen sowie im Falle der A375- und A2058-Melanomzellen zu

einer verstärkten Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6. Aufgrund der breiten Wirkung von IL-6 ergeben sich daraus vielfältige Einflussmöglichkeiten auf das Tumormikromilieu. Diese wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher charakterisiert, da erste Ergebnisse eine Beteiligung des EphB4-EphrinB2-Systems ausschlossen. Während die Überexpression von EphB6 keinen Einfluss auf die Metastasierungs-relevanten Eigenschaften der A375-Melanomzellen hatte, führte die erhöhte Expression von EphB4 und EphrinB2 in den A375-Melanomzellen zu den in **Abbildung 6-1** dargestellten Effekten. Die erhöhte Proteinbiosynthese von EphB4 bewirkte eine verstärkte Adhäsion der Zellen an das ECM-Protein Fibronectin und eine verminderte Migration im intakten Zellverband. Somit beeinträchtigte die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese die Metastasierung der A375-Melanomzellen *in vitro*.

Um den Einfluss von EphB4 auf die Tumorprogression und Tumorangiogenese beim malignen Melanom *in vivo* untersuchen zu können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein murines Xenograft-Modell mit subkutanen A375-pIRES- bzw. A375-EphB4-Tumoren etabliert, welches gleichzeitig die Testung EphB4-spezifischer Radiotracer ermöglicht. Anhand der Bestimmung des Tumolvolumens und der [¹⁸F]FDG-, [¹⁸F]FMISO- und Hoechst 33342-Untersuchungen zeigte sich, dass die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese zu tendenziell kleineren Tumoren führte, die signifikant schwächer perfundiert waren und infolgedessen im Inneren größere hypoxische Areale aufwiesen als die A375-pIRES-Tumoren (**Abbildung 6-1**). Somit zeigte EphB4 neben seiner antimetastatischen Wirkung *in vitro* auch eine antitumorogene Wirkung *in vivo*, die möglicherweise auf eine Störung der Gefäßbildung zurückzuführen ist. Da eine adäquate Blutversorgung der Tumoren für die Metastasierung von Tumorzellen von Bedeutung ist, könnte dies auch auf eine antimetastatische Wirkung *in vivo* hinweisen.

Zusammenfassend betrachtet weisen sowohl die In-vitro- als auch die In-vivo-Untersuchungen unter den gewählten Versuchsbedingungen auf einen antimetastatischen und antitumorigenen Effekt von EphB4 hin. Somit wurde die anfänglich formulierte Hypothese, dass EphB4 im Zusammenspiel mit seinem Liganden EphrinB2 die Progression und Metastasierung des malignen Melanoms fördert, widerlegt. Vielmehr wurde mit Hilfe der In-vivo-Experimente gezeigt, dass EphB4 inhibierend auf das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese beim malignen Melanom wirkt. Eine regulative Beteiligung des Kinase-defizienten Rezeptors EphB6, der ebenfalls zur Bindung von EphrinB2 fähig ist, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht sicher nachgewiesen werden.

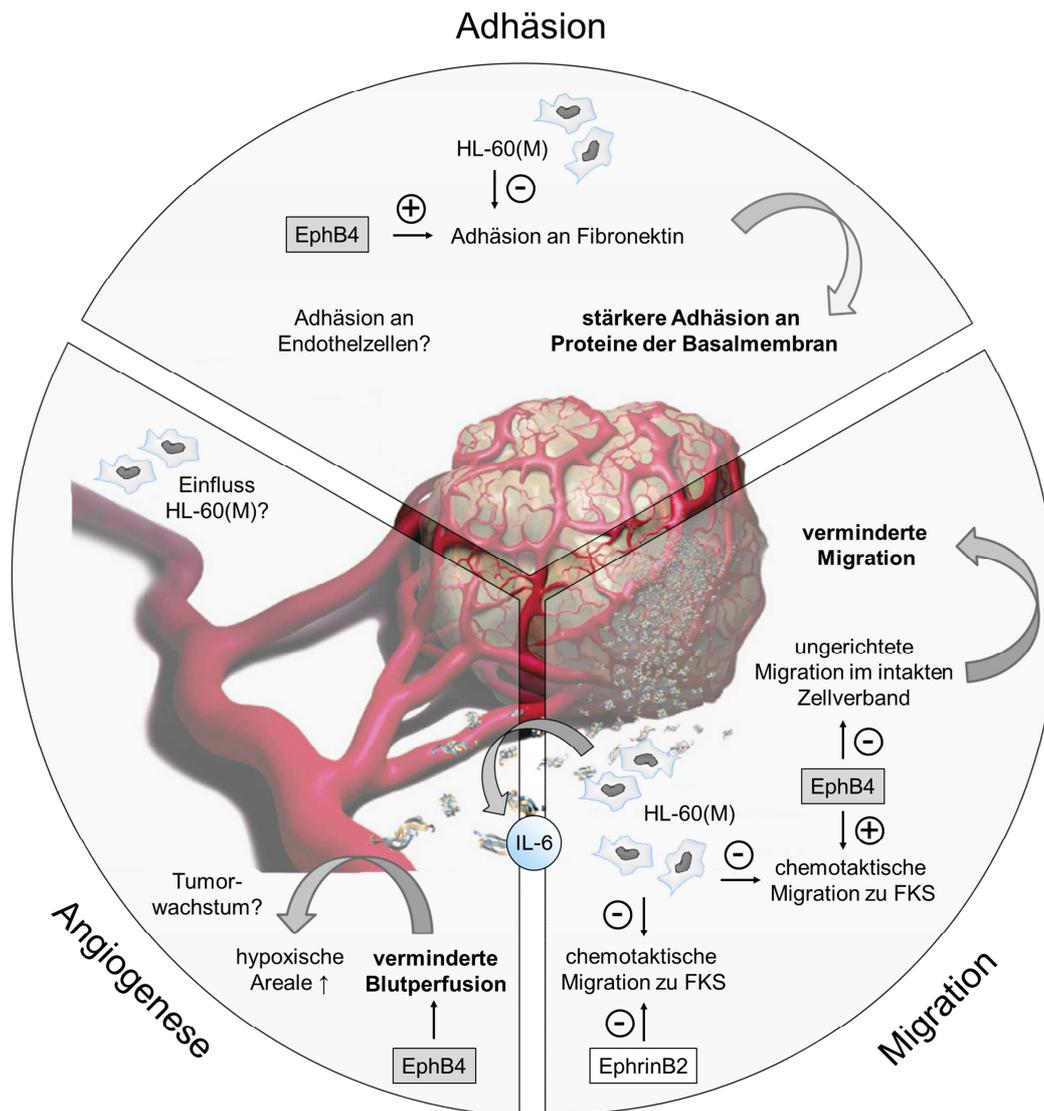


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung der postulierten Einflussmöglichkeiten von EphB4 und EphrinB2 auf die Adhäsion und Migration der Melanomzellen sowie auf die Vaskularisierung der A375-Tumoren Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die erhöhte Proteinbiosynthese von EphB4 eine stärkere Adhäsion der humanen Melanomzelllinie A375 an das ECM-Protein Fibronektin bewirkt. Dies würde in einer stärkeren Verankerung der Zellen mit der Basalmembran und damit in einer verminderten Metastasierung der Zellen resultieren. Die Kokultur mit HL-60(M)-Zellen hingegen bewirkte, unabhängig von der Eph-/Ephrin-Proteinbiosynthese, eine verminderte Adhäsion der Zellen an Fibronektin, wodurch der EphB4-induzierte Effekt außer Kraft gesetzt wird. EphB4 führte außerdem zu einer Verminderung der ungerichteten Migration der A375-Melanomzellen im intakten Zellverband, wobei die chemotaktische Migration der Zellen zu FKS gleichzeitig erhöht war. Ersteres beeinflusst das Metastasierungspotential der Melanomzellen, ebenso wie die stärkere Adhäsion, negativ. HL-60(M) wiederum verstärkten diesen Effekt, indem sie die chemotaktische Migration der Melanomzellen zu FKS beeinträchtigten. Im Gegensatz zu EphB4 führte EphrinB2 zu einer verminderten chemotaktischen Migration der Zellen zu FKS. Dieser Effekt wurde durch die HL-60(M)-Zellen verstärkt. Die Kokultur der Melanomzellen mit HL-60(M) führte darüber hinaus zu einem drastischen Anstieg der IL-6-Sekretion, insbesondere durch die Melanomzellen. IL-6 wiederum kann in vielfältiger Art und Weise Einfluss auf das Tumormikromilieu nehmen und somit zur Tumorprogression beitragen. *In vivo* bewirkte die erhöhte EphB4-Proteinbiosynthese eine verminderte Perfusion der A375-Tumoren, die mit größeren hypoxischen Arealen einherging. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte bisher kein signifikanter Einfluss von EphB4 auf das Tumorwachstum nachgewiesen werden. Eine interessante Fragestellung für weiterführende Untersuchungen wäre daher der Einfluss von HL-60(M)-Zellen auf das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese. Abbildung modifiziert nach http://www.roche.de/pharma/indikation/onkologie/brustkrebs/images/6120_abb1_tumor.jpg (Stand 22.05.2012).

Angesichts der *in vitro* und *in vivo* beobachteten Effekte von EphB4, EphB6 und EphrinB2 stellen insbesondere EphB4 und EphrinB2 potentielle Zielmoleküle für die Bildgebung mittels PET dar. Letzteres könnte der Beurteilung der Prognose für den jeweiligen Patienten dienen oder aber eine Auswahl der Patienten für eine personalisierte Tumorthherapie ermöglichen. Aufgrund dessen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Ansätze zur Bildgebung dieses Rezeptor-Ligand-Paares mittels PET verfolgt.

Die erste Strategie bestand in der Entwicklung eines neuen EphB4-spezifischen Radiotracers (Verbindung [¹⁸F]2) auf der Basis eines bekannten EphB4-Kinaseinhibitors (Verbindung 1), der intrazellulär an EphB4 bindet. Trotz der für die Radiomarkierung mit ¹⁸F nötigen strukturellen Veränderungen der 2,4-*bis*-Anilinopyrimidin-Grundstruktur erwies sich Verbindung 2 *in vitro* als EphB4-Kinaseinhibitor. Darüber hinaus wurde Verbindung 2 durch einen bisher nicht identifizierten, energieabhängigen Transportmechanismus von den A375-Melanomzellen, unabhängig von deren EphB4-Proteinbiosynthese, aufgenommen. *In vivo* reicherte sich die sehr lipophile Verbindung [¹⁸F]2 aufgrund ihrer schnellen hepatobiliären Exkretion und der wahrscheinlich unzureichenden Selektivität nur marginal und unabhängig von der EphB4-Proteinbiosynthese in den subkutanen A375-Tumoren an.

Aufgrund dessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine zweite Strategie zur Bildgebung des Eph-Ephrin-Systems verfolgt. Dazu wurden die löslichen Eph-Rezeptoren sEph4 und sEphB6 rekombinant hergestellt und mit Hilfe verschiedener Chromatographietechniken gereinigt. Beide sind gegen die extrazelluläre Domäne des EphrinB2 gerichtet und müssen daher nicht von den Tumorzellen internalisiert werden, um ihre Zielstruktur zu erreichen. In weiterführenden Untersuchungen sollen die Proteine sEphB4 und sEphB6 nun mit Hilfe von [¹⁸F]SFB oder [¹⁸F]FBAM radiomarkiert und anschließend auf ihre Eignung als Radiotracer zur Detektion von EphrinB2 *in vivo* charakterisiert werden. Die Generierung von sEphrinB2 in analoger Art und Weise könnte die Bildgebung von EphB4 ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Elwood, J. M.; Jopson, J. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *International Journal of Cancer* **73** (1997) 198-203.
- [2] Veierod, M. B.; Weiderpass, E.; Thorn, M.; Hansson, J.; Lund, E.; Armstrong, B.; Adami, H. O. A prospective study of pigmentation, sun exposure, and risk of cutaneous malignant melanoma in women. *Journal of the National Cancer Institute* **95** (2003) 1530-1538.
- [3] Boyle, G. M. Therapy for metastatic melanoma: an overview and update. *Expert Review of Anticancer Therapy* **11** (2011) 725-737.
- [4] Thompson, J. F.; Scolyer, R. A.; Kefford, R. F. Cutaneous melanoma. *Lancet* **365** (2005) 687-701.
- [5] Clark, W. H.; Elder, D. E.; Guerry, D.; Epstein, M. N.; Greene, M. H.; Vanhorn, M. A study of tumor progression - the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology* **15** (1984) 1147-1165.
- [6] Meier, F.; Satyamoorthy, K.; Nesbit, M. Molecular events in melanoma development and progression. *Frontiers in Bioscience* **3** (1998) 1005-10.
- [7] Gray-Schopfer, V.; Wellbrock, C.; Marais, R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* **445** (2007) 851-7.
- [8] Valyi-Nagy, I. T.; Hirka, G.; Jensen, P. J.; Shih, I. M.; Juhasz, I.; Herlyn, M. Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. *Laboratory Investigations* **69** (1993) 152-9.
- [9] Shih, I. M.; Elder, D. E.; Hsu, M. Y.; Herlyn, M. Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes. *American Journal of Pathology* **145** (1994) 837-45.
- [10] Haass, N. K.; Smalley, K. S. M.; Li, L.; Herlyn, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Research* **18** (2005) 150-159.
- [11] Mantovani, A.; Bottazzi, B.; Colotta, F.; Sozzani, S.; Rucio, L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today* **13** (1992) 265-70.
- [12] Bocker, E. B.; Zwadlo, G.; Holzmann, B.; Macher, E.; Sorg, C. Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. *International Journal of Cancer* **41** (1988) 562-567.
- [13] Coussens, L. M.; Werb, Z. Inflammatory cells and cancer: Think different! *Journal of Experimental Medicine* **193** (2001) F23-F26.
- [14] Muller-Hubenthal, B.; Azemar, M.; Lorenzen, D.; Huber, M.; Freudenberg, M. A.; Galanos, C.; Unger, C.; Hildenbrand, B. Tumour biology: tumour-associated inflammation versus antitumor immunity. *Anticancer Research* **29** (2009) 4795-805.

- [15] Kulbe, H.; Thompson, R.; Wilson, J. L.; Robinson, S.; Hagemann, T.; Fatah, R.; Gould, D.; Ayhan, A.; Balkwill, F. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha generates an autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Research* **67** (2007) 585-92.
- [16] Bingle, L.; Brown, N. J.; Lewis, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *Journal of Pathology* **196** (2002) 254-265.
- [17] Hagemann, T.; Wilson, J.; Burke, F.; Kulbe, H.; Li, N. F.; Pluddemann, A.; Charles, K.; Gordon, S.; Balkwill, F. R. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *Journal of Immunology* **176** (2006) 5023-32.
- [18] Duncan, L. M.; Richards, L. A.; Mihm, M. C. Increased mast cell density in invasive melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology* **25** (1998) 11-15.
- [19] Ono, M.; Torisu, H.; Fukushi, J.; Nishie, A.; Kuwano, M. Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **43** (1999) S69-S71.
- [20] Melnikova, V. O.; Bar-Eli, M. Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell and Melanoma Research* **22** (2009) 257-267.
- [21] Ribatti, D.; Ennas, M. G.; Vacca, A.; Ferrelli, F.; Nico, B.; Orru, S.; Sirigu, P. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *European Journal of Clinical Investigation* **33** (2003) 420-425.
- [22] Hussein, M. R. Tumour-associated macrophages and melanoma tumourigenesis: integrating the complexity. *Int J Exp Pathol* **87** (2006) 163-76.
- [23] Leibovici, J.; Hoenig, S. Lysis and growth stimulation of a murine melanoma determined by density of macrophage populations. *Anticancer Research* **5** (1985) 545-51.
- [24] Mantovani, A.; Sozzani, S.; Locati, M.; Allavena, P.; Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* **23** (2002) 549-55.
- [25] Talmadge, J. E. Immune cell infiltration of primary and metastatic lesions: mechanisms and clinical impact. *Seminars in Cancer Biology* **21** (2011) 131-138.
- [26] Torisu, H.; Ono, M.; Kiryu, H.; Furue, M.; Ohmoto, Y.; Nakayama, J.; Nishioka, Y.; Sone, S.; Kuwano, M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF alpha and IL-1 alpha. *International Journal of Cancer* **85** (2000) 182-188.
- [27] Dadras, S. S.; Lange-Asschenfeldt, B.; Velasco, P.; Nguyen, L.; Vora, A.; Muzikansky, A.; Jahnke, K.; Hauschild, A.; Hirakawa, S.; Mihm, M. C.; Detmar, M. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Modern Pathology* **18** (2005) 1232-1242.
- [28] Rinderknecht, M.; Detmar, M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *Journal of Cellular Physiology* **216** (2008) 347-354.
- [29] Hengge, U. R.; Dummer, R. Malignes Melanom: Standards und Innovationen in Diagnostik und Therapie 1. Auflage, 269 Seiten (2006) Deutscher Ärzteverlag, Köln.

- [30] Clemente, C. G.; Mihm, M. C., Jr.; Bufalino, R.; Zurrida, S.; Collini, P.; Cascinelli, N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* **77** (1996) 1303-10.
- [31] Elder, D. E.; VanBelle, P.; Elenitsas, R.; Halpern, A.; Guerry, D. Neoplastic progression and prognosis in melanoma. *Semin Cutan Med Surg* **15** (1996) 336-348.
- [32] Gervois, N.; Guilloux, Y.; Diez, E.; Jotereau, F. Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. *Journal of Experimental Medicine* **183** (1996) 2403-2407.
- [33] Aoudjit, F.; Guo, W.; Gagnon-Houde, J.-V.; Castaigne, J.-G.; Alcaide-Loridan, C.; Charron, D.; Al-Daccak, R. HLA-DR signaling inhibits Fas-mediated apoptosis in A375 melanoma cells. *Experimental Cell Research* **299** (2004) 79-90.
- [34] Taylor, R. C.; Patel, A.; Panageas, K. S.; Busam, K. J.; Brady, M. S. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology* **25** (2007) 869-875.
- [35] Gesundheit - Todesursachen in Deutschland, Fachserie 12(4) (2010) Statistisches Bundesamt.
- [36] Liotta, L. A.; Guirguis, R.; Stracke, M. Biology of melanoma invasion and metastasis. *Pigment Cell Research* **1** (1987) 5-15.
- [37] Fidler, I. J. Timeline - The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer* **3** (2003) 453-458.
- [38] Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen Zulassungs-Presskonferenz „Zelboraf: Durchbruch in der Therapie des malignen Melanoms“, 30. Deutsche Krebskongresses der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG), Berlin (23.02.2012).
- [39] Lee, S. M.; Betticher, D. C.; Thatcher, N. Melanoma: chemotherapy. *Br Med Bull* **51** (1995) 609-30.
- [40] Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* **1** (1889) 571-573.
- [41] Flanagan, J. G.; Gale, N. W.; Hunter, T.; Pasquale, E. B.; TessierLavigne, M. Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. *Cell* **90** (1997) 403-404.
- [42] Pasquale, E. B. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6** (2005) 462-75.
- [43] Nikolov, D. B.; Himanen, J. P.; Saha, N. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Current Opinion in Cell Biology* **19** (2007) 534-542.
- [44] Egea, J.; Klein, R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends in Cell Biology* **17** (2007) 230-8.
- [45] Freywald, A.; Truitt, L. T., L. Dancing with the dead: Eph receptors and their kinase-null partners. *Biochemistry and Cell Biology* **89** (2011) 115-129.
- [46] Smith, F. M.; Vearing, C.; Lackmann, M.; Treutlein, H.; Himanen, J.; Chen, K.; Saul, A.; Nikolov, D.; Boyd, A. W. Dissecting the EphA3/ephrin-A5 interactions using a novel functional mutagenesis screen. *Journal of Biological Chemistry* **279** (2004) 9522-9531.

- [47] Pasquale, E. B. Eph-ephrin promiscuity is now crystal clear. *Nature Neuroscience* **7** (2004) 417-418.
- [48] Pasquale, E. B. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* **133** (2008) 38-52.
- [49] Campbell, T. N.; Robbins, S. M. The Eph receptor/ephrin system: an emerging player in the invasion game. *Current Issues in Molecular Biology* **10** (2008) 61-6.
- [50] Kullander, K.; Klein, R. Mechanisms and functions of EPH and ephrin signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3** (2002) 475-486.
- [51] Himanen, J. P.; Chumley, M. J.; Lackmann, M.; Li, C.; Barton, W. A.; Jeffrey, P. D.; Vearing, C.; Geleick, D.; Feldheim, D. A.; Boyd, A. W.; Henkemeyer, M.; Nikolov, D. B. Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nature Neuroscience* **7** (2004) 501-509.
- [52] Cowan, C. A.; Henkemeyer, M. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature* **413** (2001) 174-179.
- [53] Bennett, B. D.; Wang, Z. Y.; Kuang, W. J.; Wang, A. L.; Groopman, J. E. k.; Goeddel, D. V.; Scadden, D. T. Cloning and characterization of Htk, a novel transmembrane tyrosine kinase of the Eph subfamily. *Journal of Biological Chemistry* **269** (1994) 14211-14218.
- [54] Chrencik, J. E.; Brooun, A.; Recht, M. I.; Kraus, M. L.; Koolpe, M.; Kolatkar, A. R.; Bruce, R. H.; Martiny-Baron, G.; Widmer, H.; Pasquale, E. B.; Kuhn, P. Structure and thermodynamic characterization of the EphB4/ephrin-B2 antagonist peptide complex reveals the determinants for receptor specificity. *Structure* **14** (2006) 321-330.
- [55] Kuhn, P.; Chrencik, J. E.; Brooun, A.; Kraus, M. L.; Recht, M. I.; Kolatkar, A. R.; Han, G. W.; Seifert, J. M.; Widmer, H.; Auer, M. Structural and biophysical characterization of the EphB4-ephrinB2 protein-protein interaction and receptor specificity. *Journal of Biological Chemistry* **281** (2006) 28185-28192.
- [56] Takai, N.; Miyazaki, T.; Fujisawa, K.; Nasu, K.; Miyakawa, I. Expression of receptor tyrosine kinase EphB4 and its ligand ephrin-B2 is associated with malignant potential in endometrial cancer. *Oncology Reports* **8** (2001) 567-573.
- [57] Wu, Q. H.; Suo, Z. H.; Risberg, B.; Karlsson, M. G.; Villman, K.; Nesland, J. M. Expression of EphB2 and EphB4 in breast carcinoma. *Pathology andme Oncology Research* **10** (2004) 26-33.
- [58] Wu, Q. H.; Suo, Z. H.; Kristensen, G. B.; Baekelandt, M.; Nesland, J. M. The prognostic impact of EphB2/B4 expression on patients with advanced ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* **102** (2006) 15-21.
- [59] Xia, G. B.; Kumar, S. R.; Masood, R.; Zhu, S. T.; Reddy, R.; Krasnoperov, V.; Quinn, D. I.; Henshall, S. M.; Sutherland, R. L.; Pinski, J. K.; Daneshmand, S.; Buscarini, M.; Stein, J. P.; Zhong, C.; Broek, D.; Roy-Burman, P.; Gill, P. S. EphB4 expression and biological significance in prostate cancer. *Cancer Research* **65** (2005) 4623-4632.
- [60] Xia, G.; Kumar, S. P.; Stein, J. P.; Singh, J.; Krasnoperov, V.; Zhu, S.; Hassanieh, L.; Smith, D. L.; Buscarini, M.; Broek, D.; Quinn, D. I.; Weaver, F. A.; Gill, P. S. EphB4 receptor tyrosine kinase is expressed in bladder cancer and provides signals for cell survival. *Oncogene* **25** (2006) 769-780.

- [61] Xia, G. B.; Kumar, S. R.; Masood, R.; Koss, M.; Templeman, C.; Quinn, D.; Zhu, S. T.; Reddy, R.; Krasnoperov, V.; Gill, P. S. Up-regulation of EphB4 in mesothelioma and its biological significance. *Clinical Cancer Research* **11** (2005) 4305-4315.
- [62] Martiny-Baron, G.; Korff, T.; Schaffner, F.; Esser, N.; Eggstein, S.; Marme, D.; Augustin, H. G. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by soluble EphB4. *Neoplasia* **6** (2004) 248-257.
- [63] Masood, R.; Yavrouian, E. J.; Sinha, U. K.; Rice, D. H.; Salam, M. T.; Gill, P. S. The significance of EphB4 and ephrinB2 expression and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology Head and Neck Surgery* **134** (2008) 985-991.
- [64] Berclaz, G.; Flutsch, B.; Altermatt, H. J.; Rohrbach, V.; Djonov, V.; Ziemiecki, A.; Dreher, E.; Andres, A. C. Loss of EphB4 receptor tyrosine kinase protein expression during carcinogenesis of the human breast. *Oncology Reports* **9** (2002) 985-989.
- [65] Arango, D.; Davalos, V.; Dopeso, H.; Castano, J.; Wilson, A. J.; Vilardell, F.; Romero-Gimenez, J.; Espin, E.; Armengol, M.; Capella, G.; Mariadason, J. M.; Aaltonen, L. A.; Schwartz, S. EphB4 and survival of colorectal cancer patients. *Cancer Research* **66** (2006) 8943-8948.
- [66] Batlle, E.; Bacani, J.; Begthel, H.; Jonkeer, S.; Gregorieff, A.; van de Born, M.; Malats, N.; Sancho, E.; Boon, E.; Pawson, T.; Gallinger, S.; Pals, S.; Clevers, H. EphB receptor activity suppresses colorectal cancer progression. *Nature* **435** (2005) 1126-1130.
- [67] Takakura, N.; Huang, X.; Yamada, Y.; Kidoya, H.; Naito, H.; Nagahama, Y.; Kong, L.; Katoh, S. Y.; Li, W. F.; Ueno, M. EphB4 overexpression in B16 melanoma cells affects arterial-venous patterning in tumor angiogenesis. *Cancer Research* **67** (2007) 9800-9808.
- [68] Ethell, I. M.; Yang, N. Y.; Pasquale, E. B.; Owen, L. B. The EphB4 receptor-tyrosine kinase promotes the migration of melanoma cells through Rho-mediated actin cytoskeleton reorganization. *Journal of Biological Chemistry* **281** (2006) 32574-32586.
- [69] Yang, N. Y.; Lopez-Bergami, P.; Goydos, J. S.; Yip, D.; Walker, A. M.; Pasquale, E. B.; Ethell, I. M. The EphB4 receptor promotes the growth of melanoma cells expressing the ephrin-B2 ligand. *Pigment Cell and Melanoma Research* **23** (2010) 684-687.
- [70] Augustin, H. G.; Heroult, M.; Schaffner, F.; Pfaff, D.; Prahst, C.; Kirmse, R.; Kutschera, S.; Riedel, M.; Ludwig, T.; Vajkoczy, P.; Graeser, R. EphB4 promotes site-specific metastatic tumor cell dissemination by interacting with endothelial cell-expressed ephrinB2. *Molecular Cancer Research* **8** (2010) 1297-1309.
- [71] Roifman, C. M.; Freywald, A.; Sharfe, N. The kinase-null EphB6 receptor undergoes transphosphorylation in a complex with EphB1. *Journal of Biological Chemistry* **277** (2002) 3823-3828.
- [72] Hafner, C.; Becker, B.; Landthaler, M.; Vogt, T. Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and downregulation of EphA1 in nonmelanoma skin cancer. *Modern Pathology* **19** (2006) 1369-1377.
- [73] Gurniak, C. B.; Berg, L. J. A new member of the Eph family of receptors that lacks protein tyrosine kinase activity. *Oncogene* **13** (1996) 777-786.
- [74] Matsuoka, H.; Iwata, N.; Ito, M.; Shimoyama, M.; Nagata, A.; Chihara, K.; Takai, S.; Matsui, T. Expression of a kinase-defective Eph-like receptor in the normal human brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **235** (1997) 487-492.

- [75] Hafner, C.; Bataille, F.; Meyer, S.; Becker, B.; Roesch, A.; Landthaler, M.; Vogt, T. Loss of EphB6 expression in metastatic melanoma. *International Journal of Oncology* **23** (2003) 1553-9.
- [76] Tang, X. X.; Zhao, H.; Robinson, M. E.; Cnaan, A.; London, W.; Cohn, S. L.; Cheung, N. K.; Brodeur, G. M.; Evans, A. E.; Ikegaki, N. Prognostic significance of EPHB6, EFNB2, and EFNB3 expressions in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* **35** (2000) 656-8.
- [77] Luo, H.; Yu, G.; Wu, Y.; Wu, J. EphB6 crosslinking results in costimulation of T cells. *Journal of Clinical Investigation* **110** (2002) 1141-50.
- [78] Shimoyama, M.; Matsuoka, H.; Tamekane, A.; Ito, M.; Iwata, N.; Inoue, R.; Chihara, K.; Furuya, A.; Hanai, N.; Matsui, T. T-cell-specific expression of kinase-defective Eph-family receptor protein, EphB6 in normal as well as transformed hematopoietic cells. *Growth Factors* **18** (2000) 63-78.
- [79] Yamada, A.; Jin, M.; Komohara, Y.; Shichijo, S.; Harada, M.; Yamanaka, R.; Miyamoto, S.; Nikawa, J.; Itoh, K. Identification of EphB6 variant-derived epitope peptides recognized by cytotoxic T-lymphocytes from HLA-A24(+) malignant glioma patients. *Oncology Reports* **19** (2008) 1277-1283.
- [80] Yamada, A.; Jin, M.; Komohara, Y.; Shichijo, S.; Yamanaka, R.; Nikawa, J.; Itoh, K. Erythropoietin-producing hepatocyte B6 variant-derived peptides with the ability to induce glioma-reactive cytotoxic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2(+) glioma patients. *Cancer Science* **99** (2008) 1656-1662.
- [81] Aasheim, H. C.; Munthe, E.; Rian, E.; Holien, T.; Rasmussen, A. M.; Levy, F. O. Ephrin-B2 is a candidate ligand for the Eph receptor, EphB6. *Febs Letters* **466** (2000) 169-174.
- [82] Vogt, T.; Stolz, W.; Welsh, J.; Jung, B.; Kerbel, R. S.; Kobayashi, H.; Landthaler, M.; McClelland, M. Overexpression of Lerk-5/Eplg5 messenger RNA: a novel marker for increased tumorigenicity and metastatic potential in human malignant melanomas. *Clinical Cancer Research* **4** (1998) 791-797.
- [83] Meyer, S.; Hafner, C.; Guba, M.; Flegel, S.; Geissler, E. K.; Becker, B.; Koehl, G. E.; Orso, E.; Landthaler, M.; Vogt, T. Ephrin-B2 overexpression enhances integrin-mediated ECM-attachment and migration of B16 melanoma cells. *International Journal of Oncology* **27** (2005) 1197-1206.
- [84] Augustin, H. G.; Pfaff, D.; Heroult, M.; Riedel, M.; Reiss, Y.; Kirmse, R.; Ludwig, T.; Korff, T.; Hecker, M. Involvement of endothelial ephrin-B2 in adhesion and transmigration of EphB-receptor-expressing monocytes. *Journal of Cell Science* **121** (2008) 3842-3850.
- [85] Tsuchiya, S.; Yamabe, M.; Yamaguchi, Y.; Kobayashi, Y.; Konno, T.; Tada, K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer* **26** (1980) 171-6.
- [86] Gallagher, R.; Collins, S.; Trujillo, J.; McCredie, K.; Ahearn, M.; Tsai, S.; Metzgar, R.; Aulakh, G.; Ting, R.; Ruscetti, F.; Gallo, R. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **54** (1979) 713-33.
- [87] Johnson, J. P.; Demmerdieckmann, M.; Meo, T.; Hadam, M. R.; Riethmuller, G. Surface-antigens of human melanoma cells defined by monoclonal antibodies I. Biochemical characterization of two antigens found on cell lines and fresh tumors of diverse tissue origin. *European Journal of Immunology* **11** (1981) 825-831.

- [88] Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In-vitro cultivation of human tumors - establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **51** (1973) 1417-1423.
- [89] Todaro, G. J.; Fryling, C.; Delarco, J. E. Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77** (1980) 5258-5262.
- [90] Gluzman, Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SVbe40 mutants. *Cell* **23** (1981) 175-182.
- [91] Bennett, B. D.; Zeigler, F. C.; Gu, Q. M.; Fendly, B.; Goddard, A. D.; Gillett, N.; Matthews, W. Molecular cloning of a ligand for the Eph-related receptor protein-tyrosine kinase Htk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92** (1995) 1866-1870.
- [92] Brantley-Sieders, D.; Schmidt, S.; Parker, M.; Chen, J. Eph receptor tyrosine kinases in tumor and tumor microenvironment. *Current Pharmaceutical Design* **10** (2004) 3431-3442.
- [93] Shuman, S. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase *Journal of Biological Chemistry* **269** (1994) 32678-32684.
- [94] Tsuchiya, S.; Kobayashi, Y.; Goto, Y.; Okumura, H.; Nakae, S.; Konno, T.; Tada, K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Research* **42** (1982) 1530-6.
- [95] Rovera, G.; Santoli, D.; Damsky, C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76** (1979) 2779-83.
- [96] Collins, S. J.; Ruscetti, F. W.; Gallagher, R. E.; Gallo, R. C. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75** (1978) 2458-62.
- [97] Collins, S. J.; Ruscetti, F. W.; Gallagher, R. E.; Gallo, R. C. Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *Journal of Experimental Medicine* **149** (1979) 969-74.
- [98] Boyden, S. Chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *Journal of Experimental Medicine* **115** (1962) 453-&.
- [99] Liang, C. C.; Park, A. Y.; Guan, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* **2** (2007) 329-333.
- [100] Rehm, H. *Der Experimentator - Proteinbiochemie/Proteomics* 5. Auflage, 390 Seiten (2006) Spektrum Akademischer Verlag, München.
- [101] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227** (1970) 680-&.

- [102] Weishaupt, D.; Köchli, V. D.; Marincek, B. *Wie funktioniert MRI?* 5. Auflage, 145 Seiten (2006) Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- [103] Smith, K. A.; Hill, S. A.; Begg, A. C.; Denekamp, J. Validation of the fluorescent dye Hoechst 33342 as a vascular space marker in tumors. *British Journal of Cancer* **57** (1988) 247-253.
- [104] Bardelle, C.; Cross, D.; Davenport, S.; Kettle, J. G.; Ko, E. J.; Leach, A. G.; Mortlock, A.; Read, J.; Roberts, N. J.; Robins, P.; Williams, E. J. Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 1: Structure-based design and optimization of a series of 2,4-bis-anilinopyrimidines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **18** (2008) 2776-2780.
- [105] Mamat, C.; Mosch, B.; Neuber, C.; Kockerling, M.; Bergmann, R.; Pietzsch, J. Fluorine-18 Radiolabeling and Radiopharmacological Characterization of a Benzodioxolypyrimidine-based Radiotracer Targeting the Receptor Tyrosine Kinase EphB4. *Chemmedchem* **7** (2012) 1991-2003.
- [106] Borowski, E.; Bontemps-Gracz, M. M.; Piwkowska, A. Strategies for overcoming ABC-transporters-mediated multidrug resistance (MDR) of tumor cells. *Acta Biochim Pol* **52** (2005) 609-27.
- [107] Demeule, M.; Laplante, A.; Sepehr-Arae, A.; Beaulieu, E.; Averill-Bates, D.; Wenger, R. M.; Beliveau, R. Inhibition of P-glycoprotein by cyclosporin A analogues and metabolites. *Biochemistry and Cell Biology* **77** (1999) 47-58.
- [108] Bumol, T. F.; Walker, L. E.; Reisfeld, R. A. Biosynthetic studies of proteoglycans in human melanoma cells with a monoclonal antibody to a core glycoprotein of chondroitin sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* **259** (1984) 2733-2741.
- [109] Morgan, A. C.; Galloway, D. R.; Reisfeld, R. A. Production and characterization of monoclonal antibody to a melanoma specific glycoprotein. *Hybridoma* **1** (1981) 27-36.
- [110] Bumol, T. F.; Reisfeld, R. A. Unique glycoprotein proteoglycan complex defined by monoclonal antibody on human melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **79** (1982) 1245-1249.
- [111] Pluschke, G.; Vanek, M.; Evans, A.; Dittmar, T.; Schmid, P.; Itin, P.; Filardo, E. J.; Reisfeld, R. A. Molecular cloning of a human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** (1996) 9710-9715.
- [112] Mullani, N.; Herbst, R.; Abbruzzese, J.; Barron, B.; Lamki, L.; Charnsangavej, C.; Kim, E.; Tran, H.; Jiwani, A.; Gould, K. First pass FDG measured blood flow in tumors: a comparison with O-15 labeled water measured blood flow. *Clinical Positron Imaging* **3** (2000) 153.
- [113] Mullani, N. A.; Herbst, R. S.; O'Neil, R. G.; Gould, K. L.; Barron, B. J.; Abbruzzese, J. L. Tumor blood flow measured by PET dynamic imaging of first-pass ¹⁸F-FDG uptake: a comparison with ¹⁵O-labeled water measured blood flow. *Journal of Nuclear Medicine* **49** (2008) 517-23.
- [114] Cochet, A.; Pigeonnat, S.; Khoury, B.; Vrigneaud, J. M.; Touzery, C.; Berriolo-Riedinger, A.; Dygai-Cochet, I.; Toubeau, M.; Humbert, O.; Coudert, B.; Fumoleau, P.; Arnould, L.; Brunotte, F. Evaluation of breast tumor blood flow with dynamic first-pass F-18-FDG PET/CT: comparison with angiogenesis markers and prognostic factors. *Journal of Nuclear Medicine* **53** (2012) 512-520.

- [115] <http://www.melanomacenter.org/staging/index.html> (08.08.2012)
- [116] Balch, C. M.; Gershenwald, J. E.; Soong, S. J.; Thompson, J. F.; Atkins, M. B.; Byrd, D. R.; Buzaid, A. C.; Cochran, A. J.; Coit, D. G.; Ding, S. L.; Eggermont, A. M.; Flaherty, K. T.; Gimotty, P. A.; Kirkwood, J. M.; McMasters, K. M.; Mihm, M. C.; Morton, D. L.; Ross, M. I.; Sober, A. J.; Sondak, V. K. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of Clinical Oncology* **27** (2009) 6199-6206.
- [117] Rosenberg, S. A.; Dudley, M. E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Current Opinion in Immunology* **21** (2009) 233-240.
- [118] Rosenberg, S. A.; Packard, B. S.; Aebersold, P. M.; Solomon, D.; Topalian, S. L.; Toy, S. T.; Simon, P.; Lotze, M. T.; Yang, J. C.; Seipp, C. A.; Simpson, C.; Carter, C.; Bock, S.; Schwartzentruber, D.; Wei, J. P.; White, D. E. Use of tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma - a preliminary report. *New England Journal of Medicine* **319** (1988) 1676-1680.
- [119] Muul, L. M.; Spiess, P. J.; Director, E. P.; Rosenberg, S. A. Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma. *Journal of Immunology* **138** (1987) 989-995.
- [120] Rosenberg, S. A.; Yang, J. C.; Sherry, R. M.; Kammula, U. S.; Hughes, M. S.; Phan, G. Q.; Citrin, D. E.; Restifo, N. P.; Robbins, P. F.; Wunderlich, J. R.; Morton, K. E.; Laurencot, C. M.; Steinberg, S. M.; White, D. E.; Dudley, M. E. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research* **17** (2011) 4550-4557.
- [121] Paredes, B. E. Regression in malignant melanoma: definition, etiopathogenesis, morphology and differential diagnosis. *Pathologie* **28** (2007) 453-63.
- [122] Blessing, K.; McLaren, K. M. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. *Histopathology* **20** (1992) 315-22.
- [123] Inada, T.; Iwama, A.; Sakano, S.; Ohno, M.; Sawada, K.; Suda, T. Selective expression of the receptor tyrosine kinase, HTK, on human erythroid progenitor cells. *Blood* **89** (1997) 2757-65.
- [124] Boyd, A. W.; Ward, L. D.; Wicks, I. P.; Simpson, R. J.; Salvaris, E.; Wilks, A.; Welch, K.; Loudovaris, M.; Rockman, S.; Busmanis, I. Isolation and characterization of a novel receptor-type protein tyrosine kinase (hek) from a human pre-B cell line. *Journal of Biological Chemistry* **267** (1992) 3262-7.
- [125] Ciossek, T.; Lerch, M. M.; Ullrich, A. Cloning, characterization, and differential expression of MDK2 and MDK5, two novel receptor tyrosine kinases of the eck/eph family. *Oncogene* **11** (1995) 2085-95.
- [126] Reißerweber, B. Der Einfluss der Hypoxie auf die Expression und Synthese verschiedener Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden beim malignen Melanom. *Dissertation, TU Dresden* (2012).
- [127] Luo, H.; Wan, X.; Wu, Y.; Wu, J. Cross-linking of EphB6 resulting in signal transduction and apoptosis in Jurkat cells. *Journal of Immunology* **167** (2001) 1362-70.
- [128] Yu, G.; Luo, H.; Wu, Y.; Wu, J. Ephrin B2 induces T cell costimulation. *Journal of Immunology* **171** (2003) 106-14.

- [129] Yu, H. R.; Kuo, H. C.; Huang, H. C.; Huang, L. T.; Tain, Y. L.; Chen, C. C.; Liang, C. D.; Sheen, J. M.; Lin, I. C.; Wu, C. C.; Ou, C. Y.; Yang, K. D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a reliable internal control in western blot analysis of leukocyte subpopulations from children. *Anal Biochem* **413** (2011) 24-9.
- [130] Ferguson, R. E.; Carroll, H. P.; Harris, A.; Maher, E. R.; Selby, P. J.; Banks, R. E. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics* **5** (2005) 566-71.
- [131] Warburg, O.; Posener, K.; Negelein, E. On the metabolism of carcinoma cells. *Biochemische Zeitschrift* **152** (1924) 309-344.
- [132] Lüllmann-Rauch, R. Taschenbuch Histologie 2. Auflage, 644 Seiten (2006) Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- [133] McGary, E. C.; Lev, D. C.; Bar-Eli, M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biology and Therapy* **1** (2002) 459-65.
- [134] Hsu, M. Y.; Meier, F. E.; Nesbit, M.; Hsu, J. Y.; Van Belle, P.; Elder, D. E.; Herlyn, M. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *American Journal of Pathology* **156** (2000) 1515-1525.
- [135] Murai, K. K.; Pasquale, E. B. 'Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *Journal of Cell Science* **116** (2003) 2823-32.
- [136] Noren, N. K.; Yang, N. Y.; Silldorff, M.; Mutyala, R.; Pasquale, E. B. Ephrin-independent regulation of cell substrate adhesion by the EphB4 receptor. *Biochemical Journal* **422** (2009) 433-442.
- [137] Matsuoka, H.; Obama, H.; Kelly, M. L.; Matsui, T.; Nakamoto, M. Biphasic functions of the kinase-defective EphB6 receptor in cell adhesion and migration. *Journal of Biological Chemistry* **280** (2005) 29355-29363.
- [138] Bosserhoff, A. K.; Buettner, R. Expression, function and clinical relevance of MIA (melanoma inhibitory activity). *Histol Histopathol* **17** (2002) 289-300.
- [139] Yamazaki, D.; Kurisu, S.; Takenawa, T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Science* **96** (2005) 379-386.
- [140] Kohn, E. C.; Hollister, G. H.; DiPersio, J. D.; Wahl, S.; Liotta, L. A.; Schiffmann, E. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces human melanoma-cell migration. *International Journal of Cancer* **53** (1993) 968-72.
- [141] Liotta, L. A.; Mandler, R.; Murano, G.; Katz, D. A.; Gordon, R. K.; Chiang, P. K.; Schiffmann, E. Tumor cell autocrine motility factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83** (1986) 3302-6.
- [142] Rae, J.; Creighton, C.; Meck, J.; Haddad, B.; Johnson, M. MDA-MB-435 cells are derived from M14 Melanoma cells - a loss for breast cancer, but a boon for melanoma research. *Breast Cancer Research and Treatment* **104** (2007) 13-19.
- [143] Vindis, C.; Cerretti, D. P.; Daniel, T. O.; Huynh-Do, U. EphB1 recruits c-Src and p52(Shc) to activate MAPK/ERK and promote chemotaxis. *Journal of Cell Biology* **162** (2003) 661-671.

- [144] Zhou, S. Y.; Shoelson, S. E.; Chaudhuri, M.; Gish, G.; Pawson, T.; Haser, W. G.; King, F.; Roberts, T.; Ratnofsky, S.; Lechleider, R. J.; Neel, B. G.; Birge, R. B.; Fajardo, J. E.; Chou, M. M.; Hanafusa, H.; Schaffhausen, B.; Cantley, L. C. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72** (1993) 767-778.
- [145] Ellis, C.; Kasmi, F.; Ganju, P.; Walls, E.; Panayotou, G.; Reith, A. D. A juxtamembrane autophosphorylation site in the Eph family receptor tyrosine kinase, Sek, mediates high affinity interaction with p59fyn. *Oncogene* **12** (1996) 1727-1736.
- [146] Lu, C.; Kerbel, R. S. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *Journal of Cell Biology* **120** (1993) 1281-8.
- [147] Moretti, S.; Pinzi, C.; Spallanzani, A.; Berti, E.; Chiarugi, A.; Mazzoli, S.; Fabiani, M.; Vallecchi, C.; Herlyn, M. Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of human melanocytic lesions. *International Journal of Cancer* **84** (1999) 160-8.
- [148] Kwan Tat, S.; Pelletier, J. P.; Amiable, N.; Boileau, C.; Lajeunesse, D.; Duval, N.; Martel-Pelletier, J. Activation of the receptor EphB4 by its specific ligand ephrin B2 in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Arthritis Rheum* **58** (2008) 3820-30.
- [149] Kwan Tat, S.; Pelletier, J. P.; Amiable, N.; Boileau, C.; Lavigne, M.; Martel-Pelletier, J. Treatment with ephrin B2 positively impacts the abnormal metabolism of human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research and Therapy* **11** (2009) R119.
- [150] Cornil, I.; Theodorescu, D.; Man, S.; Herlyn, M.; Jambrosic, J.; Kerbel, R. S. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88** (1991) 6028-32.
- [151] Lu, C.; Vickers, M. F.; Kerbel, R. S. Interleukin 6: a fibroblast-derived growth inhibitor of human melanoma cells from early but not advanced stages of tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89** (1992) 9215-9.
- [152] Fontaine, V.; Mahieu, M.; Content, J. Interferon-gamma and interleukin-6 inhibit proliferation in human melanoma cells by different signalling pathways. *Melanoma Res* **8** (1998) 24-30.
- [153] Cheng, N.; Brantley, D. M.; Chen, J. The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **13** (2002) 75-85.
- [154] Wang, H. U.; Chen, Z. F.; Anderson, D. J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93** (1998) 741-753.
- [155] Djokovic, D. Artery and vein size is balanced by Notch and ephrin B2/EphB4 during angiogenesis. *Development* **135** (2008) 3755-64.
- [156] Djokovic, D.; Trindade, A.; Gigante, J.; Badenes, M.; Silva, L.; Liu, R.; Li, X.; Gong, M.; Krasnoperov, V.; Gill, P. S.; Duarte, A. Combination of Dll4/Notch and Ephrin-B2/EphB4 targeted therapy is highly effective in disrupting tumor angiogenesis. *BMC Cancer* **10** (2010) 641.

- [157] Noren, N. K.; Lu, M.; Freeman, A. L.; Koolpe, M.; Pasquale, E. B. Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (2004) 5583-5588.
- [158] Krasnoperov, V.; Kumar, S. R.; Ley, E.; Li, X. Q.; Scehnet, J.; Liu, R.; Zozulya, S.; Gill, P. S. Novel EphB4 monoclonal antibodies modulate angiogenesis and inhibit tumor growth. *American Journal of Pathology* **176** (2010) 2029-2038.
- [159] Kertesz, N.; Krasnoperov, V.; Reddy, R.; Leshanski, L.; Kumar, S. R.; Zozulya, S.; Gill, P. S. The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Blood* **107** (2006) 2330-2338.
- [160] Munn, L. L. Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies. *Drug Discov Today* **8** (2003) 396-403.
- [161] Vermeulen, P. B.; Gasparini, G.; Fox, S. B.; Colpaert, C.; Marson, L. P.; Gion, M.; Belien, J. A. M.; de Waal, R. M. W.; Van Marck, E.; Magnani, E.; Weidner, N.; Harris, A. L.; Dirix, L. Y. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *European Journal of Cancer* **38** (2002) 1564-1579.
- [162] Warren, B. A.; Shubik, P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. *Laboratory Investigations* **15** (1966) 464-78.
- [163] Hammersen, F.; Endrich, B.; Messmer, K. The fine structure of tumor blood vessels I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental* **4** (1985) 31-43.
- [164] Hendrix, M. J.; Seftor, E. A.; Hess, A. R.; Seftor, R. E. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nature Reviews Cancer* **3** (2003) 411-21.
- [165] Maniotis, A. J.; Folberg, R.; Hess, A.; Seftor, E. A.; Gardner, L. M.; Pe'er, J.; Trent, J. M.; Meltzer, P. S.; Hendrix, M. J. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *American Journal of Pathology* **155** (1999) 739-52.
- [166] Hess, A. R.; Seftor, E. A.; Gardner, L. M.; Carles-Kinch, K.; Schneider, G. B.; Seftor, R. E.; Kinch, M. S.; Hendrix, M. J. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation: role of epithelial cell kinase (Eck/EphA2). *Cancer Research* **61** (2001) 3250-5.
- [167] Cai, W.; Ebrahimnejad, A.; Chen, K.; Cao, Q.; Li, Z. B.; Tice, D. A.; Chen, X. Quantitative radioimmunoPET imaging of EphA2 in tumor-bearing mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34** (2007) 2024-36.
- [168] Xiong, C.; Huang, M.; Zhang, R.; Song, S.; Lu, W.; Flores, L., 2nd; Gelovani, J.; Li, C. In vivo small-animal PET/CT of EphB4 receptors using ⁶⁴Cu-labeled peptide. *Journal of Nuclear Medicine* **52** (2011) 241-8.
- [169] Zhang, R.; Xiong, C.; Huang, M.; Zhou, M.; Huang, Q.; Wen, X.; Liang, D.; Li, C. Peptide-conjugated polymeric micellar nanoparticles for dual SPECT and optical imaging of EphB4 receptors in prostate cancer xenografts. *Biomaterials* **32** (2011) 5872-9.

- [170] Hicks, J. W.; VanBrocklin, H. F.; Wilson, A. A.; Houle, S.; Vasdev, N. Radiolabeled small molecule protein kinase inhibitors for imaging with PET or SPECT. *Molecules* **15** (2010) 8260-78.
- [171] Mosch, B.; Pietzsch, J. Effects of irradiation on viability, growth, metastatic properties and expression of Eph receptors and their ephrin ligands in human melanoma cells. *European Journal of Cancer Supplements* **8** (2010) 211-211.
- [172] Kolb, P.; Kipouros, C. B.; Huang, D. Z.; Caffisch, A. Structure-based tailoring of compound libraries for high-throughput screening: discovery of novel EphB4 kinase inhibitors. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **73** (2008) 11-18.
- [173] Noberini, R.; Lamberto, I.; Pasquale, E. B. Targeting Eph receptors with peptides and small molecules: progress and challenges. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **23** (2012) 51-7.
- [174] Miyazaki, Y.; Nakano, M.; Sato, H.; Truesdale, A. T.; Stuart, J. D.; Nartey, E. N.; Hightower, K. E.; Kane-Carson, L. Design and effective synthesis of novel templates, 3,7-diphenyl-4-amino-thieno and furo-[3,2-c]pyridines as protein kinase inhibitors and in vitro evaluation targeting angiogenetic kinases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **17** (2007) 250-254.
- [175] Lafleur, K.; Huang, D. Z.; Zhou, T.; Caffisch, A.; Nevado, C. Structure based optimization of potent and selective inhibitors of the tyrosine kinase erythropoietin producing human hepatocellular carcinoma receptor B4 (EphB4). *Journal of Medicinal Chemistry* **52** (2009) 6433-6446.
- [176] Mitchell, S. A.; Danca, M. D.; Blomgren, P. A.; Darrow, J. W.; Currie, K. S.; Kropf, J. E.; Lee, S. H.; Gallion, S. L.; Xiong, J. M.; Pippin, D. A.; DeSimone, R. W.; Brittelli, D. R.; Eustice, D. C.; Bourret, A.; Hill-Drzewi, M.; Maciejewski, P. M.; Elkin, L. L. Imidazo[1,2-a]pyrazine diaryl ureas: inhibitors of the receptor tyrosine kinase EphB4. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **19** (2009) 6991-6995.
- [177] Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research* **41** (1981) 1967-1972.
- [178] Goldberg, H.; Ling, V.; Wong, P. Y.; Skorecki, K. Reduced cyclosporin accumulation in multidrug-resistant cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **152** (1988) 552-8.
- [179] Langer, G. A.; Serena, S. D.; Nudd, L. M. Localization of contractile-dependent Ca: comparison of Mn and verapamil in cardiac and skeletal muscle. *American Journal of Physiology* **229** (1975) 1003-7.
- [180] Fuchs, B.; Ostmeier, H.; Suter, L. Pkn-glycoprotein expression in malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol* **117** (1991) 168-71.
- [181] Schadendorf, D.; Herfordt, R.; Czarnetzki, B. M. P-glycoprotein expression in primary and metastatic malignant melanoma. *British Journal of Dermatology* **132** (1995) 551-5.
- [182] Helmerl, S.; Bosserhoff, A. K.; Langmann, T.; Ecker, J.; Schmitz, G. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res* **17** (2007) 265-273.
- [183] Kettle, J. G.; Read, J.; Leach, A. G.; Barlaam, B. C.; Ducray, R.; Lambert-Van Der Brempt, C. M. P. Pyrimidine derivatives. *Patent Cooperation Treaty International Application* **WO2007085833** (2007).

- [184] Bardelle, C.; Coleman, T.; Cross, D.; Davenport, S.; Kettle, J. G.; Ko, E. J.; Leach, A. G.; Mortlock, A.; Read, J.; Roberts, N. J.; Robins, P.; Williams, E. J. Inhibitors of the tyrosine kinase EphB4. Part 2: structure-based discovery and optimisation of 3,5-bis substituted anilinopyrimidines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **18** (2008) 5717-21.
- [185] Kniess, T.; Bergmann, R.; Kuchar, M.; Steinbach, J.; Wuest, F. Synthesis and radiopharmacological investigation of 3-[4'-¹⁸F]fluorobenzylidene]indolin-2-one as possible tyrosine kinase inhibitor. *Bioorg Med Chem* **17** (2009) 7732-42.
- [186] Kuchar, M.; Oliveira, M. C.; Gano, L.; Santos, I.; Kniess, T. Radioiodinated sunitinib as a potential radiotracer for imaging angiogenesis-radiosynthesis and first radiopharmacological evaluation of 5-[¹²⁵I]iodo-sunitinib. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **22** (2012) 2850-5.
- [187] Davis, S.; Gale, N. W.; Aldrich, T. H.; Maisonpierre, P. C.; Lhotak, V.; Pawson, T.; Goldfarb, M.; Yancopoulos, G. D. Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* **266** (1994) 816-9.
- [188] Boyd, A. W.; Ward, L. D.; Wicks, I. P.; Simpson, R. J.; Salvaris, E.; Wilks, A.; Welch, K.; Loudovaris, M.; Rockman, S.; Busmanis, I. Isolation and Characterization of a Novel Receptor-Type Protein Tyrosine Kinase (Hek) from a Human Pre-B Cell-Line. *Journal of Biological Chemistry* **267** (1992) 3262-3267.
- [189] Magnelli, P. E.; Bielik, A. M.; Guthrie, E. P. Identification and characterization of protein glycosylation using specific endo- and exoglycosidases. *Journal of Visualized Experiments* (2011) e3749.
- [190] Wuest, F.; Kohler, L.; Berndt, M.; Pietzsch, J. Systematic comparison of two novel, thiol-reactive prosthetic groups for ¹⁸F-labeling of peptides and proteins with the acylation agent succinimidyl-4-[¹⁸F]fluorobenzoate ([¹⁸F]SFB). *Amino Acids* **36** (2009) 283-295.

8 Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei meiner Familie und bei allen anderen Personen bedanken, die mich während meiner Studien- und Promotionszeit begleitet, mich unterstützt und somit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jörg Steinbach und Prof. Dr. Jens Pietzsch, die mir dieses interessante und anspruchsvolle Thema bereitgestellt haben und mir stets mit anregenden Diskussionen motivierend zur Seite standen. Prof. Dr. Jens Pietzsch möchte ich ferner für seine engagierte Betreuung und die eingeräumten wissenschaftlichen Freiheiten danken. Prof. Dr. Thomas Henle danke ich für sein Interesse am Thema dieser Dissertation und für die Übernahme des Zweitgutachtens. Bei Dr. Birgit Mosch möchte ich mich für die hilfreichen Ratschläge, ihre Unterstützung bei den tierexperimentellen Untersuchungen sowie für das kritische Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken. Für ihren Beitrag zu den tierexperimentellen Untersuchungen danke ich außerdem Dr. Ralf Bergmann, Sebastian Meister, Regina Herrlich und Andrea Suhr. Dr. Constantin Mamat danke ich für die Darstellung und Radiomarkierung der Verbindungen 1 und 2, ohne die eine Reihe von Untersuchungen nicht hätten stattfinden können. In diesem Zusammenhang danke ich auch dem Team der Radionuklidproduktion, insbesondere Dr. Stephan Preusche.

Mein besonderer Dank gilt Mareike Barth, Aline Morgenegg, Catharina Heinig und Sonja Lehnert für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihren Beitrag zu einer stets angenehmen Laboratmosphäre. Des Weiteren danke ich Susann Wolf, Dr. Bettina Reißerweber und Manuela Kuchar für ihre Hilfsbereitschaft. Katharina Müller danke ich für die engagierte Optimierung der sEphB4 und sEphB6-Reinigung im Rahmen ihrer Masterarbeit. Ein Dankeschön geht auch an Dr. Christian Förster und Markus Laube, die mir bei chemischen Fragestellungen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Dr. Susan Hoppmann und Dr. Franziska Graf, die mich, insbesondere zu Beginn meiner Promotionszeit, mit hilfreichen Vorschlägen und Diskussionen sehr unterstützt haben, mir stets ein Vorbild waren und mir schließlich einen großen Teil ihrer Erfahrungen zurückgelassen haben. Für die vielen anregenden Büro-Diskussionen und das aufmerksame Korrekturlesen meiner Arbeit danke ich Doreen Pietzsch und Nicole Bechmann.

Prof. Dr. Markus Schaich und Dr. Thomas Illmer danke ich für die Möglichkeit zur Nutzung des Nucleofektor® I sowie Claudia Dill und Susann Höfner für die technische Unterstützung am Nucleofektor® I bzw. am FACS Aria™ II.

9 Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Mamat, C.; Mosch, B.; **Neuber, C.**; Köckerling, M.; Bergmann, R.; Pietzsch, J. Fluorine-18 Radiolabeling and Radiopharmacological Characterization of a Benzodioxolylpyrimidine-based Radiotracer Targeting the Receptor Tyrosine Kinase EphB4. *ChemMedChem* **7** (2012) 1991-2003.

Mosch, B.; Reissenweber, B.; **Neuber, C.**; Pietzsch, J. Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis.

Journal of Oncology (2010) 2010:135285.

Vorträge

Neuber, C.; Mosch, B.; Mamat, C.; Bergmann, R.; Pietzsch, J. Biological characterization of ¹⁸F-radiolabeled anilinopyrimidines: a potential radiotracer for EphB4 receptor imaging.

5th European Workshop on Apoptosis, Angiogenesis, and Hypoxia in Tumor-Microenvironment: Biological aspects and Imaging, 05.-08.10.2011, Berder Island, Frankreich.

Poster

Mamat, C.; **Neuber, C.**; Mosch, B.; Pietzsch, J.; Steinbach, J. Development and fluorine-18-radiolabeling of benzodioxolylpyrimidine EphB4 receptor inhibitors.

19th International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences (ISRS), 28.08.-02.09.2011, Amsterdam, Niederlande, *Journal of Labeled Compounds and Radiopharmaceuticals* **54** (2011) Supplement 1: 178.

Neuber, C.; Mosch, B.; Mamat, C.; Pietzsch, J. Interaction of ephrinB2 with its receptors EphB4 and EphB6 – potential impact on tumor-associated inflammation in human melanoma.

21th Meeting of the European Association for Cancer Research (EACR), 26.-29.06.2010, Oslo, Norwegen,

European Journal of Cancer **8** (2010) Supplement: 120-121.

Neuber, C.; Hoppmann, S.; Pietzsch, J. Mild glykatierte Lipoproteine geringer Dichte (LDL) verstärken die Adipogenese von 3T3-L1-Zellen.

Erste Gemeinsame Tagung der Deutschen Diabetes- (DDG) und Adipositas-Gesellschaft (DAG), 05.-07.11.2009, Berlin, Deutschland.

VERSICHERUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, 12. Februar 2013

ERKLÄRUNG

Die Dissertation wurde in der Zeit von Februar 2009 bis Februar 2013 am Institut für Radiopharmazeutische Krebsforschung des Helmholtz-Zentrum Dresden-Rossendorf unter wissenschaftlicher Betreuung von Prof. J. Steinbach und Prof. J. Pietzsch angefertigt.

Bisherige erfolglose Promotionsvorhaben haben nicht stattgefunden.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften vom 23.02.2011 an.

Dresden, 12. Februar 2013