

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie mit Poliklinik

**Einfluss der CXCR4-Expression auf das
Migrationsverhalten beim Rhabdomyosarkom und die
CXCR4-Inhibition als mögliche Therapieoption *in vitro***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Regenbogen, Stephan

2020

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. G. Seitz

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. R. Handgretinger

Tag der Disputation: 13.12.2019

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS RHABDOMYOSARKOM	1
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE	1
1.1.2 ÄTIOLOGIE	1
1.1.3 HISTOLOGIE UND GENETIK.....	2
1.1.4 STADIEN-/RISIKOEINTEILUNG	3
1.1.5 KLINISCHE SYMPTOMATIK UND DIAGNOSTIK.....	3
1.1.6 THERAPIE.....	3
1.1.7 PROGNOSE.....	5
1.2 CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN	6
1.2.1 CHEMOKINE	6
1.2.2 CHEMOKINREZEPTOREN	7
1.2.3 CXC-MOTIV-CHEMOKINREZEPTOR 4.....	7
1.3 SERUM- UND GLUKOKORTIKOID-INDUZIERTE KINASEN.....	10
1.3.1 ISOFORMEN.....	10
1.3.2 FUNKTION, EXPRESSION UND AKTIVIERUNG	11
1.3.3 SGK3 IM TUMORGEWEBE UND DER EINFLUSS AUF CXCR4	11
1.4 EINGESetzte SUBSTANZEN UND IHRE PHARMAKODYNAMIK.....	12
1.4.1 ZYTOSTATIKA	12
1.4.2 AMD3100/PLERIXAFOR.....	13
1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 MATERIALIEN	15
2.1.1 VERWENDETE ZELLINIEN.....	15
2.1.2 GERÄTE/HILFSMITTEL.....	16
2.1.3 PROGRAMME/SOFTWARE.....	17
2.1.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	18
2.1.5 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN UND MEDIENZUSÄTZE	20

2.1.6	MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER	22
2.1.7	ANTIKÖRPER UND PRIMER.....	23
2.1.8	ZYTOSTATIKA.....	24
2.1.9	INHIBITOREN UND LIGANDEN.....	24
2.2	METHODEN	25
2.2.1	ZELLKULTUR.....	25
2.2.2	ZELLVIABILITÄT.....	26
2.2.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	27
2.2.4	REAL-TIME POLYMERASE-KETTENREAKTION	29
2.2.5	MIGRATION.....	32
2.2.6	MIKROMETASTASENMODELL	34
2.2.7	STATISTISCHE VERFAHREN	36
3	ERGEBNISSE.....	37
3.1	VIABILITÄT UND EXPRESSIONSANALYSEN	37
3.1.1	EXPRESSIONSANALYSE VON CXCR4 BEI RMS-ZELLEN	37
3.1.2	BESTIMMUNG DER ZELLVIABILITÄT UND IC50 NACH BEHANDLUNG MIT ZYTOSTATIKA	37
3.1.3	EXPRESSION VON CXCR4 NACH BEHANDLUNG MIT ZYTOSTATIKA.....	40
3.1.4	BINDUNGSVERHALTEN VON AMD3100 BEI RH30-ZELLEN	45
3.1.5	BINDUNGSVERHALTEN VON AMD3100 IN KOMBINATION MIT ZYTOSTATIKA.....	46
3.2	ZEITLICHE, PHARMAKOLOGISCHE UND TRANSKRIPTIONELLE EINFLUSSFAKTOREN	50
3.2.1	EINFLUSS VON ZYTOSTATIKA AUF DIE EXPRESSION DER SGK3 MRNA	50
3.2.2	UNTERSUCHUNG DER ZEITLICHEN VARIANZ AN AUSGEWÄHLTEN ZYTOSTATIKA.....	53
3.2.3	UNTERSUCHUNG DES ZUSAMMENHANGS DES PHARMAKOLOGISCHEN WIRKPROFILS AUF DIE CXCR4-EXPRESSION.....	56
3.2.4	BILDUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES DURCH ZYTOSTATIKA	59
3.3	MIGRATION.....	62
1.1.1	MIGRATION VON RMS-ZELLEN IN TRANSWELLS.....	62
3.3.1	MIGRATION VON RMS-ZELLEN NACH ZYTOSTATISCHER BEHANDLUNG.....	63
3.3.2	MIKROMETASTASENMODELL BEI RMS-SPHÄROIDEN.....	67
4	DISKUSSION.....	74
4.1	EXPRESSION VON CXCR4 UND DER MODULATORISCHE EINFLUSS VON ZYTOSTATIKA	74
4.2	BINDUNGSVERHALTEN VON AMD3100 UNTER ZYTOSTATISCHER THERAPIE	75
4.3	MIGRATION VON RMS-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON CXCR4	76

4.4 KINETIK DER CXCR4-EXPRESSION.....	81
4.5 KLINISCHE RELEVANZ	83
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	84
LITERATURVERZEICHNIS	IX
ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT	XIX
VERÖFFENTLICHUNGEN.....	XX
DANKSAGUNG.....	XXII

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: KOMPONENTEN DES CHEMOKIN-CHEMOKINREZEPTOR-4/SDF-1 SIGNALWEGS	8
ABBILDUNG 2: DIE ROLLE DER CXCR4/SDF-1-ACHSE IN DER MIGRATION (METASTASIERUNG), ANGIOGENESE UND INVASION AM BEISPIEL VON BRUSTKREBSZELLEN	10
ABBILDUNG 3: AUFNAHME DER ZELLINIEN (LINKS) RH30 (ARMS) UND (RECHTS) RD (ERMS)	15
ABBILDUNG 4: EIGENE DARSTELLUNG DER MIGRATIONSVERSUCHE	34
ABBILDUNG 5: AUFNAHME EINES RH30-TUMORSPHÄROIDS	35
ABBILDUNG 6: CXCR4 BEI RMS-ZELLEN	37
ABBILDUNG 7: ERMITTLUNG DER ZELLVIABILITÄT BEI RMS-ZELLINIEN NACH DER BEHANDLUNG MIT ZYTOSTATIKA	39
ABBILDUNG 8: ANALYSE DER OBERFLÄCHENEXPRESSION VON CXCR4 BEI RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT ZYTOSTATIKA	42
ABBILDUNG 9: ANALYSE DER MRNA-EXPRESSION VON CXCR4 BEI RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT ZYTOSTATIKA	44
ABBILDUNG 10: ZEIT- UND KONZENTRATIONSABHÄNGIGE BINDUNG VON AMD3100 AN CXCR4 AUF RH30-ZELLEN	45
ABBILDUNG 11: CXCR4 POSITIVE ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT AMD3100 UND/ODER ZYTOSTATIKA NACH 24 STD.	49
ABBILDUNG 12: EXPRESSIONSANALYSE DER SGK3 BEI RMS-ZELLEN.....	50
ABBILDUNG 13: SGK3 MRNA-EXPRESSION VON RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT ZYTOSTATIKA.....	52
ABBILDUNG 14: ZEIT- UND KONZENTRATIONSABHÄNGIGE OBERFLÄCHENEXPRESSION VON CXCR4 BEI RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT DOXORUBICIN ODER VINCRISTIN	54
ABBILDUNG 15: CXCR4 POSITIVE RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT AMD3100 UND/ODER ZYTOSTATIKA NACH 48 STD	55
ABBILDUNG 16: ERMITTLUNG DER IC50-WERTE BEI RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT PACLITAXEL	56
ABBILDUNG 17: ANALYSE DER CXCR4-EXPRESSION VON RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT PACLITAXEL	57
ABBILDUNG 18: SGK3 MRNA-EXPRESSION VON RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT PACLITAXEL	58

ABBILDUNG 19: EINFLUSS VON ZYTOSTATIKA AUF DIE BILDUNG VON REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES (ROS) BEI RMS-ZELLEN.....	61
ABBILDUNG 20: MIGRATIONSVERHALTEN VON RMS-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON SDF-1A.....	63
ABBILDUNG 21: MIGRATIONSVERHALTEN VON RMS-ZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VORBEHANDLUNG MIT DOXORUBICIN/VINCRISTIN	64
ABBILDUNG 22: MIGRATION VON RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT DOXORUBICIN UND/ODER AMD3100.....	66
ABBILDUNG 23: MIGRATION VON RMS-ZELLEN NACH DER BEHANDLUNG MIT VINCRISTIN UND/ODER AMD3100.....	67
ABBILDUNG 24: AUSWACHSEN VON RMS-ZELLEN AUS DEM 3D-ZELLVERBAND IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BEHANDLUNG MIT DOXORUBICIN UND/ODER AMD3100	69
ABBILDUNG 25: AUSWACHSEN VON RMS-ZELLEN AUS DEM 3D-ZELLVERBAND IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BEHANDLUNG MIT VINCRISTIN UND/ODER AMD3100	71
ABBILDUNG 26: AUSWACHSEN VON RMS-ZELLEN AUS DEM 3D-ZELLVERBAND IN ABHÄNGIGKEIT VON DER BEHANDLUNG MIT ZYTOSTATIKA IN AN-/ABWESENHEIT VON SDF-1A.....	73

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER MITTLEREN INHIBITORISCHEN ZYTOSTATIKAKONZENTRATION (IC50) BEI DEN RMS-ZELLEN RH30 UND RD.....	38
TABELLE 2: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER OBERFLÄCHENEXPRESSION VON CXCR4 BEI RMS-ZELLEN NACH ZYTOSTATIKA	41
TABELLE 3: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER MRNA-EXPRESSION VON CXCR4 BEI RMS-ZELLEN NACH ZYTOSTATIKA.....	43
TABELLE 4: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER ZEIT- UND KONZENTRATIONSABHÄNGIGEN BINDUNG VON AMD3100 AN CXCR4 VON RH30-ZELLEN	46
TABELLE 5: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER CXCR4 POSITIVEN RMS-ZELLEN NACH ZYTOSTATIKA UND/ODER AMD3100 GEGENÜBER DER UNBEHANDELTEN KONTROLLE	47
TABELLE 6: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER CXCR4 POSITIVEN RMS-ZELLEN NACH ZYTOSTATIKA GEGENÜBER DER KOMBINATION VON ZYTOSTATIKA MIT AMD3100.....	48
TABELLE 7: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER MRNA-EXPRESSION DER SGK3 BEI RMS-ZELLEN NACH ZYTOSTATIKA	51
TABELLE 8: TABELLARISCHE DARSTELLUNG DER BILDUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES BEI RMS-ZELLEN NACH ZYTOSTATIKA.....	60

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ARMS/RMA	Alveoläres Rhabdomyosarkom
CXCL12	CXC-Motiv Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv Chemokinrezeptor 4
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ERMS/RME	Embryonales Rhabdomyosarkom
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOXO1/ FKHR	Forkhead-Box-Protein O1
FOXO3a	Forkhead-Box-Protein O3a
GDP	Guanosindiphosphat
Ggf.	Gegebenenfalls
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	<i>Gray</i>
IRS	<i>Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group</i>
kDa	Kilo Dalton
LK	Lymphknoten
MMPs	Matrix Metalloproteinasen
min	Minuten

n	Anzahl Messreihen/Wiederholungen
n.s.	Nicht signifikant
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
nm	Nanomolar
NRF-1	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
Rb	Retinoblastom-Protein
RMS	Rhabdomyosarkom
ROS	<i>Reaktive oxygen spezies</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
RYK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SDF1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SGK	Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinasen
Sp-1	<i>Specificity protein 1</i>
Std.	Stunden
u.a.	unter anderem
vs.	versus/gegenüber
WHIM-Syndrom	Warzen-Hypogammaglobulinämie-Immundefizienz-Myelokathexis-Syndrom
7-TM-Rezeptoren	Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Das Rhabdomyosarkom

1.1.1 Epidemiologie

Weichteilsarkome repräsentieren eine sehr heterogene Gruppe verschiedener Tumorentitäten, sind mesenchymalen Ursprungs und stellen ca. 5 - 8 % aller kindlichen Tumore dar [1]. Ihre jährliche Inzidenz in Deutschland beträgt 0,9 : 100 000 [2]. Das häufigste Weichteilsarkom im Kindesalter ist das Rhabdomyosarkom (RMS) [3], welches 3 - 4 % aller kindlichen Krebserkrankungen ausmacht [4]. Beim RMS finden sich leichte geschlechtsspezifische als auch herkunftsspezifische Unterschiede. Jungen erkranken mit einem relativen Risiko-Index von 1.37 häufiger am RMS als Mädchen [3]. Europäer haben gegenüber Afroamerikanern ein relatives Risiko von 1.2 [5].

1.1.2 Ätiologie

Beim RMS weisen entartete mesenchymale Vorläuferzellen des Muskelgewebes eine regulatorische Dysfunktion auf, von der insbesondere das Wachstum und die Differenzierung betroffen sind [6]. Derzeit wird angenommen, dass die meisten Rhabdomyosarkome sporadisch auftreten [7]. Des Weiteren sind genetische Defekte an der Entstehung und Progression beteiligt. Hierbei handelt es sich u.a. um Punktmutationen, Deletionen und Amplifikationen. Betroffen ist das MET-Protoonkogen [8], das Tumorsuppressorgen p53 [9, 10], das RAS-Protein, ebenfalls ein Protoonkogen [11, 12], sowie das Retinoblastom-Protein [13]. Weitere molekularpathologische Untersuchungen der letzten Jahren zeigten eine erhöhte Expression und Sekretion des Makrophagen-Migrations-Inhibitor Faktors (*macrophage migration inhibitory factor, MIF*) [14] und die abnorme Aktivierung des Hedgehog-Signalwegs im embryonalen RMS sowie Fusionsgen-negativem alveolären RMS [15, 16]. Darüber hinaus konnte in einer Studie von 1988 bei 37 von 115 Erwachsenen und Kindern, die an einem Rhabdomyosarkom erkrankt waren, eine kongenitale Anomalie des Gastrointestinaltraktes

nachgewiesen werden [17]. Eine Assoziation zu genetischen Syndromen zeigte sich mitunter beim Rubinstein-Taybi-Syndrom [18], Costello-Syndrom [19], Neurofibromatose Typ 1 [20, 21], Li-Fraumeni-Syndrom [22], Beckwith-Wiedemann-Syndrom [23], Hereditärem-Retinoblastom sowie beim Gorlin-Goltz-Syndrom [13].

1.1.3 Histologie und Genetik

Histopathologisch unterscheidet man zwischen dem embryonalen RMS (ERMS) und dem alveolären RMS (ARMS). Das ERMS macht mit ca. 70 % den größeren Anteil aus und ist in über 80 % durch einen Verlust der Heterozygotie im Bereich des Genlokus 11p15 charakterisiert [7, 24-26]. Des Weiteren können mit dem Spindelzelltyp und dem botryoiden Subtyp nochmals zwei Untergruppen unterschieden werden [5]. ERMS sind häufig in der Kopf-/Halsregion sowie des Urogenitaltrakts lokalisiert [26].

ARMS hingegen befinden sich häufig im Bereich des Körperstamms und der Extremitäten [26]. Charakteristisch sind chromosomale Translokationen zwischen dem Chromosom 1 oder 2 und Chromosom 13, t(1;13) und t(2;13). Diese Translokationen führen zu sogenannten Fusionsgenen. Bekannt sind hierbei die Gene PAX3 (Chromosom 2) sowie PAX7 (Chromosom 1), die jeweils mit dem Transkriptionsfaktor FKHR (FOXO1) fusionieren. Dies führt zur Entstehung von PAX3-FKHR (75%) sowie PAX7-FKHR (10%) [6, 27]. Die daraus resultierende vermehrte Aktivität von PAX führt zu einer vermehrten Dedifferenzierung und Proliferation von myogenen Zellen [28, 29]. Fusionsgene kommen in der Mehrzahl der ARMS vor [30, 31]. Fusionsgen-negative ARMS sind molekular und klinisch schwer von ERMS zu unterscheiden [29, 32, 33]. Generell metastasieren ERMS und Fusionsgen-negative ARMS seltener und weisen eine günstigere Prognose als die Fusionsgen-positiven ARMS [33]. Weitere Daten zeigen darüber hinaus, dass auch innerhalb der Translokations-positiven ARMS hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit unterschieden werden kann. So scheinen PAX3-FKHR ARMS prognostisch ungünstiger zu sein [30, 34].

1.1.4 Stadien-/Risikoeinteilung

Derzeit existiert noch keine international einheitliche Risikogruppierung. Gemäß der Risikoeinschätzung der Cooperativen Weichteilsarkom Studiengruppe [35], der Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (GPOH) werden lokalisierte RMS nach Histologie, Postchirurgischem Stadium (IRS-Stadium), Lymphknotenstatus, Tumorgröße und Patientenalter in 4 Risikogruppen und insgesamt 8 Untergruppen unterteilt [35]. Die 4 Risikogruppen werden hierbei als „Niedrig-, Standard-, Hoch- und Sehr hohes Risiko Gruppe“ klassifiziert. Diese Eingruppierung basiert auf den Ergebnissen der CWS-96 Studie und den vorläufigen Untersuchungen der *International Society for Paediatric Oncology (SIOP)* [35-37]. Da sich diese Risikostratifizierung auf lokale RMS-artige Tumoren bezieht, muss noch ergänzend das IRS Stadium IV genannt werden, welches als Stadium mit „Fernmetastasierung bei Erkrankungsbeginn“ oder „Befall nicht mehr regionärer Lymphknoten nachweisbar“ definiert ist [35].

1.1.5 Klinische Symptomatik und Diagnostik

Häufig präsentieren sich RMS als asymptomatische Schwellung. Insgesamt ist deren klinische Symptomatik jedoch von der Lage und Ausdehnung des Tumors abhängig und damit äußerst variabel und unspezifisch [5].

Die initiale Diagnostik stützt sich im Besonderen auf Faktoren, die zur Risikostratifizierung notwendig sind. Zu diesen zählen Anamnese, klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren, Laborparameter, die Immunhistochemie, sowie molekularbiologische Untersuchungen zum Nachweis tumorspezifischer Gene und Gentranslokationen [35, 38].

1.1.6 Therapie

Bei der Behandlung des RMS kommt ein multimodales Therapiekonzept bestehend aus Chemotherapie, chirurgischer Resektion und/oder Strahlentherapie zum Einsatz. In Anlehnung an die CWS-Studie wird die Therapie des RMS im Wesentlichen von der Risikostratifizierung wie in 1.1.4 bereits beschrieben.

1.1.6.1 Chemotherapie

Grundsätzlich erhalten alle Patienten/-innen, in Abhängigkeit der Risikostratifizierung, eine Kombination aus mehreren Zytostatika. Hierzu zählen Anthrazykline, Actinomycine, Alkaloide sowie Alkylanzien [5, 26, 35]. In der „Niedrig-Risiko-Gruppe“ wird mit Actinomycin D und Vincristin behandelt. In der „Standard-Risikogruppe“ setzen sich die Therapieblöcke aus Ifosfamid, Actinomycin D und Vincristin zusammen. Bei der „Hoch-Risiko-Gruppe“ bzw. „Sehr-Hohes-Risiko-Gruppe“ kommen zusätzlich Ifosfamid, Adriamycin (Doxorubicin) und Vincristin zum Einsatz. Im Anschluss daran erfolgt in der Regel die lokale Resektion und in Abhängigkeit der Risikogruppe weitere Behandlungszyklen mit Zytostatika [35].

Patienten, bei denen nach 3 Chemotherapie-Blöcken das Tumolvolumen zugenommen hat, unverändert ist oder noch > 50 % des Ausgangsvolumens beträgt, werden definitionsgemäß als „*Non-Responder*“ bezeichnet. Hierbei kommt eine sogenannte *Second-Line*-Therapie zum Einsatz. Diese beinhaltet Caboplatin, Topotecan, Cyclophosphamid und VP16 [35]. Patienten bei denen schon primär eine Metastasierung vorliegt (IRS-Stadium IV, TNM-Status M1) werden nach einem eigenen Protokoll für primär metastasierte Weichteilsarkome der GPOH behandelt [35].

1.1.6.2 Strahlentherapie

Im Allgemeinen ist die die Entscheidung zur Strahlentherapie abhängig von Histologie, Alter, IRS-Stadium, Chemotherapieresponse, Tumorausdehnung sowie Lymphknotenstatus [35, 39]. Zunächst sollte stets eine primäre Bestrahlung mit 32 Gy erfolgen. Lediglich bei möglicher R0-Resektion kann auf diese verzichtet werden. Bei lymphknotenpositiven Primärtumoren erfolgt die Bestrahlung mit wenigen Ausnahmen nach dem gleichen Schema. Bei Primärtumoren mit positiven Lymphknoten und ungünstiger Histologie wird eine Strahlendosis von 44,8 Gy eingesetzt. Bei Kindern unter 3 Jahren sollte die maximale Strahlendosis von 32 Gy nicht überschritten werden. Innerhalb des 1 Lebensjahres ist keine Radiotherapie vorgesehen [35, 39, 40].

1.1.6.3 Chirurgische Resektion

Neben der Chemotherapie und Bestrahlung nimmt die Chirurgie eine entscheidende Rolle in der Diagnostik und anschließenden Therapie des RMS ein. Die primäre Biopsie ist hierbei obligat. Ein großes Problem bei der chirurgischen Therapie ist jedoch Tumorgewebe von gesundem Gewebe abzugrenzen. Die Operation soll in der Regel nicht verstümmelnd durchgeführt werden. Um eine vollständige Resektion zu erreichen, sowie ein Rezidiv zu verhindern ist dies jedoch leider vereinzelt notwendig [40]. Derzeit werden neue Verfahren untersucht um die intraoperative Tumorvisualisierung zu verbessern [41, 42].

1.1.7 Prognose

Die Prognose beim RMS hängt von verschiedenen Faktoren ab [37]. Als günstige Faktoren sind das embryonale RMS und der botryoide Subtyp, eine Tumorgröße ≤ 5 cm, fehlender Lymphknotenbefall, günstige Tumorlokalisation, fehlende Metastasen zum Diagnosezeitpunkt, Alter > 1 und < 10 Jahre sowie eine komplette chirurgische Tumorentfernung zum Diagnosezeitpunkt zu nennen [37, 43-46]. Auch die rezidivfreie Zeit scheint eine wichtige Rolle zu spielen [44]. Diese Faktoren sind fester Bestandteil der Risikogruppierung. Somit erlaubt eine adäquate Risikostratifizierung zum Diagnosezeitpunkt eine Aussage über die Prognose, bestimmt das therapeutische Vorgehen und hat somit maßgeblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf [43, 45].

Unter der multimodalen Therapie hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten Jahrzehnten deutlich erhöht [47]. Insbesondere bei lokalisierter Erkrankung konnte damit ein Anstieg der Überlebensraten von 25 % auf über 70 %, bei paratestikulärer Lokalisation auf über 90 % erreicht werden [48, 49]. Die Prognose fortgeschrittener, metastasierter Tumorstadien hat sich in den letzten Jahren jedoch nicht wesentlich verbessert [50, 51]. Ungefähr 20 % sind bereits zum Zeitpunkt der Diagnose von Fernmetastasen betroffen. Die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Kinder liegt trotz optimaler Behandlungsstrategie bei lediglich 20 - 30 % [51, 52]. Insbesondere Kinder > 10 Jahre mit Knochen- und oder Knochenmarksmetastasen haben mit 5 % eine besonders schlechte

Prognose [52]. Die Rezidivrate von Patienten mit ursprünglich lokalisiertem RMS liegt ca. 1,5 Jahre nach Erstdiagnose bei etwa 29 % [37]. Diese Daten verdeutlichen, dass die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten insbesondere bei fortgeschrittenen/metastasierten Tumorstadien trotz intensiver Bemühungen limitiert sind, so dass die Etablierung neuer Therapieverfahren dringend erforderlich ist.

1.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren

1.2.1 Chemokine

Chemokine sind chemotaktische Zytokine und besitzen eine Größe von 8 - 14 kDa [53]. Aktuell sind 50 Chemokine und 20 Chemokinrezeptoren bekannt [54]. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Organentwicklung sowie der Reifung, Homöostase und Funktion des Immunsystems [53]. Insbesondere hierbei die Auslösung von Chemotaxis bei Immunzellen. Darüber hinaus sind sie aber auch an der Angiogenese und Metastasierung von Tumoren beteiligt [53-56]. Über den entsprechenden G-protein-gekoppelten Rezeptor an der Zellmembran lösen sie durch eine Konformationsänderung des Rezeptors intrazelluläre Signalkaskaden aus. Dabei muss erwähnt werden, dass mehrere Chemokine an ein und demselben Rezeptor binden und somit ihre Funktion ausführen können [57]. Ein Beispiel hierfür ist der *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), auch als CXC Motiv-Chemokin 12 (CXCL12) bezeichnet, welcher als Ligand sowohl am CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4), als auch CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7 (CXCR7) seine Wirkung entfalten kann [54].

Entsprechend der Anzahl und Position der konservierten Cysteinreste werden vier Gruppen unterschieden: CXC, CC, C und CX3C [58]. Des Weiteren erfolgt eine funktionelle Unterteilung in homöostatische und inflammatorische Chemokine [59]. Die meisten Chemokine sind inflammatorische Zytokine, deren Produktion durch Entzündungsmediatoren wie den Tumornekrosefaktor und Interferon- γ bei Infektionen oder Traumata ausgelöst werden und die Immunzellen zum Entzündungsort rekrutieren [60, 61]. Homöostatische Chemokine, auch als konstitutive Chemokine bezeichnet, werden in wenigen

Gewebe des Körpers kontinuierlich produziert und sind für die Chemotaxis und somit für die Interaktion verschiedener Organsysteme notwendig [60]. Abhängig ob physiologische oder pathologische Bedingungen vorherrschen, fallen jedoch auch manche Chemokine in beide Kategorien [54].

1.2.2 Chemokinrezeptoren

Die bis dato 20 bekannten Chemokinrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Da sie aus Untereinheiten mit sieben transmembranären Helixstrukturen bestehen, welche außerhalb durch Peptidschleifen verbunden sind, werden Sie auch als Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren (7-TM-Rezeptoren) bezeichnet [54]. Das heterotrimere G-Protein setzt sich im inaktivierten Zustand aus einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammen. In diesem Zustand ist Guanosindiphosphat (GDP) an die α -Untereinheit intrazellulär gebunden. Durch die extrazelluläre Bindung von Chemokinen an den passenden Chemokinrezeptor kommt es intrazellulär, durch die Konformationsänderung des Rezeptors, zum Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP). Hierbei wird die α -Untereinheit von der β - und γ -Untereinheit abgespalten. Über diese können nun nachgeschaltete Signalwege induziert werden [54, 60].

1.2.3 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4

Ein wichtiger Vertreter der Chemokinrezeptoren ist der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, welcher aus 352 Aminosäuren aufgebaut ist. CXCR4 wird auf verschiedenen Zellen, u.a. des blutbildenden Systems, exprimiert und spielt eine tragende Rolle bei der Organentwicklung, Hämatopoese und Immunantwort [56]. Sein Ligand SDF-1 wird insbesondere im Knochenmark, den Lymphknoten sowie den muskulären-/pulmonalen Fibroblasten gebildet und sezerniert [62, 63]. Weitere Bildungs- und Sekretionsorte sind die Lunge, Anteile des zentralen Nervensystems sowie Leber- und Nierenzellen [64, 65]. Von SDF-1 existieren neben den funktionell bedeutsamen Isoformen α und β [66] auch noch weitere *Splice*-Varianten, deren funktionelle Bedeutung

allerdings noch weitestgehend unbekannt ist [67]. Nach Bindung von Rezeptor und Ligand kommt es über die Aktivierung von CXCR4 zur Regulation von Transkription, Zellmigration und Zelladhäsion. Hierbei sind im Besonderen die intrazellulären Signalkaskaden JAK/STAT, p38 und ERK zu nennen [68, 69].

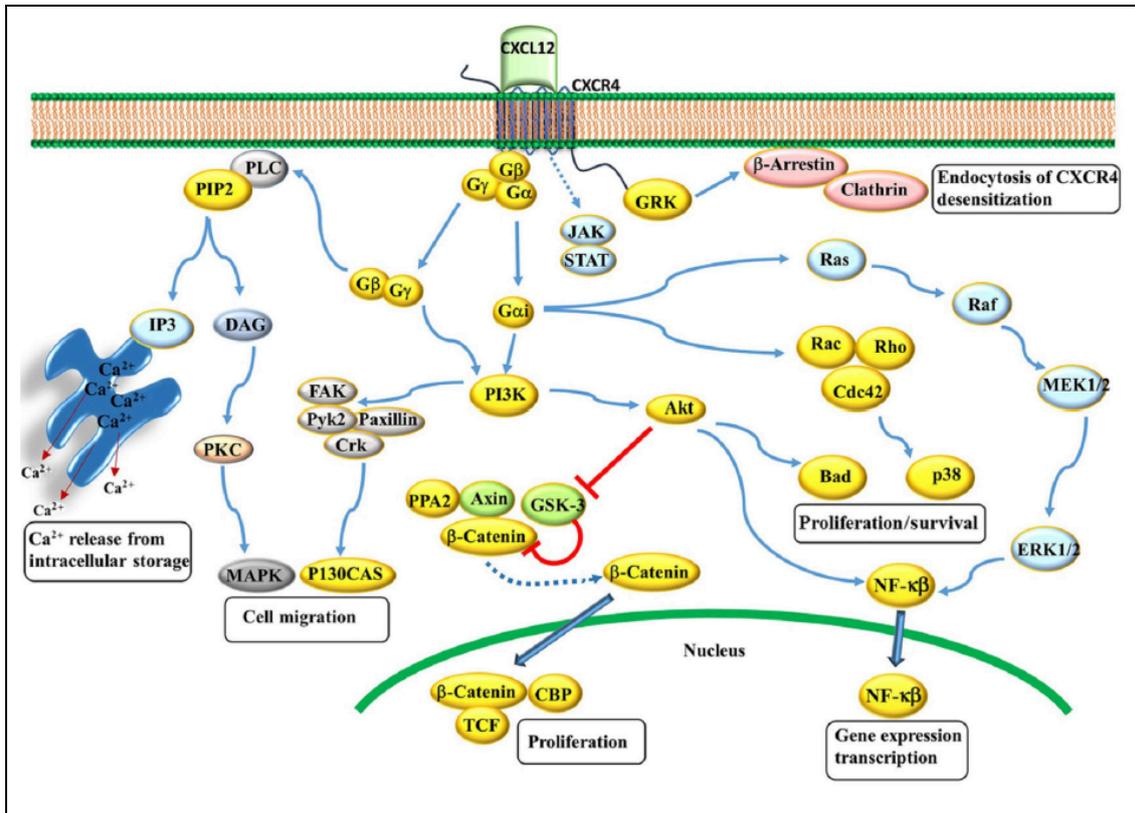


Abbildung 1: Komponenten des Chemokin-Chemokinrezeptor-4/SDF-1 Signalwegs

Eine Bindung von SDF-1 (CXCL12) an den CXCR4-Rezeptor führt zur Aktivierung von verschiedenen Chemokinvermittelten Signalmolekülen welche u.a. Einfluss auf die Proliferation, Migration, Genexpression und den Calcium Einstrom nehmen. Modifiziert nach Chatterjee et al. 2014 [70].

Neben den genannten physiologischen Funktionen ist CXCR4 in der Infektiologie sowie bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems maßgeblich in pathologische Prozesse involviert. Hierbei zu nennen ist die Funktion als Co-Rezeptor des HI-Virus [71] sowie die mutationsbedingte Dauerstimulation beim WHIM-Syndrom. Da hierdurch Migrations- sowie Homingprozesse der T-Zellen gestört werden, führt dies zu einer T-Zell abhängigen Immunschwäche [72]. Des Weiteren spielt CXCR4 auch bei der Rekrutierung von Immunzellen beim allergischen Asthma, der rheumatoiden Arthritis, sowie beim systemischen

Lupus erythematosus eine Rolle [73].

Insbesondere in der Tumorummunologie geriet CXCR4 in den letzten Jahren immer weiter in den wissenschaftlichen Fokus [70]. Eine Überexpression fand sich in über 23 Tumorentitäten, wie mitunter dem Mammakarzinom, Prostatakarzinom und Neuroblastom [70]. Somit stellt CXCR4 den am häufigsten auf Tumorzellen exprimierten Chemokinrezeptor dar [74]. Maßgeblich ist er dabei an Prozessen wie Migration/Metastasierung, Wachstum und Angiogenese beteiligt [68, 73, 75, 76]. Wie in der Abbildung 2 gezeigt, sind hiervon insbesondere Gewebe mit einer hohen SDF-1/CXCL12-Freisetzung, wie z.B. Lunge, Leber, Lymphknoten und Knochenmark betroffen [62, 63]. Ferner führt SDF-1/CXCL12 zu einer vermehrten Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMPs), welche durch Ihre proteolytische Aktivität eine entscheidende Rolle in der Invasion von Tumorzellen spielen [77].

Bei Rhabdomyosarkomen findet sich, insbesondere beim aggressiveren alveolären Subtyp, eine deutliche erhöhte Expression von CXCR4 [78, 79]. Auch hier scheint CXCR4 vorwiegend an der Metastasierung in die Lymphknoten und des Knochenmarks, sowie der Vaskularisation und Adhäsion im Tumorgewebe beteiligt zu sein [79-81]. Gemäß einer translationalen Untersuchung von Diomedes-Camassei 2008 korreliert eine hohe CXCR4-Expression im RMS mit einer ungünstigeren Lage des Primärtumors, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Knochenmarkbefall und verringertem ereignisfreiem Gesamtüberleben [82].

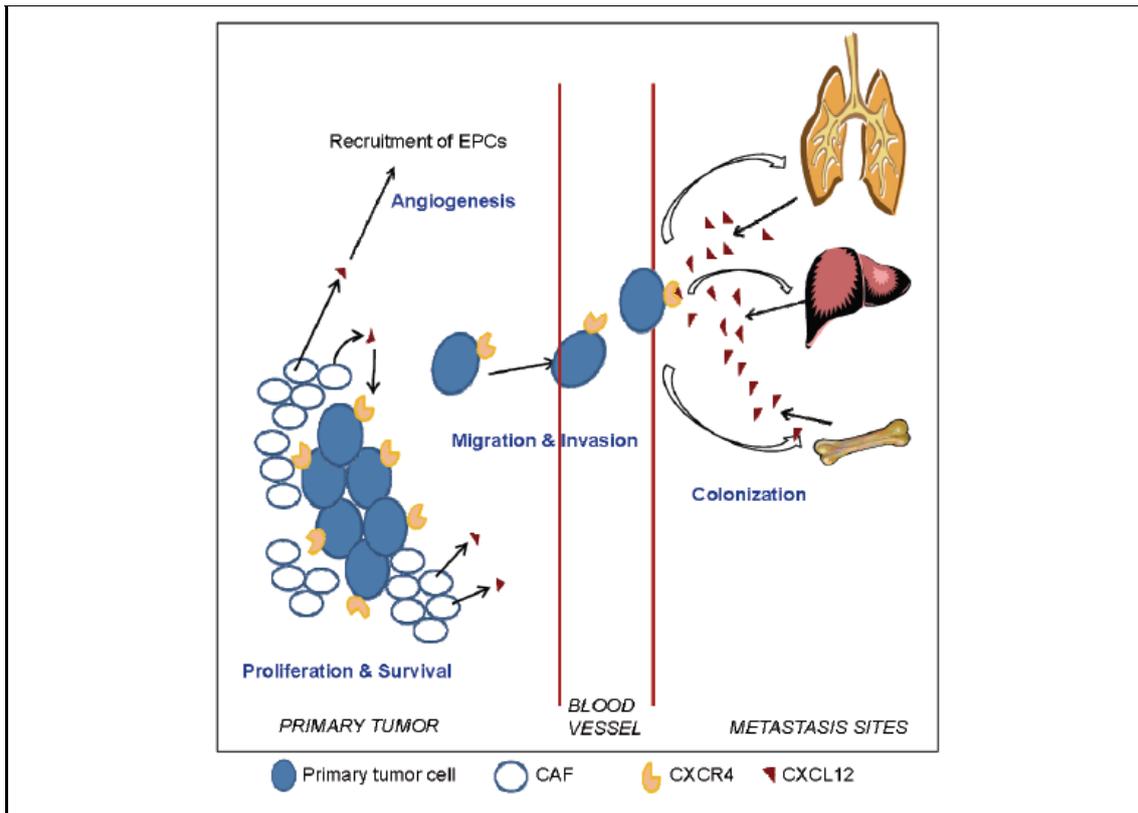


Abbildung 2: Die Rolle der CXCR4/SDF-1-Achse in der Migration (Metastasierung), Angiogenese und Invasion am Beispiel von Brustkrebszellen

Die Sekretion von CXCL12/SDF-1 durch CAF (*cancer-associated fibroblasts*) und Myofibroblasten führen lokal zur Proliferation und über endotheliale Vorläuferzellen zur verstärkten Angiogenese. Darüber hinaus gelangen CXCR4-exprimierende Tumorzellen über das Gefäßsystem zu Organen mit hoher CXCL12 Sekretion (Hier am Beispiel der Lunge, des Knochenmarks und der Leber). Diese sind somit maßgeblich an der Metastasierung beteiligt. Modifiziert nach Mukherjee et al. 2013 [83].

1.3 Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinasen

1.3.1 Isoformen

Die Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinasen (SGK) gehören zur Familie der Serin-/Threonin-Kinasen. Mit der SGK1 und den in der Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne eng verwandten SGK2 und SGK3 sind bis dato drei SGK bekannt [84-86]. Unterschieden werden können alle drei SGK im N-terminalen Teil der C-terminalen katalytischen Domäne. Dieser Teil ist bei der SGK2 aus 98 Aminosäuren und bei der SGK3 aus 162 Aminosäuren aufgebaut [87].

1.3.2 Funktion, Expression und Aktivierung

Im Allgemeinen sind SGK an der Regulation von Transportproteinen, Ionenpumpen/-kanälen, Transkriptionsfaktoren sowie Enzymen beteiligt und haben somit Einfluss auf das Zellwachstum, die Apoptose, die Migration sowie den Ionen- und Nährstofftransport [88, 89]. Bei der SGK1 und SGK3 zeigt sich ein ubiquitäres Expressionsmuster, wohingegen die SGK2 nur in der Leber, dem Pankreas, der Niere und vereinzelt auch im Gehirn nennenswert vorzukommen scheint [84, 90]. Das Induktionsverhalten scheint im Allgemeinen abhängig vom Zelltyp und der jeweiligen Isoformen zu sein [86, 88]. Eine PI3-Kinasen-abhängige Aktivierung ist jedoch für alle Isoformen beschrieben. Durch diese wird auch die Homologie, insbesondere in der katalytischen Domäne, zur Familie der AKT-Proteine deutlich [89, 91].

1.3.3 SGK3 im Tumorgewebe und der Einfluss auf CXCR4

In Tumorzellen führen Mutationen und Amplifikation der Rezeptor-Tyrosinkinasen (RYK), sowie RAS, PIK3Ca und PTEN zu einer gesteigerten Aktivität des oben angesprochenen PI3K-Signalwegs [92]. Dadurch kommt es mitunter zu einer gesteigerten Proliferation, Angiogenese sowie Motilität von Tumorzellen [93-96]. Neben AKT, einer Serin/Threonin-Proteinkinase, scheinen die SGK als Effektor dieses Signalwegs in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus zu rücken. So konnte Sommer et al. 2013 bei Brustkrebszelllinien, welche eine Resistenz gegenüber einer selektiven AKT-Inhibition aufwiesen, eine vermehrte Expression der SGK1 zeigen [97]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass über den PI3-K-Signalweg sowohl PDK1, als auch die SGK3 aktiviert werden [98]. SGK3 phosphoryliert ihrerseits die E3 Ubiquitin Ligase AIP4. Die Funktion von AIP4, durch Ubiquitinierung den Abbau von CXCR4 über die Endosomen in den Lysosomen auszulösen, wird gehemmt. Dies resultiert in einer vermehrten Expression von CXCR4 an der Plasmamembran [98, 99].

1.4 Eingesetzte Substanzen und ihre Pharmakodynamik

1.4.1 Zytostatika

Für die anstehenden Versuche wurden Zytostatika ausgewählt, die gemäß des CWS-Studienprotokolls bei der Behandlung des RMS eingesetzt werden.

Doxorubicin zählt zur Substanzklasse der Anthrazykline und kommt insbesondere bei soliden Tumoren, Lymphomen und Leukämien zum Einsatz. Über die Interkalation führt Doxorubicin zur Hemmung der RNA- und DNA-Polymerasen, aber auch von Helicasen und Topoisomerasen. Darüber hinaus entstehen Hydroxyl-Radikale, welche ihrerseits zu DNA-Strangbrüchen führen [100]. Bei der Behandlung des kindlichen RMS wird Doxorubicin erst in der Gruppe „Hohes-Risiko“ eingesetzt [35].

Vincristin zählt zu den Vinca-Alkaloiden und hemmt die Polymerisation von Tubulin und damit die Ausbildung von Mikrotubuli. Somit hat Vincristin einen hemmenden Einfluss auf den intrazellulären Stofftransport, die Mitose und den Erhalt der Zellform [100, 101]. Gemäß der Risikostratifizierung der CWS-2002 P Studie [35] kommt Vincristin bei der Behandlung des kindlichen RMS in allen Risikogruppen zum Einsatz.

Carboplatin stammt aus der Gruppe der Platin-Verbindungen und kommt vorwiegend bei soliden Tumoren zum Einsatz. Die zytotoxische Wirkung beruht auf einer Quervernetzung der ansonsten getrennt vorliegenden Einzel- und Doppelstränge der DNA [100]. Gemäß der Risikostratifizierung kommt Carboplatin bei der Behandlung des kindlichen RMS in der Therapie der „Non-Responder“ und als „Second-Line Therapie“ zum Einsatz [35].

Dactinomycin (Actinomycin D) hemmt in niedrigen Dosen die DNA-abhängige RNA-Synthese durch Interkalation der Guanin-Nukleotide der DNA [100, 102]. Bei höherer Dosierung wird auch die RNA-Replikation gehemmt. Da Dactinomycin besonders in der S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv ist, wird von einer Hemmung der Topoisomerase II ausgegangen [100, 102]. Bei der Behandlung des kindlichen RMS kommt Dactinomycin in allen Risikogruppen zum Einsatz [35].

Zum Vergleich der substanzabhängigen Wirkung wurde auch die Wirkung von

Paclitaxel untersucht. Dieses gehört zur Gruppe der Taxane und hemmt die Depolymerisation der Mikrotubuli. Damit verhindert Paclitaxel den Abbau der Mitosespindel sowie die Trennung der Chromosomen [100]. In der Behandlung des RMS findet es keine Verwendung.

1.4.2 AMD3100/Plerixafor

AMD3100/Plerixafor ist ein spezifischer Antagonist von CXCR4. Über eine reversible Bindung führt er zur Hemmung von SDF-1 α vermittelten intrazellulären Signalkaskaden wie in Abbildung 1 dargestellt [103, 104]. Ursprünglich wurde Plerixafor 1994 durch die Wirksamkeit in der HIV-Therapie bekannt [105]. Später erfolgte die klinische Zulassung in der Kombination mit Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Wachstumsfaktoren (*G-CSF*) für die Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen, im Vorfeld einer autologen Stammzellentransplantation beim Multiplen Myelom und Non-Hodgkin-Lymphom durch die *Food and Drug Administration (FDA)* und *European Medicines Agency (EMA)* [106]. Die Verträglichkeit wurde u.a. in einer Phase I Dosis Studie mit gesunden Probanden untersucht. Häufigste Nebenwirkungen (> 1 von 10 Patienten) sind demnach Durchfall, Übelkeit und Reaktionen an der Injektionsstelle [107]. Klinische Phase I/II Studien zeigten in der Kombination von Chemotherapie und Plerixafor positive Auswirkungen auf die Remission bei AML Patienten [108]. Zum Einsatz bei Kindern existieren nur wenige Daten. Im Jahr 2013 untersuchte man bei fünf an soliden Tumoren erkrankten Kindern die Mobilisierungspotenz im Vorfeld einer autologen Stammzelltransplantation. Hierbei führte die einmalige Gabe von Plerixafor zu einer schnelleren Stammzellmobilisation als bei Erwachsenen und zeigte dabei keinerlei Nebenwirkungen [109]. In einer Phase 1 Studie am *St. Jude Children's Research Hospital* in Memphis, wurde im Zeitraum von 2010 - 2012 Plerixafor bei 12 Kindern (Medianes Alter 9 Jahre) die an einem leukämischen Rezidiv litten, im Rahmen einer zweiten allogenen Stammzelltransplantation eingesetzt [110]. Kombiniert wurde Plerixafor u.a. mit Fludarabin, Thiotepa sowie Melphalan. Es zeigte sich eine gute Verträglichkeit. Trotz der schlechten Prognose waren im Jahr 2014 noch ein Drittel der Patienten am Leben, wobei

die Hälfte keine Anzeichen eines Rezidivs aufwiesen [110]. Weitere Einsatzgebiete, wie mitunter die Kombination von Chemotherapie plus G-CSF und Plerixafor sind Gegenstand aktueller Untersuchungen [111].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die multimodale Therapie des RMS hat in den vergangenen Dekaden bei lokalisierter Erkrankung zu gesteigerten Überlebensraten geführt, wobei sich die Prognose fortgeschrittener Tumorstadien den letzten Jahren hierdurch nicht wesentlich verbessert hat.

Es gibt Hinweise, dass eine hohe CXCR4-Expression im RMS mit einer ungünstigeren Lage des Primärtumors, fortgeschrittenem Stadium, Knochenmarkbefall und verringertem ereignisfreiem Gesamtüberleben korreliert. Ferner spielt der CX-Chemokin-Rezeptor-4 Signalweg beim RMS eine wichtige Rolle in der Angiogenese und der Vaskularisation des Tumorgewebes sowie der Metastasierung. Darüber hinaus wurde auch der pro-metastatische Einfluss von Zytostatika durch die Induktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bereits beschrieben.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit besteht daher in der Identifizierung von neuen Therapiestrategien, insbesondere für die fortgeschrittenen Tumorstadien. Folgende Fragestellungen stehen hierbei im Vordergrund der Bearbeitung:

- Haben die gängigen Chemotherapeutika in der Behandlung des RMS einen modulatorischen Einfluss auf die Expression von CXCR4?
- Stellt eine Inhibition des CXCR4-Rezeptors in Kombination mit der Chemotherapie eine neue/erweiterte Therapiestrategie bei der Behandlung des RMS dar?
- Inwiefern spielt SGK3 bei der Expression von CXCR4 bei RMS-Zellen eine Rolle?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die Experimente wurden Rhabdomyosarkom Zelllinien vom embryonalen (RD) sowie vom alveolären Typ (RH30) verwendet. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um adhärenz wachsende Zellen.

Die Zelllinie RH30 (DSMZ, Braunschweig) wurde ursprünglich aus der Knochenmetastase eines 16-jährigen Jungen mit undifferenziertem alveolärem Rhabdomyosarkom isoliert. Molekulargenetisch zeichnet sich diese als Träger einer p53 Mutation, sowie einer Translokation $t(2;13)(q35;q14)$, Pax3/FKHR aus [112-114].

Die Zelllinie RD (ATCC, Manassas, USA) entstammt einer Biopsie aus dem Beckenbereich eines 7-jährigen Mädchens mit Rezidiv. Molekulargenetisch sind hierbei u.a. eine Amplifikation im Transkriptionsfaktor MYC und eine Mutation des NRAS-Gen bekannt [115].

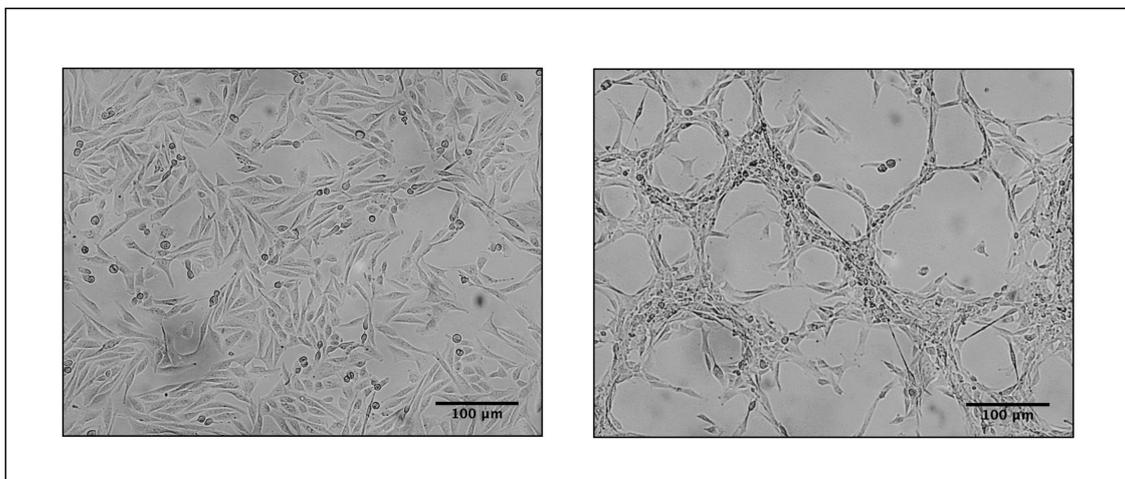


Abbildung 3: Aufnahme der Zelllinien (links) RH30 (ARMS) und (rechts) RD (ERMS)

2.1.2 Geräte/Hilfsmittel

Sofern nicht gesondert benannt, befindet sich der Firmensitz der Hersteller in Deutschland.

Brutschrank BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Durchflusszytometer FACS Canto II	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine	Scotsman, Ipswich, Großbritannien
GeneAmp PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Inverses Mikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamera AxioCam MR colour	Carl Zeiss, Oberkochen
Kamera Canon EOS 550D	Canon GmbH, Krefeld
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Lichtmikroskop Fluovert FS	Leitz GmbH, Wetzlar
LOGIC Shaker	NeoLab Migge Laborbedarf, Leonberg
Magnetrührer Ikamog RH	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikrozentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Molsheim, Frankreich
Multipipette (Multipipette Xstream)	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Spectrophotometer NanoDrop2000	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Photometer (BioPhotometer D30)	Eppendorf AG, Hamburg
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph Instruments Labortechnik, Schwabach
Pipettierhilfe Pipetboy acu Integra	Bioscience AG, Chur, Schweiz
Präzisionswaage LP2200	Sartorius, Göttingen
Real-Time PCR Detection CFX96	Bio-Rad Laboratories, München

Sterilbank (Msc-Advantage)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Stickstofftank CryoSystem 4000Chart	MVE BioMedical, Ball Ground, USA
Taschenrechner (Casio HS-8VER)	Casio, Norderstedt
Thermo-Schüttler PHMT SC20	Grant Instruments, Cambridgeshire, Großbritannien
Vortex-Schüttler VF2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Wasserbad Typ 1003	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Mini Spin	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.3 Programme/Software

Adobe Reader, Adobe Photoshop	Adobe Systems, München
AxioVision 3.1	Carl Zeiss, Oberkochen
AxioVision Viewer 3.0	Carl Zeiss, Oberkochen
EOS Utility	Canon GmbH, Krefeld
FACSCanto II System Software	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSDiva Software Version 8.0	Becton Dickinson, Heidelberg
GraphPad Prism Version 7.00	GraphPad Software, La Jolla, USA
Office 365 Education Plus	Microsoft, München

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie 300 x 0.03 mm	Papstar, Kall
Deckgläser mikroskopisch	R. Langenbrinck, Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen
Desinfektionsspray Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Einwegpinzetten, steril	Servoprax GmbH, Wesel
Einwegskalpelle, steril	Braun, Melsungen
Entsorgungsbeutel, PP autoklavierbar	BRAND GmbH und Co KG, Wertheim
FACS-Röhrchen (5 ml Rundboden)	Corning Incorporated, New York, USA
Falcon-Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen mit Filter (peqGOLD SafeGuard 1000 µl)	Peqlab, Wilmington, USA
Gefrierbehälter (5100 Cryo Mr.Frosty)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Handschuhe Peha-soft nitrile white	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kryoröhrchen Cryo.s	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mediumfilter (Milipore PLUS 0.22 µm)	Biochrom GmbH, Berlin
Mikrotiterplatten 96-Vertiefungen	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Mikrotiterplatte 96-Well Platte PCR	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer (C-Chip)	Kisker Biotech GmbH & Co.KG, Steinfurt
Objektträger SuperFrost Plus	R. Langenbrinck, Labor- u. Medizintechnik, Emmendingen
Pasteur-Kapillarpipetten 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdbR, Mainz

Pipetten (Serologische Pipette)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Pipette, Eppendorf Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (0,5 – 20 µl, Kristall E)	Ratiolab GmbH, Dreieich
Pipettenspitzen (200 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipetten mit breiter Öffnung (Pipet Tips in bulk rc 250W)	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipettenspitzen mit Filter (0,5 - 10, 10 - 100 - 1500 µl Premium Tips)	Biozym, Hessisch Oldendorf
QIAshredder (250)	Qiagen, Hilde
Reaktionsgefäße (Safe Lock, 0,5 - 2 ml)	Migge Laborbedarf, Heidelberg
Rundbodenplatte 96-Vertiefungen (mit zellabweisender Oberfläche)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Sterilfilter (Millex-GS, 0,22 µm)	Millipore Ltd., Tullagreen, Irland
Zellkulturflaschen (CellBIND 75 cm ²)	Corning incorporated, New York, USA
Zellkulturplatte (96-Well, Flachboden)	Corning incorporated, New York, USA
Zellkulturplatte (6 – 48 Well, TC- Treated)	Corning Incorporated, New York, USA
Zellkultur Einsatz 24-well, 8 µm Pore	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Zytostatika Schutzhandschuhe ZPlus	Berner, Elmshorn

2.1.5 Chemikalien, Reagenzien und Medienzusätze

2.1.5.1 Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom GmbH, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Trypanblau (0,5%)	Biochrom GmbH, Berlin
Trypsin (Trypsin/EDTA, 0.05%, Gibco)	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
10x-PBS (ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺)	Lonza Group AG, Basel, Schweiz
1x-PBS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Biochrom GmbH, Berlin

2.1.5.2 Zellviabilität

Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Thiazolylblau, Tetrazoliumbromid (MTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS) in Pelletform	Carl Roth, Karlsruhe

MTT-Reagenz*	MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) 50 ml 1x-PBS
*Berechnet für 50 ml = 5 mg/ml (250 mg in 50 ml)	

2.1.5.3 Durchflusszytometrie

CellWASH solution	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Safe	Becton Dickinson, Heidelberg
7-AAD	eBioscience Inc., San Diego, USA
2',7'-Dichlorofluorescin-Diacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.5.4 Real Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Go Taq qPCR Master Mix	Promega, Mannheim
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Real-time PCR xy SYBR Green	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.5.5 Transwell Migration Assay

Giemsa-Farbstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd reinst, DAC	Carl Roth, Karlsruhe
ProLong Antifade for Fixed Cells	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

Fixierlösung	16 g Paraformaldehyd / 400 ml 1x-PBS
Färbelösung (1:10)	Giemsa-Farbstoff / filtriertes und steriles H ₂ O ₂

2.1.5.6 Mikrometastasenmodell mit Tumorsphäroiden

Poly-L-Lysin 0.1mg/ml (MW 300.000)	Biochrom GmbH, Berlin
------------------------------------	-----------------------

2.1.6 Medien, Lösungen und Puffer

2.1.6.1 Zellkultur

Zellkulturmedium	88 % DMEM 10 % FKS 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium	80 % DMEM 10 % FKS 10 % DMSO

2.1.6.2 Zellviabilität

Lysis Puffer*	9.94 ml DMSO 0.06 ml Essigsäure 1 g SDS Pellets
*Jeweils für 10 ml Gesamtvolumen berechnet	

2.1.6.3 RNA Isolierung

RLT-Puffer*	9,9 ml RLT 100 µl DTT
*Ansatz für 10 ml	

2.1.7 Antikörper und Primer

2.1.7.1 Durchflusszytometrie

Antikörper	Spezies, Klon	Fluorochrom	Bezugsquelle
CXCR4	Mouse anti human/ CD184 clone 12G5 (RUO)	APC	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.7.2 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

PCR-Primer		Bezugsquelle
CXCR4	forward 5'-GGTTCCTTCATGGAGTCATAGTC-3' reverse 5'-CGGTTACCATGGAGGGGATC-3'	Eurofins Scientific, Luxemburg
SGK3	forward 5'-CTTCTTGCAAAACGGAAACTGGATG-3' reverse 5'-CCCCTCCATTAACAAAATCCAGAAC-3'	Eurofins Scientific, Luxemburg
TBP	forward 5'-GCCCGAAACGCCGAATAT-3' reverse 5'-CCGTGGTTCGTGGCTCTC-3'	Eurofins Scientific, Luxemburg

2.1.8 Zytostatika

Zytostatika (Konzentration)	Bezugsquelle
Vincristin (1000 µg/ml)	Universitätsklinikum Tübingen, Apotheke
Doxorubicin (2000 µg/ml)	Universitätsklinikum Tübingen, Apotheke
Dactinomycin (500 µg/ml)	Universitätsklinikum Tübingen, Apotheke
Carboplatin (10 000 µg/ml)	Universitätsklinikum Tübingen, Apotheke
Paclitaxel (10 000 µg/ml)	Enzo Life Sciences AG, Lausen, Schweiz

2.1.9 Inhibitoren und Liganden

Inhibitor	Bezugsquelle
AMD3100/Plerixafor (Octahydrochloride hydrate ≥97% (NMR), solid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chemokin	Bezugsquelle
SDF-1alpha (recombinant human stromal cell-derived factor-1 alpha)	Immunotools, Friesoythe

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Rhabdomyosarkom-Zelllinien

Für die Routinekultur wurden die RMS-Zellen in T75 Flaschen mit 14 ml Zellkulturmedium bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die Zellpassage erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 80 %. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 ml 1x-PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C vom Flaschenboden enzymatisch abgelöst. Gestoppt wurde diese Reaktion mit 4 ml Zellkulturmedium. Von dieser Verdünnung im Verhältnis 1:5 wurde 1 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 13 ml frischem Zellkulturmedium weiter kultiviert.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer durch Auszählen der Einzelzellen unter dem Mikroskop. Trypanblau, ein anionischer Diazofarbstoff, dringt dabei ausschließlich in Zellen mit geschädigter Membran ein und färbt zytosolische Proteine an, so dass tote Zellen tiefblau erscheinen. Lebende Zellen hingegen heben sich hell gegen den Hintergrund ab.

Hierfür wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung 1:2 verdünnt und im Anschluss die vitalen Zellen in vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl wurde dann anhand der folgenden Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl der 4 Großquadrate} : 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Für die Vorbereitung der Versuchsansätze wurde das Falcon bei 350 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit neuem Zellkulturmedium auf 1×10^6 /ml Zellen wieder aufgefüllt.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden RMS-Zellen mittels 1 ml Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst und für 5 Minuten bei 4 °C und 350 x g zentrifugiert. Jeweils 3 x 10⁶ Zellen/ml wurden in kaltem Einfriermedium (siehe 2.1.6.1) resuspendiert und davon jeweils 1 ml in bereits vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Anschließend erfolgte die Kühlung über 24 Std. auf - 80 °C in einem mit Isopropylalkohol gefüllten Gefrierbehälter. Für die längerfristige Lagerung wurden die Reaktionsgefäße in flüssigen Stickstoff bei - 196 °C überführt.

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Zunächst wurden die Reaktionsgefäße aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Im Anschluss daran wurden die RMS-Zellen in 5 ml frischem Zellkulturmedium überführt und bei 350 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Ein erneuter Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte nach 24 Stunden.

2.2.2 Zellviabilität

Die Zellviabilität kann mittels des MTT-Assays bestimmt werden. Entscheidend hierfür ist das eingesetzte MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]. Dieser membranständige Farbstoff wird durch mitochondriale Dehydrogenasen NADPH-abhängig zu blau-violetter Formazan metabolisiert. Die Menge des umgesetzten Formazans wird mittels Plattenspektralphotometer bei einer Wellenlänge von 560 nm ermittelt. Je höher die Stoffwechselaktivität/Viabilität, desto intensiver die Färbung.

Zur Vorbereitung wurden 5mg/ml MTT-Reagenz in 1x-PBS gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei - 20 °C gelagert. Nach der Zellzählung wurden jeweils 8 x 10³ RMS-Zellen in 100 µl Zellkulturmedium/Vertiefung auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte, in Abhängigkeit des Versuchsansatzes, die Behandlung mit Zytostatika. Für die Bestimmung der Viabilität wurden nach 24- bzw. 48 stündiger Inkubation 25 µl MTT-Reagenz pro Vertiefung pipettiert und die Platte

bei 37 °C für 120 min inkubiert. Um das entstandene Formazan zu lösen, wurden die Zellen anschließend mittels Lysepuffer (siehe 2.1.6.2) aufgeschlossen. Bei einer Absorption von 560 nm erfolgte die Messung im Plattenspektralphotometer.

Für die statistische Auswertung wurde zunächst der Leerwert (Substrat ohne Zellen) von den Messwerten abgezogen und dann ein Mittelwert aus 8 Ansätzen errechnet. Die Messergebnisse, zur zytostatischen Konzentrationsbestimmung im Vorfeld, wurden bei der abschließenden statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Messung verschiedener Zelleigenschaften in einer Zellsuspension auf Einzellebene. Für die Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen werden die Zellen zunächst mit Antikörpern inkubiert, an die fluoreszierende Farbstoffe (Fluorochrome) gekoppelt sind. Im Anschluss werden die Zellen im Durchflusszytometer mit Überdruck vereinzelt und können somit sequenziell an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs erfolgt durch einen Laserstrahl passender Wellenlänge. Angeregte Elektronen kehren im Anschluss daran wieder in Ihren Grundzustand zurück und senden dabei ein Fluoreszenzlicht aus. Dieses Fluoreszenzsignal (abhängig vom Fluoreszenz-markierten-Antikörper) wird von einem Detektor analysiert. Hierbei korreliert das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter, FSC*) mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (*sideward light scatter, SSC*) dient als Maß für die Granularität der Zellen [116]. Die Darstellung und Auswertung erfolgte größtenteils in einem *Dot Blot*, bei dem die Fluoreszenzintensität von unten nach oben (y-Achse) bzw. von links nach rechts (x-Achse) zunimmt [116]. In Abhängigkeit des Antikörpers wurden für die Versuche folgende Filter/Kanäle gewählt. FITC (488nm) und APC (633).

Zunächst wurden jeweils 1×10^5 Zellen/Vertiefung in einer 12-Well-Zellkulturplatte vorgelegt und für 24 Std. im Brutschrank inkubiert. Die Behandlung erfolgte in Abhängigkeit der Versuchsansätze für 1-, 12-, 24- bzw.

48 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1x-PBS gewaschen, trypsiniert und in FACS-Röhrchen überführt.

Die weiteren Schritte waren abhängig von der Fragestellung und werden im Folgenden genauer erläutert. Bei jeder Messung wurden jeweils 1×10^4 Zellen analysiert. Um negative und positive Populationen besser trennen zu können wurde aus allen Ansätzen jeweils 20 μl entnommen und dieser Ansatz ohne Antikörper als Referenz für das *Gating* verwendet.

2.2.3.1 Oberflächenexpression von CXCR4 bei RMS-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Zytostatika

Um die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 und den modulatorischen Einfluss von Chemotherapeutika untersuchen zu können, wurden die Ansätze mit Vincristin, Doxorubicin, Dactinomycin, Carboplatin oder Paxlitaxel behandelt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit (12-, 24- oder 48 Std.) erfolgte die Antikörperfärbung für 30 min bei RT im Dunkeln. Anschließend wurden alle Ansätze zweimalig mit FACS Puffer gewaschen, in 200 μl des gleichen Puffers resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die Ermittlung der Ausgangsexpression von CXCR4 erfolgte auszugsweise aus den Kontrollmessungen der nachfolgenden Expressionsversuche.

2.2.3.2 Bindungsverhalten von AMD3100 und die Kombination mit Zytostatika bei RMS-Zellen

Als CXCR4 Antagonist verhindert AMD3100 über die Blockade der Ligandbindungsstelle von CXCL12 die Aktivierung des Rezeptors (CXCR4) und der nachgeschalteten Signalkaskade. Um zu untersuchen ob durch die Behandlung mit dem CXCR4 Antagonisten AMD3100 die Bindung des Antikörpers anti-CXCR4 am CXCR4 der Zellmembran unterbunden wird erfolgte zunächst eine zeit- (1-, 24- und 48 Std.) und konzentrationsabhängige (5, 10 und 25 μM) Behandlung der RH30-Zellen mit AMD3100. Das weitere Vorgehen entsprach dem in Punkt 2.2.3/2.2.3.1.

Um darauf aufbauend das Bindungsverhalten von AMD3100 in Anwesenheit von Zytostatika untersuchen zu können, erfolgte die erste Behandlung der RMS-Zellen mit AMD3100. Nach 30 min wurde das jeweilige Chemotherapeutikum zum Ansatz hinzugegeben und für jeweils 1-, 24- und

oder 48 Std. inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem in Punkt 2.2.3/2.2.3.1.

2.2.3.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Um die Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species, ROS*) in Abhängigkeit von Chemotherapie untersuchen zu können, erfolgte zunächst die Behandlung wie in 2.2.3.1 beschrieben. 30 min vor Ende der Inkubationszeit wurde eine Kontrolle mit H₂O₂ behandelt. Diese entsprach in der Messung dann der Positivkontrolle. Zum Nachweis von ROS wurden jeweils 1 µl 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate/Well pipettiert und für weitere 30 Min. inkubiert. Danach wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und zweimalig mit DMEM gewaschen sowie zentrifugiert. Kurz vor der Messung wurde zur Unterscheidung lebender und toter Zellen 5 µl 7-AAD für 15 Minuten pipettiert.

2.2.4 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Die Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dient zur Amplifikation sowie Quantifizierung von Nukleinsäuren. Hierzu werden zunächst die beiden Desoxyribonukleinsäuren (*deoxyribonucleic acid, DNA*) - Stränge denaturiert und somit aufgetrennt. Über die anschließende Hybridisierung können die Primer an die nun getrennt vorliegenden DNA-Stränge, entsprechend ihrer Zielsequenz, komplementär binden. Im nächsten Schritt erfolgt die sogenannte Verlängerung. Durch die DNA-Polymerase katalysiert, werden beginnend am 3' Ende des Primers, die fehlenden Nukleotide aufgefüllt. Hierdurch entsteht ein neuer DNA-Strang. Die Detektion der PCR Amplifikation erfolgt mittels sequenzunspezifischem SyBR Green. Das Signal ist hierbei proportional zum PCR-Produkt [117, 118]. Am Ende der Amplifizierung wird zur Produktidentifizierung eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Die notwendigen Schritte werden im Folgenden nochmals genauer erläutert.

2.2.4.1 RNA Isolation

Zunächst wurden 5 x 10⁵ RH30- und RD Zellen in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät, für 24 Std. im Brutschrank inkubiert und im Anschluss, in

Abhängigkeit des Ansatzes, mit Zytostatika behandelt. Nach weiteren 24 Std. wurden die Ansätze zweimalig mit 1x-PBS gewaschen, abzentrifugiert und das Pellet in 350 µl RLT/DTT Puffer lysiert. Das Lysat wurde zur Homogenisierung in QIAshredder Säulen überführt und bei 14000 *rpm.*, 4 ° C für 2 min zentrifugiert. Das resultierende Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C weggefroren oder direkt für die RNA Extraktion eingesetzt. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels *Rneasy Mini Kit* nach Herstellerangaben.

2.2.4.2 Bestimmung der RNA Konzentration

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm im Nanodrop Spektrophotometer bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer RNA Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient der Absorption A260 nm/A280 nm sollte für RNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Abweichende Werte weisen mitunter auf Verunreinigungen mit Proteinen hin.

2.2.4.3 cDNA Synthese

Das Umschreiben der RNA-Proben in cDNA (komplementäre DANN) erfolgte durch das *High capacity cDNA Reverse Transcription Kit* gemäß dem Herstellerprotokoll von *Thermo Fisher Scientific*. Katalysiert wird die Synthese dabei durch eine Reverse Transkriptase. In die Reaktion wurde 1 µg RNA eingesetzt.

Thermocycler

Programm:	Dauer (in min)	Grad (in °C)
1	10	25
2	120	37
3	5	85
4		4

2x Master Mix (20 µl/Reaktion)	1 x in µl
10x RT Puffer	2
25x dNTP Mix (100mM)	0.8
10x Random Hexamer Primer	2
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
Rnase Inhibitor	1
Nuclease-freies H ₂ O	3.2
Gesamt	10
cDNA RT Reaktion (20µl/ Reaktion)	
2x RT Master Mix	10
RNA	10
Gesamt	20

2.2.4.4 RT-PCR

Für die Genexpressionsanalyse durch die RT-PCR wurden im Anschluss jeweils 50 ng cDNA in 18 µl Go Taq Mastemix eingesetzt. Die finale *forward* und *reverse Primer* Konzentration betrug je 0.5 µM. Je Probe wurden 18,0 µl Mix + 2 µl cDNA/H₂O (50 ng) eingesetzt.

Laufbedingungen	Dauer	Grad
Denaturierung	5 min	95 °C
	15 s	95 °C
Anlagerung der Primer	30 s	60 °C
Verlängerung	30 s	72 °C

Die relative Quantifizierung und Berechnung der Genexpression erfolgte nach Livak 2001 und Pfaffl 2004 [119, 120]. Hierbei wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten

Referenzgens (*housekeeping gene*), bei unseren Messungen *Tbp* (*TATA box binding protein*), bezogen und aus den Delta C_t -Werten beider Gruppen anschließend der Delta-Delta C_t -Wert gebildet [121]. Um den Expressionsunterschied zwischen den unbehandelten und den behandelten Zellen zu ermitteln, wird dieser Wert anschließend in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ eingesetzt ($\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen}$, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ behandelte Zellen} - \Delta C_t \text{ unbehandelte Zellen}$, $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$). Der C_t -Wert entspricht dem Zeitpunkt bzw. Zyklus der PCR, in dem sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt. Je niedriger der C_t -Wert, desto mehr Kopien des Ziel-Gens sind zu Beginn in der Probe enthalten [119-121]. Wie schon im Vorfeld bei der Durchflusszytometrie, erfolgte die Ermittlung der mRNA-Menge von CXCR4 unbehandelter RMS-Zellen auszugsweise aus den Kontrollmessungen der nachfolgenden Expressionsversuche.

2.2.5 Migration

Die Fähigkeit zur Migration ist eine Voraussetzung für die Metastasierung von Tumorzellen. Mit Hilfe des Migration- (Transwell) Assay kann die Migration von Zellen in An- und Abwesenheit von Chemotherapeutika, Stimulantien und/oder Inhibitoren entlang eines chemotaktischen Gradienten untersucht werden. Um entlang des FKS/SDF-1 α Gradienten zu migrieren, müssen die Zellen durch die Poren der Membran gelangen, was aktive Veränderungen ihrer Form und damit des Zytoskeletts erfordert.

Um zu untersuchen, inwiefern die Migration von der CXCR4-Expression abhängig ist, wurde in den vorliegenden Experimenten neben fötalem Kälberserum (FKS) hierfür SDF-1 α verwendet. Die Vertiefung einer 24-well Zellkulturplatte wurde mit einem Zellkultureinsatz, der über eine Membran mit 8 μm Porengröße verfügt, in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt. Hierbei wurden die Zellen im oberen Kompartiment unter FKS-freien Bedingungen kultiviert und nur die untere Vertiefung der 24-well Platte Zellkulturmedium enthielt 10 % FKS bzw. SDF-1 α .

2.2.5.1 Migration von RMS-Zellen in Abhängigkeit der Expression von CXCR4 nach der Behandlung mit Zytostatika

Zunächst wurden 5×10^5 RMS-Zellen/Vertiefung in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit Doxorubicin oder Vincristin für 24 Std. vorbehandelt, anschließend trypsinisiert und erneut gezählt. Jeweils 2,5 (RH30) bzw. 5 (RD) $\times 10^4$ RMS-Zellen (Zellkulturmedium ohne FKS) wurden in das obere Kompartiment der Transwells überführt. In die unteren Kompartimente der 24-Well-Zellkulturplatte wurde je nach Ansatz 750 μ l Zellkulturmedium + 10 % FKS oder Zellkulturmedium + 10 % FKS +/- 300 ng/ml SDF-1 α pipettiert. Nach 24 Std. Inkubation im Brutschrank wurden die Transwells mit Hilfe einer 4 %-igen PFA Lösung für 15 min bei Raumtemperatur fixiert, mit 1x-PBS gewaschen und für 15 min mit Giemsa-Färbelösung (1:10) angefärbt. Vor der Messung wurden die Einsätze nochmals mit 1x-PBS gewaschen sowie die nicht migrierten Zellen vorsichtig vom inneren Teil der Transwell-Membran entfernt. Die Membranen wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, auf einen Objektträger überführt und die migrierten Zellen unter dem Mikroskop fotografiert (10x) und ausgezählt. Die Ermittlung der SDF-1 α abhängigen Migration von RMS-Zellen erfolgte auszugsweise aus den nachfolgenden Migrationsversuchen.

2.2.5.2 Migration von RMS-Zellen nach der Kombinationsbehandlung von AMD3100 und Zytostatika

Wie unter 2.2.5.1 beschrieben erfolgte am zweiten Tag die Vorbehandlung der Zellen mit Doxorubicin oder Vincristin, sowie AMD3100 (30 min vor dem Zytostatikum) für 24 Stunden. Nach der Überführung der RMS-Zellen in die Transwell Einsätze, wurde nun eine erneute Behandlung mit Zytostatika und/oder AMD3100 für weitere 24 Std. durchgeführt. Das weitere Vorgehen entsprach 2.2.5.1.

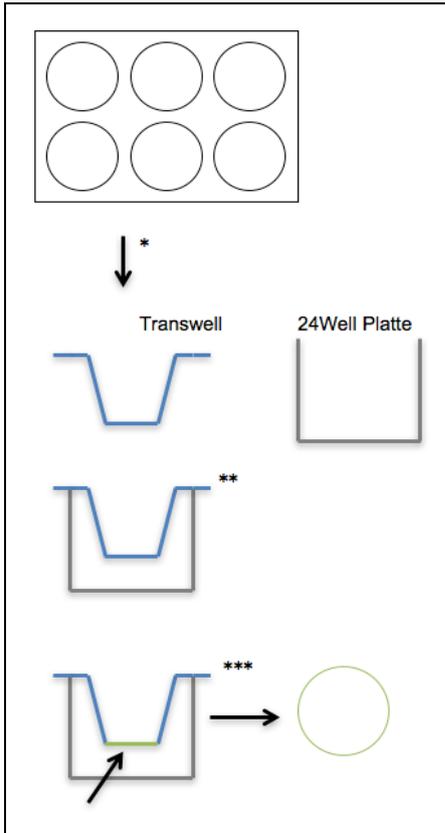


Abbildung 4: Eigene Darstellung der Migrationsversuche

1. Vorbehandlung in 6-Well-Platten für 24 Std.
2. *Überführung der Zellen in Transwell Einsätze, die dann in Platten mit 24 Vertiefungen kultiviert werden
3. **Behandlung und Inkubation für 24 Std.
4. ***Entfernung der Membran (grün) und Visualisierung unter dem Mikroskop

2.2.6 Mikrometastasenmodell

Da mit dem herkömmlichen Migration Assay nur Rückschlüsse auf das Tumorzellverhalten auf zweidimensionaler Zellebene gezogen werden können, etablierten wir ein neues dreidimensionales Verfahren in Anlehnung an bereits beschriebene Modelle [122-124].

Zur Testung der verschiedenen Substanzen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen wurden dreidimensionale (3D) Tumorsphäroide eingesetzt, welche avaskuläre Tumore, Mikrometastasen oder interkapilläre Mikroregionen eines Tumors simulieren. Das in dieser Arbeit verwendete 3D-Zellkultursystem beruht auf der Eigenschaft von Tumorzellen substratunabhängig zu wachsen und in Kultur auf zellabweisenden Oberflächen spontan kompakte Zellaggregate (Sphäroide) zu bilden [125, 126].

Für die Entwicklung der Sphäroide wurden 5×10^2 Rhabdomyosarkomzellen RD und RH30 pro Well in 100 μ l filtriertem Zellkulturmedium in eine

zellabweisende 96-Well-Rundbodenplatte pipettiert. Im Anschluss daran wurden die Platten bei 200 g für 5 min zentrifugiert und dann im Brutschrank inkubiert. Am vierten Tag erfolgte die Beschichtung von 24-Well-Platten mit Polylysin. Am fünften Tag wurde eine 96-Well-Platte mit 1x-PBS gewaschen und jeweils 2 Sphäroide vorsichtig in 200 µl filtriertem Zellkulturmedium/Well auf die beschichteten 24-Well-Platten überführt, wozu Pipetten mit extra großer Öffnung eingesetzt wurden. Im Anschluss erfolgte die Behandlung mit Zytostatika, AMD3100 (30 min vor dem Zytostatikum) in Anwesenheit von SDF-1 α (Kontrolle), in Abhängigkeit des Versuchsansatzes. Für die Bestimmung der Migration von RMS-Zellen aus dem Zellverband wurden die Platten nach 24 und 48 Std. unter dem Mikroskop fotografiert (20x). Für die Auswertung wurden jeweils fünf Messungen von der Mitte bis zur äußeren Sphäroidbegrenzung (siehe Abb. 5) durchgeführt und daraus jeweils ein Mittelwert errechnet. Die Quantifizierung erfolgte über die Bestimmung der pixel und die Angabe über µm.

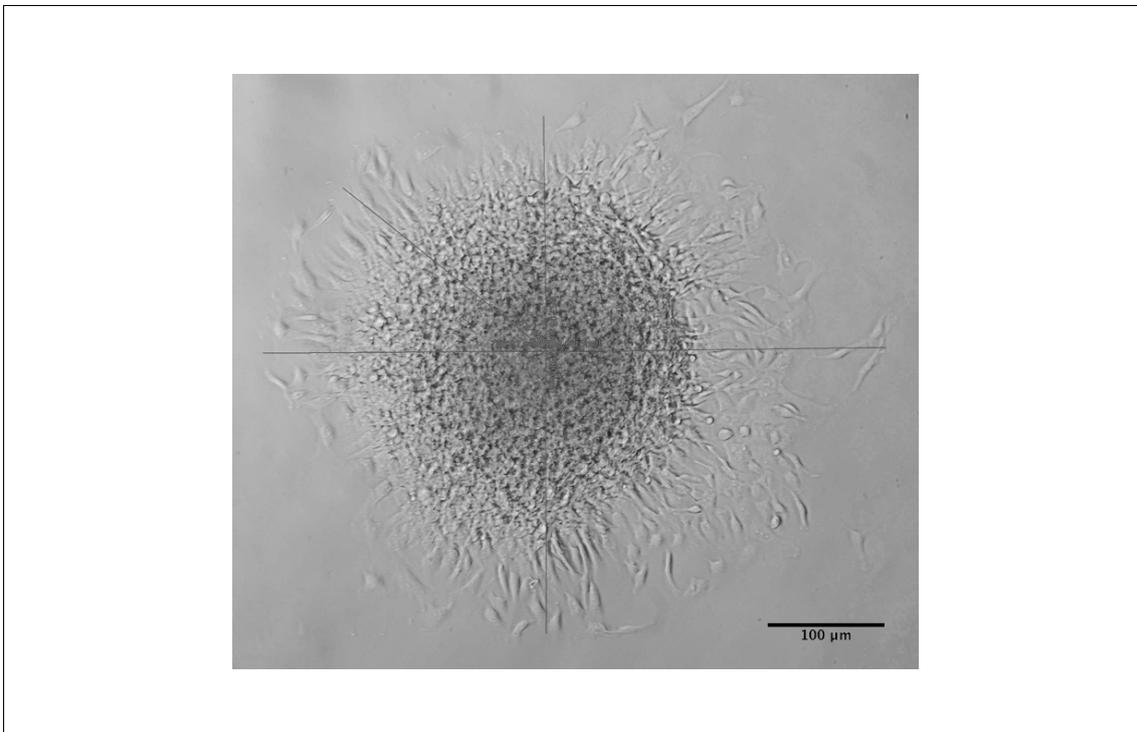


Abbildung 5: Aufnahme eines RH30-Tumorsphäroids

Beispielhafte Darstellung der Ausmessung von Tumorsphäroiden. Hierzu wurden jeweils fünf Messungen von der Mitte bis zur äußeren Begrenzung der Sphäroide durchgeführt und daraus jeweils der Mittelwert errechnet.

2.2.7 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung und Erstellung der Abbildungen erfolgte mit GraphPad Prism 7.0. Die Ergebnisse werden in Prozent (%), als Mittelwert (MW) und Standardfehler (SEM) graphisch dargestellt. Als Signifikanzniveau wurde jeweils $p < 0,05$ vorausgesetzt und wie folgt angegeben: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Allen Ergebnissen liegen mindestens drei Versuche zu Grunde, die Angabe erfolgt über Anzahl (n) in der Abbildungsbeschreibung. In Abhängigkeit der Versuchsansätze wurden die Daten zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Die Datenauswertung erfolgte über ungepaarten T-Test mit Welch-Korrektur bzw. die ein-, bei mehreren Variablen über die zweifaktorielle Varianzanalyse ANOVA. Als Testverfahren wurde i.d.R. die Bonferroni-Methode eingesetzt. Weiterführende Erläuterungen zum Testverfahren sind im Methodenteil sowie den jeweiligen Abbildungsbeschreibungen dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Viabilität und Expressionsanalysen

3.1.1 Expressionsanalyse von CXCR4 bei RMS-Zellen

Zunächst erfolgte die Bestimmung der Oberflächenexpression (Protein) und der mRNA-Menge von CXCR4 bei der RH30- (alveoläres Rhabdomyosarkom, ARMS) sowie der RD-Zelllinie (embryonales Rhabdomyosarkom, ERMS).

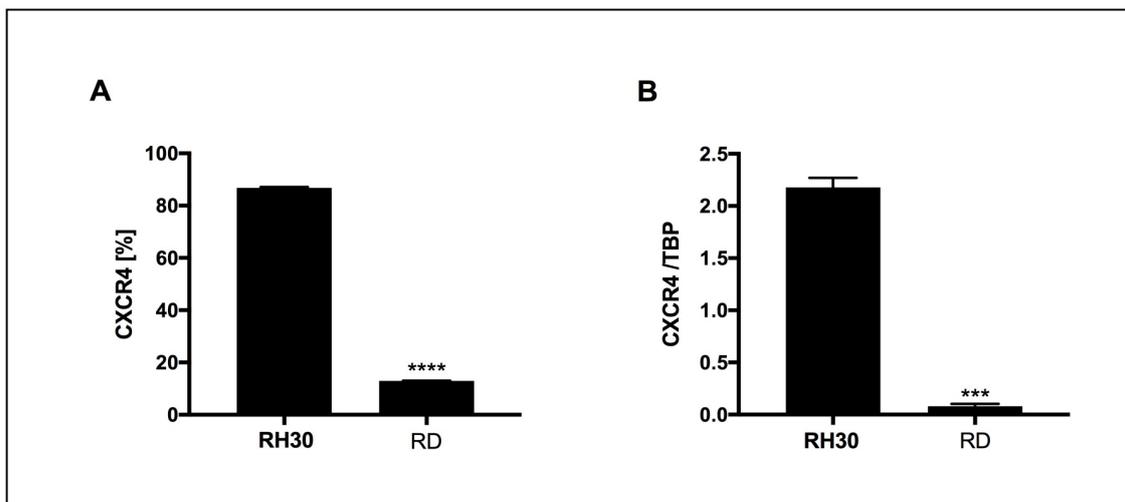


Abbildung 6: CXCR4 bei RMS-Zellen

Auszug aus Kontrollmessungen nachfolgender Expressionsversuche. (A) Oberflächenexpression von CXCR4 in der Durchflusszytometrie (%) und (B) mRNA von CXCR4 relativ zu TBP mittels RT-PCR bei RH30 und RD-Zellen (n=3). Die Auswertung erfolgte über einen ungepaarten T-Test mit Welch-Korrektur. ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001. Abbildung verändert aus Regenbogen et al., 2020 [127].

Wie in Abbildung 6 gezeigt, konnte bei beiden RMS-Zelllinien die Expression des CXCR4 Rezeptors auf der Protein- sowie auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Die Oberflächenexpression von RH30-Zellen lag mit $86,8 \pm 0,35$ % deutlich über der von RD-Zellen mit $12,97 \pm 0,03$ % [127].

3.1.2 Bestimmung der Zellviabilität und IC50 nach Behandlung mit Zytostatika

Bevor der Einfluss von Zytostatika auf die Expression von CXCR4 untersucht wurde, erfolgte zunächst die Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC50) der Zytostatika bei den Zelllinien RH30 und RD. Hierfür

wurden die RMS-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen für 24 und 48 Stunden behandelt. Die Evaluierung der Viabilität mittels MTT-Assay ergab eine signifikante Reduktion der Zellviabilität in Abhängigkeit der Konzentration der eingesetzten Zytostatika in beiden RMS-Zelllinien (siehe Abbildung 7, A-H). Für die näherungsweise Ermittlung der IC₅₀-Werte (siehe Tabelle 1) [127] wurden sigmoide Regressionskurven erstellt.

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der mittleren inhibitorischen Zytostatikakonzentration (IC₅₀) bei den RMS-Zellen RH30 und RD

	RH30 (ARMS) IC ₅₀ (24. / 48 Std.)	RD (ERMS) IC ₅₀ (24. / 48 Std.)
Doxorubicin µg/ml	0,5 / 0,08	0,42 / 0,10
Vincristin µg/ml	0,0043 / 0,0007	0,0026 / 0,0008
Dactinomycin µg/ml	0,03 / 0,005	0,04 / 0,004
Carboplatin µg/ml	239 / 91	263 / 94

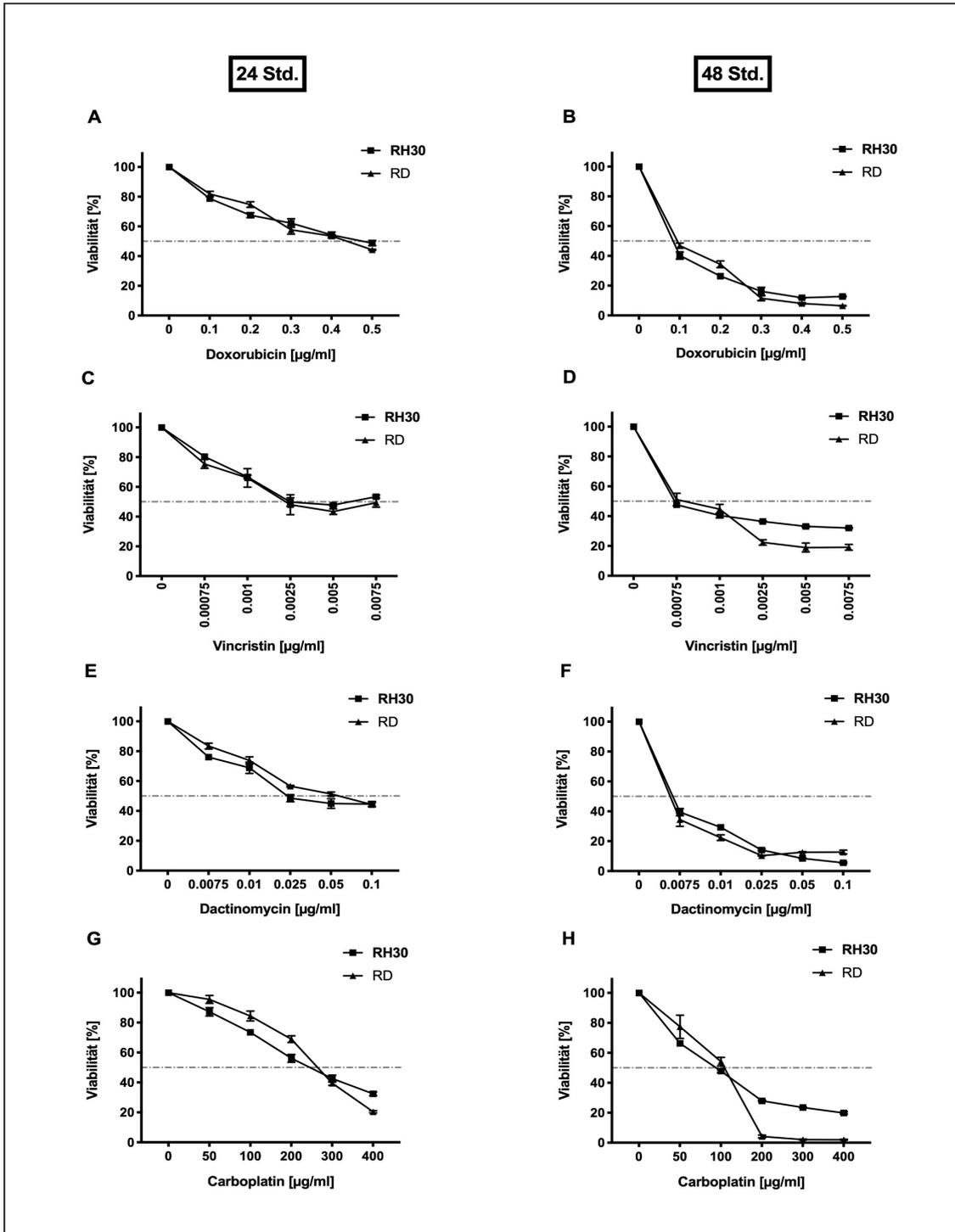


Abbildung 7: Ermittlung der Zellviabilität bei RMS-Zelllinien nach der Behandlung mit Zytostatika

Dargestellt sind Ergebnisse der MTT-Assays von RMS-Zellen nach 24 und 48 Std. Behandlung mit (A, B) Doxorubicin, (C, D) Vincristin, (E, F) Dactinomycin (n=3) und (G, H) Carboplatin (24h n=4, 48h n=3) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Behandlung). Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). Abbildung verändert aus Regenbogen et al., 2020 [127].

3.1.3 Expression von CXCR4 nach Behandlung mit Zytostatika

3.1.3.1 Oberflächenexpression von CXCR4

Aufbauend auf den Analysen der Expression und Zellviabilität wurde nun der Einfluss einer 24 stündigen Behandlung mit Zytostatika auf die Expression von CXCR4 untersucht. Die Messung erfolgte zunächst quantitativ durchflusszytometrisch. Um hierbei auch mögliche Unterschiede in Abhängigkeit der Zellviabilität deutlich zu machen, wurden zwei unterschiedliche Zytostatikakonzentrationen im Bereich von 40 – 80 % Zellviabilität verwendet. Hierbei zeigten alle Zytostatika einen Einfluss auf das Expressionsverhalten von CXCR4 auf RMS-Zellen (siehe Tabelle 2, Abb. 8, A-H).

Tabelle 2: Tabellarische Darstellung der Oberflächenexpression von CXCR4 bei RMS-Zellen nach Zytostatika

Darstellung der CXCR4-Expression auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie bei den Zelllinien RH30 und RD nach 24 Std. Behandlung mit Zytostatika. Die Prozentangaben geben die Zu- (+) oder Abnahme (-) nach zytostatischer Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (100 %) wieder.

	RH30 (ARMS) CXCR4	RD (ERMS) CXCR4
Doxorubicin 0,2 µg/ml	+ 11 %	+ 959 %
Doxorubicin 0,5 µg/ml	+ 14 %	+ 1075 %
Vincristin 0,001 µg/ml	- 27 %	- 15 % (n.s.)
Vincristin 0,0025 µg/ml	- 41 %	+ 20 % (n.s.)
Dactinomycin 0,01 µg/ml	+ 12 %	+ 167 %
Dactinomycin 0,025 µg/ml	+ 9 %	+ 105 %
Carboplatin 100 µg/ml	+ 7 % (n.s.)	
Carboplatin 200 µg/ml	- 3 % (n.s.)	+ 90 %
Carboplatin 300 µg/ml		+ 47 %

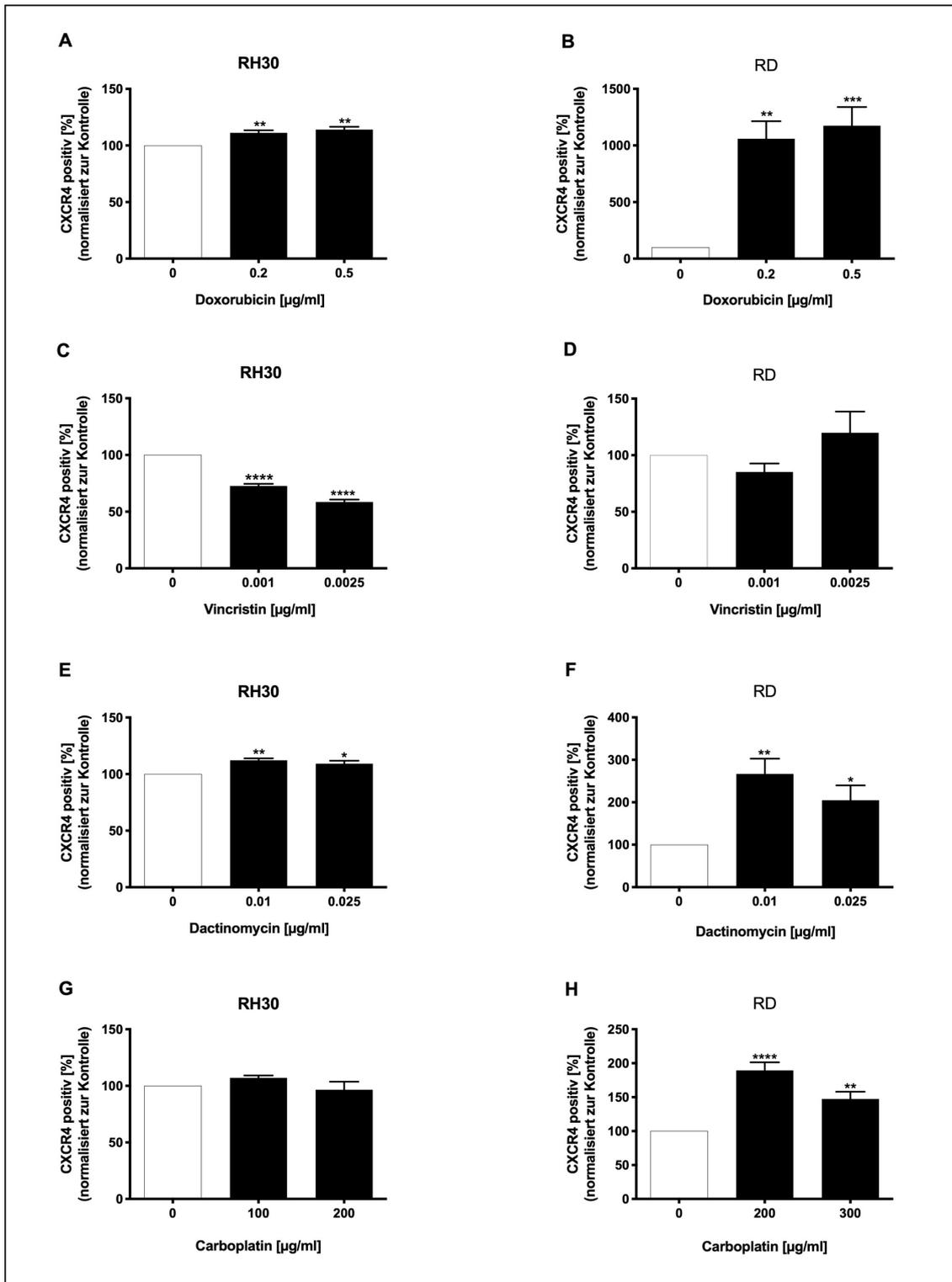


Abbildung 8: Analyse der Oberflächenexpression von CXCR4 bei RMS-Zellen nach der Behandlung mit Zytostatika

Abbildung der Expressionsmessung von CXCR4 auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie bei den Zelllinien RH30 und RD nach 24 Std. Behandlung mit (A, B) Doxorubicin (n=4), (C, D) Vincristin, (E, F) Dactinomycin und (G, H) Carboplatin (n=5). Die Kontrolle (ohne Behandlung) wurde als 100 % definiert. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001. Abbildung verändert aus Regenbogen et al., 2020 [127].

3.1.3.2 mRNA-Expression von CXCR4

Zur Bewertung der quantitativen Expressionsmessungen von CXCR4 in der Durchflusszytometrie erfolgte nun die Messung auf Transkriptionsebene (mRNA) mittels RT-PCR (siehe Tabelle 3, Abb. 9, A-H).

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der mRNA-Expression von CXCR4 bei RMS-Zellen nach Zytostatika

Darstellung der CXCR4-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR bei den Zelllinien RH30 und RD nach 24 Std. Behandlung mit Zytostatika. Die Prozentangaben geben die Zu- (+) oder Abnahme (-) nach zytostatischer Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (100 %) wieder.

	RH30 (ARMS) CXCR4 mRNA-Expression	RD (ERMS) CXCR4 mRNA-Expression
Doxorubicin 0,2 µg/ml	+ 1 %	+ 239 %
Doxorubicin 0,5 µg/ml	+ 59 %	+ 1008 %
Vincristin 0,001 µg/ml	- 35 %	- 14 % (n.s.)
Vincristin 0,0025 µg/ml	- 50 %	- 8 % (n.s.)
Dactinomycin 0,01 µg/ml	+ 4 % (n.s.)	+ 196 %
Dactinomycin 0,025 µg/ml	+ 30 %	+ 180 %
Carboplatin 100 µg/ml	- 56 %	
Carboplatin 200 µg/ml	- 72 %	+ 10 % (n.s.)
Carboplatin 300 µg/ml		- 40 %

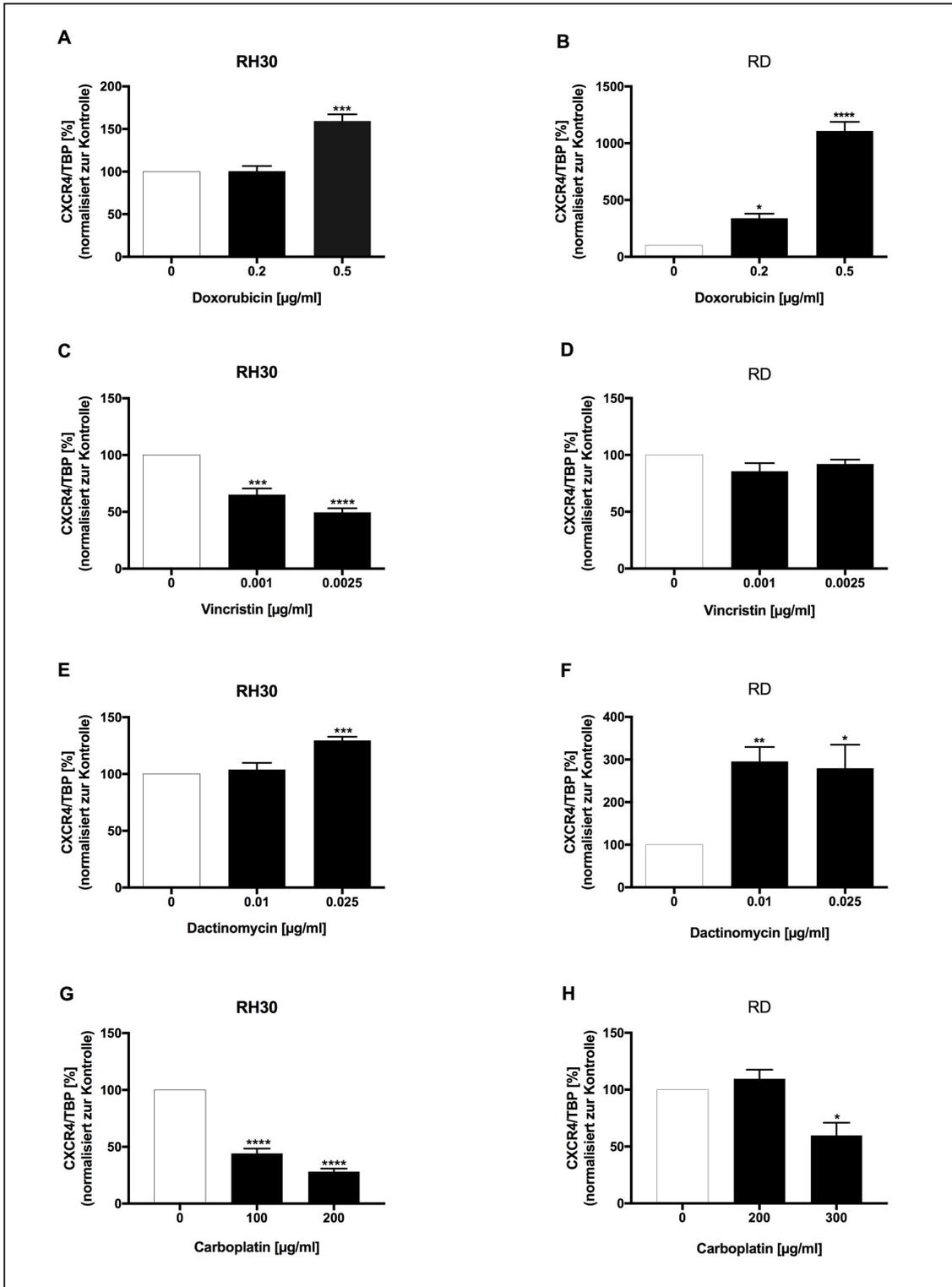


Abbildung 9: Analyse der mRNA-Expression von CXCR4 bei RMS-Zellen nach der Behandlung mit Zytostatika

Dargestellt sind Ergebnisse der CXCR4-Expression auf Transkriptionsebene mittels der RT-PCR, bei den Zelllinien RH30 und RD nach 24 Std. Behandlung mit (A, B) Doxorubicin (n=3), (C, D) Vincristin und (E, F) Dactinomycin (n=4), (G, H) Carboplatin (n=3). Die Kontrolle (ohne Behandlung) wurde als 100 % definiert. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielles Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001. Abbildung verändert aus Regenbogen et al., 2020 [127].

3.1.4 Bindungsverhalten von AMD3100 bei RH30-Zellen

Wie bereits näher erläutert sollte zunächst das Bindungsverhalten von AMD3100 auf CXCR4 von RMS-Zellen untersucht werden. Hierzu erfolgte eine zeit- und konzentrationsabhängige durchflusszytometrische Analyse. Aufgrund der hohen CXCR4-Expression wurde hierfür die RH30-Zelllinie verwendet.

Gegenüber der unbehandelten Kontrolle konnte durch die Behandlung mit AMD3100 eine signifikante, zeitabhängige Abnahme der Bindung des CXCR4 Antikörpers an den CXCR4 Rezeptor festgestellt werden (siehe Abb. 10, Tabelle 4) [127]. Beim Vergleich der Konzentrationen untereinander zeigte sich nach 24 Std. zwischen 5 μ M AMD3100 vs. 25 μ M AMD3100 ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0.05$) und nach 48 Std. bei 5 μ M AMD3100 vs. 25 μ M AMD3100 sowie 10 μ M AMD3100 vs. 25 μ M AMD3100 ($p \leq 0.01$) eine signifikante Differenz in der Bindung an CXCR4. Da die Bindung von AMD3100 nach 24 Std. bei allen untersuchten AMD3100-Konzentrationen gezeigt werden konnte, wurde mit 10 μ M AMD3100 stets die mittlere Konzentration bei den folgenden Versuchen eingesetzt.

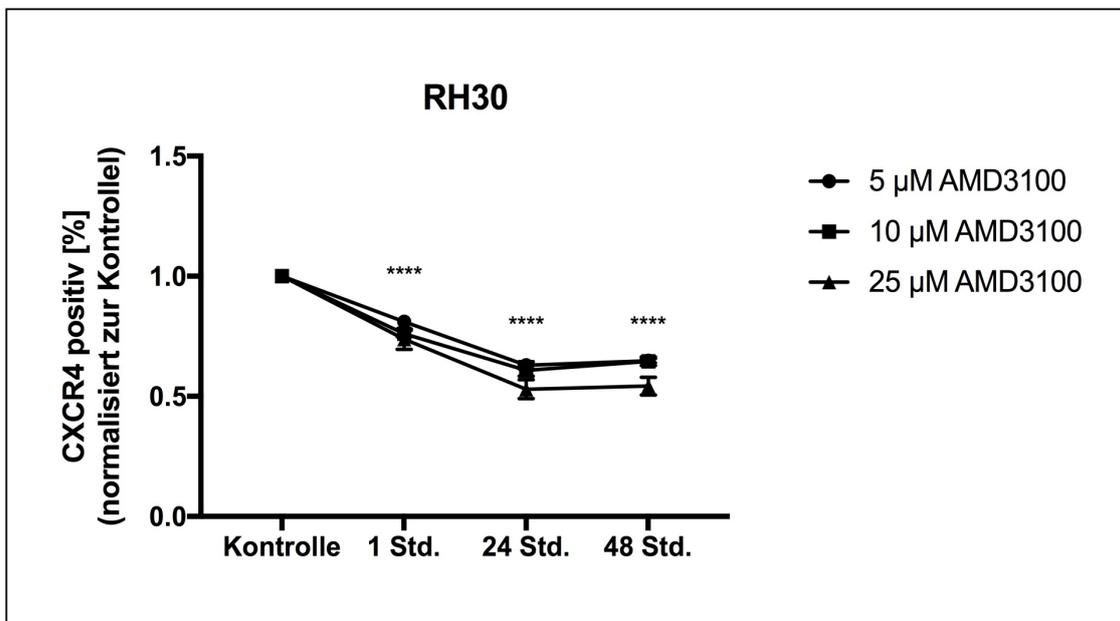


Abbildung 10: Zeit- und konzentrationsabhängige Bindung von AMD3100 an CXCR4 auf RH30-Zellen.

Die Abbildung zeigt den Vergleich der unbehandelten Kontrolle mit den AMD3100-Konzentrationen [5, 10 und 25 μ M] zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 24 und 48 Std.) bei RH30-Zellen ($n=4$). Die durchflusszytometrischen Ergebnisse wurden auf die Kontrolle normiert. Die Auswertung erfolgte über die zweifaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). **** $p \leq 0.0001$. Abbildung verändert aus Regenbogen et al., 2020 [127].

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der zeit- und konzentrationsabhängigen Bindung von AMD3100 an CXCR4 von RH30-Zellen

Angegeben ist jeweils das arithmetische Mittel von (n=4) in Prozent im Vergleich zur Kontrolle ohne Behandlung (100 %).

RH30			
Zeit/Konzentration AMD3100	5 µM	10 µM	25 µM
1 Std.	81 %	76 %	74 %
24 Std.	63 %	61 %	53 %
48 Std.	65 %	65 %	54 %

3.1.5 Bindungsverhalten von AMD3100 in Kombination mit Zytostatika

Aufbauend auf 3.1.4 wurde im Folgenden durchflusszytometrisch untersucht, inwiefern das Bindungsverhalten von AMD3100 durch die Kombination mit Zytostatika beeinflusst wird. Darüber hinaus, ob über die Modulation von CXCR4 durch Zytostatika in Kombination mit der Rezeptorblockade (CXCR4) durch den CXCR4-Antagonisten AMD3100 eine mögliche Abnahme der Expression und somit eine mögliche Aktivierung durch den Ligand SDF-1 α /CXCL12 (siehe Abb. 1) unterbunden werden kann. Für diesen Versuchsansatz wurde bei allen Zytostatika die Konzentration eingesetzt, welche in den vorangegangenen Expressionsmessungen den größten modulatorischen Einfluss auf die CXCR4-Expression gezeigt hatte. Übersichtshalber werden auch hier die Ergebnisse tabellarisch dargestellt (siehe Tabelle 5/6, Abb. 11, A-H).

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der CXCR4 positiven RMS-Zellen nach Zytostatika und/oder AMD3100 gegenüber der unbehandelten Kontrolle

Darstellung von CXCR4 (Protein) mittels Durchflusszytometrie bei den Zelllinien RH30 und RD nach 24 Std. Behandlung mit Zytostatika und/oder AMD3100. Die Prozentangaben geben die Zu- (+) oder Abnahme (-) der Oberflächenexpression gegenüber der unbehandelten Kontrolle (100 %) wieder.

	RH30 CXCR4	RD CXCR4
AMD3100 10 µM	- 50 %	- 37 % (n.s.)
Doxorubicin 0,5 µg/ml	+ 9 % (n.s.)	+ 391 %
AMD3100 + Doxorubicin	+ 1 % (n.s.)	+ 211 %
AMD3100 10 µM	- 48 %	- 34 %
Vincristin 0,025 µg/ml	- 46 %	- 25 %
AMD3100 + Vincristin	- 82 %	- 54 %
AMD3100 10 µM	- 43 %	- 28 % (n.s.)
Dactinomycin 0,01 µg/ml	+ 7 % (n.s.)	+ 82%
AMD3100 + Dactinomycin	- 29 %	+ 20 % (n.s.)
AMD3100 10 µM	- 41 %	- 7 % (n.s.)
Carboplatin 100 µg/ml	+ 0,2 % (n.s.)	
AMD3100 + Carboplatin	- 47 %	
Carboplatin 200 µg/ml		+ 54 %
AMD3100 + Carboplatin		+ 50 %

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der CXCR4 positiven RMS-Zellen nach Zytostatika gegenüber der Kombination von Zytostatika mit AMD3100

Darstellung von CXCR4 (Protein) mittels Durchflusszytometrie bei den Zelllinien RH30 und RD nach 24 Std. Behandlung mit Zytostatika und/oder AMD3100 aus Tabelle 7. Die Prozentangaben zeigen die **Abnahme (-)** der durchflusszytometrisch gemessenen Oberflächenexpression von CXCR4 gegenüber der Monotherapie mit Zytostatika.

	RH30 CXCR4	RD CXCR4
Doxorubicin 0,5 µg/ml	+ 9 % (n.s.)	+ 391 %
AMD3100 + Doxorubicin	+ 1 % (n.s.)	+ 211 %
Doxorubicin vs. Doxorubicin + AMD3100	- 8% (n.s.)	- 180 %
Vincristin 0,025 µg/ml	- 46 %	- 25 %
AMD3100 + Vincristin	- 82 %	- 54 %
Vincristin vs. Vincristin + AMD3100	- 36 %	- 30 %
Dactinomycin 0,01 µg/ml	+ 7 % (n.s.)	+ 82%
AMD3100 + Dactinomycin	- 29 %	+ 20 % (n.s.)
Dactinomycin vs. Dactinomycin + AMD3100	- 36 %	- 61 %
Carboplatin 100 µg/ml	+ 0,2 % (n.s.)	
AMD3100 + Carboplatin	- 47 %	+ 50 %
Carboplatin vs. Carboplatin + AMD3100	- 47 %	
Carboplatin 200 µg/ml		+ 54 %
AMD3100 + Carboplatin		+ 50 %
Carboplatin vs. Carboplatin + AMD3100		- 4 % (n.s.)

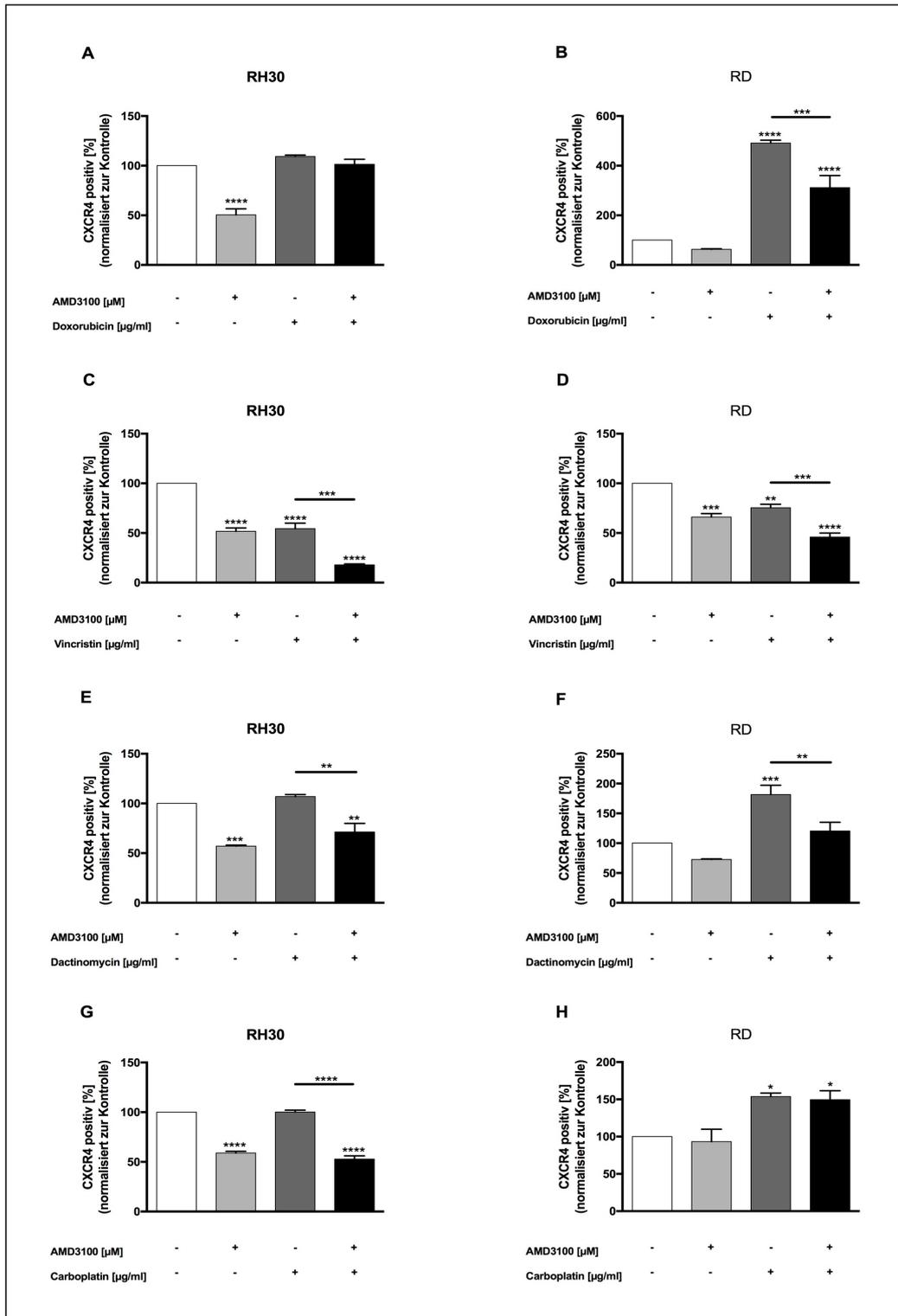


Abbildung 11: CXCR4 positive Zellen nach der Behandlung mit AMD3100 und/oder Zytostatika nach 24 Std.

Dargestellt sind Ergebnisse der quantitativen Durchflusszytometrie von CXCR4 nach Einzel- und Kombinationstherapie mit (A, B) Doxorubicin [0,5 μ g/ml], (C, D) Vincristin [0,0025 μ g/ml], (E, F) Dactinomycin [0,01 μ g/ml] und (G, H) Carboplatin [100 μ g/ml RH30 bzw. 200 μ g/ml bei RD] und/oder AMD3100 [10 μ M] für 24 Std., auf (links) RH30- und (rechts) RD-Zellen durchflusszytometrisch gemessen (n=3). Die Kontrolle (keine Behandlung) wurde als 100 % gesetzt. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle und die zytostatische Mono-/Kombinationstherapie mit AMD3100 untereinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001, ****p \leq 0,0001.

3.2 Zeitliche, pharmakologische und transkriptionelle Einflussfaktoren

Um zu untersuchen, welchen Induktionsfaktoren die CXCR4-Expression unter chemotherapeutischer Behandlung unterliegt und somit einen Hinweis auf mögliche, beteiligte Signalkaskaden zu erhalten, wurden im Folgenden zeitliche und pharmakologische Einflussfaktoren untersucht. Des Weiteren wurde die SGK3 auf transkriptioneller Ebene bestimmt.

3.2.1 Einfluss von Zytostatika auf die Expression der SGK3 mRNA

Wie im Teil 1.3 genauer erläutert hat die SGK3 neueren Erkenntnissen nach über die Hemmung von AIP4 (Ubiquitinierung von CXCR4) eine wichtige Funktion bei der Oberflächenexpression von CXCR4. Zunächst konnte die Expression der SGK3 bei beiden RMS-Zelllinien (RH30 und RD) auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden (Abb. 12). Um herauszufinden, ob Zytostatika einen Einfluss auf die Expression von SGK3 haben und somit einen möglichen Mechanismus des Expressionsverhaltens von CXCR4 unter chemotherapeutischer Behandlung zu untersuchen, wurde im Folgenden die SGK3-Expression unter simultanen Bedingungen/Versuchsansätzen wie im Vorfeld die CXCR4-Expression bestimmt (siehe Tabelle 7, Abb. 13, A-H).

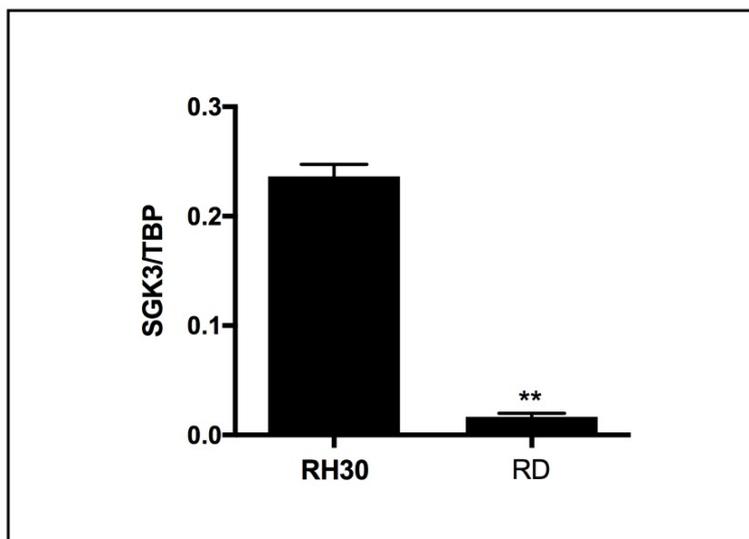


Abbildung 12: Expressionsanalyse der SGK3 bei RMS-Zellen.

Expressionsmessungen der SGK3-mRNA relativ zu TBP mittels RT-PCR bei RH30 und RD-Zellen (n=3). Die Auswertung erfolgte über einen ungepaarten T-Test mit Welch-Korrektur. **p ≤ 0.01.

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der mRNA-Expression der SGK3 bei RMS-Zellen nach Zytostatika

Darstellung der SGK3-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR bei den Zelllinien RH30 und RD nach 24 Std. Behandlung mit Zytostatika. Die Prozentangaben geben die Zu- (+) oder Abnahme (-) der mRNA-Expression nach zytostatischer Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (100 %) wieder.

	RH30 (ARMS) SGK3 mRNA-Expression	RD (ERMS) SGK3 mRNA-Expression
Doxorubicin 0,2 µg/ml	- 2 % (n.s.)	+ 207 %
Doxorubicin 0,5 µg/ml	+ 25 %	+ 492 %
Vincristin 0,001 µg/ml	- 23 %	+ 44 % (n.s.)
Vincristin 0,0025 µg/ml	- 20 %	+ 135 % (n.s.)
Dactinomycin 0,01 µg/ml	- 12 %	+ 58 % (n.s.)
Dactinomycin 0,025 µg/ml	- 49 %	+ 99 %
Carboplatin 100 µg/ml	- 30 %	
Carboplatin 200 µg/ml	- 73 %	- 69 %
Carboplatin 300 µg/ml		- 71 %

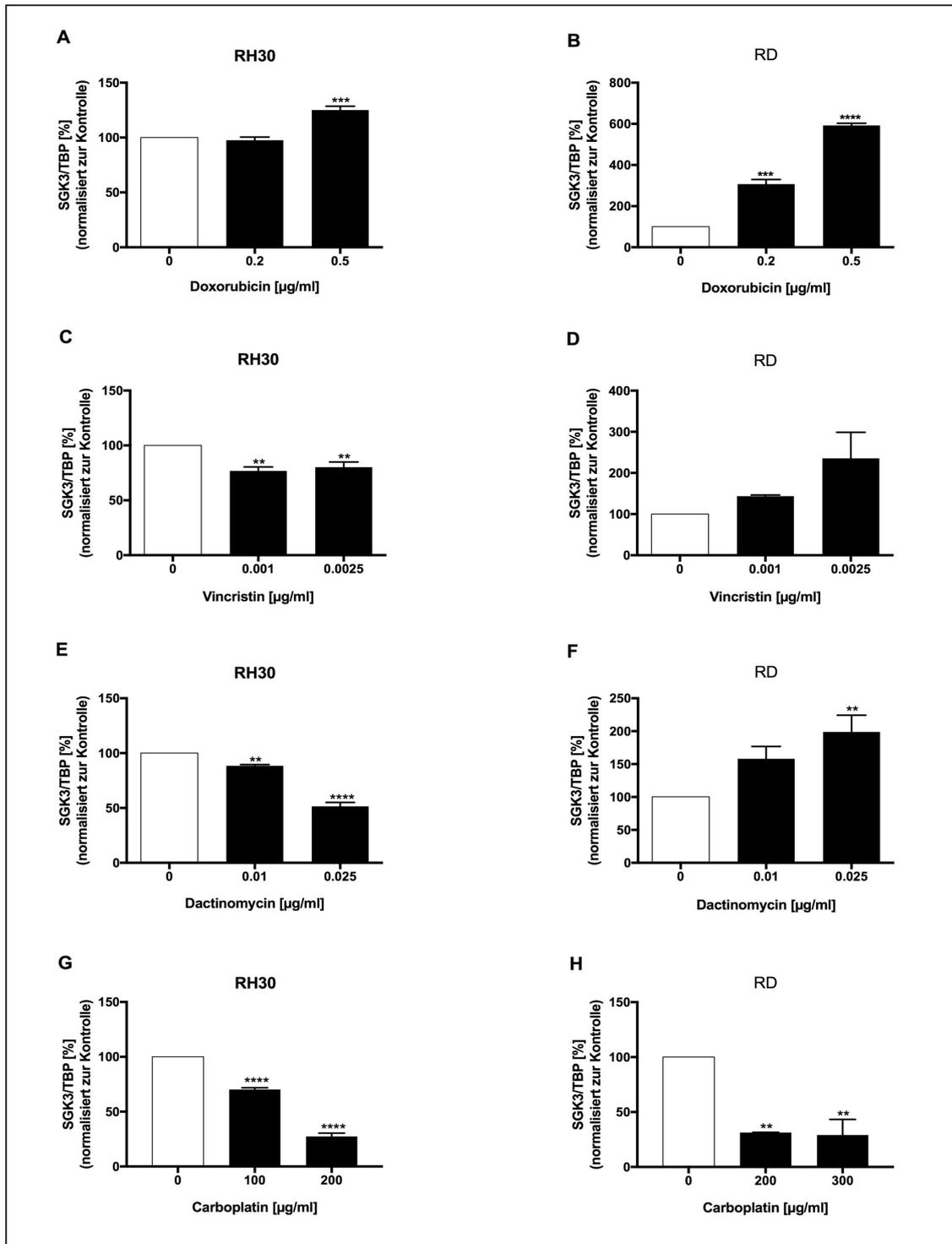


Abbildung 13: SGK3 mRNA-Expression von RMS-Zellen nach der Behandlung mit Zytostatika

Dargestellt sind Ergebnisse der SGK3-Expression auf Transkriptionsebene mittels der RT-PCR bei (links) RH30- und (rechts) RD-Zellen nach 24 Std. Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an (A, B) Doxorubicin (n=3), (C, D) Vincristin, (E, F) und Dactinomycin (n=4), (G, H), Carboplatin (n=3). Die Kontrolle (keine Behandlung) wurde als 100 % und die Messergebnisse dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorische Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, ****p ≤ 0.0001.

3.2.2 Untersuchung der zeitlichen Varianz an ausgewählten Zytostatika

Da die bisherigen Messungen von CXCR4 nur nach 24 Std. erfolgten, sollte nun auch die zeitliche Varianz durchflusszytometrisch untersucht werden. Aufgrund ihrer unterschiedlichen modulatorischen Wirkung auf die CXCR4-Expression wurden hierfür die beiden Zytostatika Doxorubicin und Vincristin eingesetzt.

3.2.2.1 Zeit- und konzentrationsabhängige Oberflächenexpression von CXCR4 nach Behandlung mit Doxorubicin und Vincristin

Bei beiden RMS-Zelllinien waren nach 12,- 24- und 48 Std. im Vergleich zum Zeitpunkt 0 (mit Ausnahme 0,5 µg/ ml 24 Std.) eine signifikante Zunahme der Oberflächenexpression von CXCR4 unter der Behandlung mit Doxorubicin zu erkennen (siehe Abb. 14. A/B). In der Vincristin-Gruppe führten nach 24 Std. die höhere und nach 48 Std. beide Konzentrationen (0,001 und 0,0025 µg/ml) bei der alveolären Zelllinie RH30 Zellen zu einer signifikanten Abnahme der CXCR4 positiven RMS-Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt 0 (siehe Abb. 14, C). Bei der embryonalen Zelllinie RD konnte lediglich nach 48 Std. eine signifikante Zunahme der Membranexpression von CXCR4 beobachtet werden (siehe Abb. 14, D).

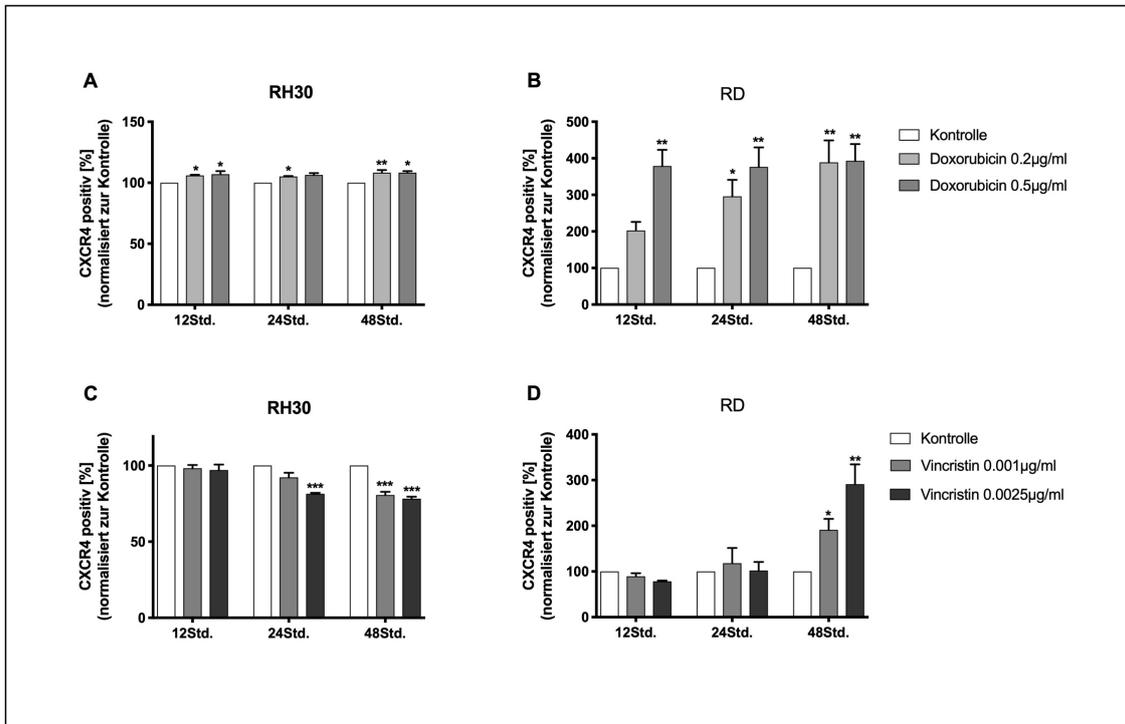


Abbildung 14: Zeit- und konzentrationsabhängige Oberflächenexpression von CXCR4 bei RMS-Zellen nach der Behandlung mit Doxorubicin oder Vincristin

Abbildung der Expressionsmessung von CXCR4 auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie bei den RMS-Zelllinien RH30 und RD nach zeit- und konzentrationsabhängiger Behandlung mit (A, B) Doxorubicin und (C, D) Vincristin (n=3). Die Kontrolle (ohne Behandlung) wurde als 100 % definiert. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorische Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001.

3.2.2.2 Bindungsverhalten von AMD3100 in Kombination mit Zytostatika nach 48 Std.

Bei RH30-Zellen konnte die Bindung des CXCR4 Antikörpers anti-CXCR4 am CXCR4 der Zellmembran durch die Monotherapie mit AMD3100 auch nach 48 Std. signifikant gesenkt werden. Im Gegensatz zu 24 Std. unter der Therapie mit Doxorubicin 0,5 µg/ml und AMD3100 10 µM (siehe Abb. 11, A), zeigte sich nach 48 Std. in der Kombination mit 0,2 µg/ml Doxorubicin und 10 µM AMD3100 eine signifikante Reduktion von CXCR4 gegenüber der alleinigen Behandlung mit Doxorubicin um 50 % (Abb. 15, A). Bei RD-Zellen sank die Expression um 156 % gegenüber der Monotherapie mit Doxorubicin, lag damit aber immer noch deutlich über der unbehandelten Kontrolle (siehe Abb. 15, B). Die Behandlung mit 0,001 µg/ml Vincristin führte bei RH30-Zellen nach 48 Std. zu einer signifikanten Abnahme von CXCR4 um 21 %. Die Kombination mit 10

μM AMD3100 zeigte, über die Abnahme der Bindung des Antikörpers anti-CXCR4 am CXCR4 Rezeptor der Zellmembran, eine signifikante Reduktion von CXCR4 gegenüber der alleinigen Behandlung mit $0.001 \mu\text{g/ml}$ Vincristin um 67 % (siehe Abb. 15, C). Bei RD-Zellen führte die Gabe von $0,001 \mu\text{g/ml}$ Vincristin nach 48 Std., wie in Abb. 16 D gezeigt, zu einer signifikanten Zunahme von CXCR4. Diese konnte in der Kombination von $0,001 \mu\text{g/ml}$ Vincristin mit $10 \mu\text{M}$ AMD3100 von 155 % um 29 % auf 126 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle gesenkt werden. Ein signifikanter Unterschied war jedoch nicht zu ermitteln.

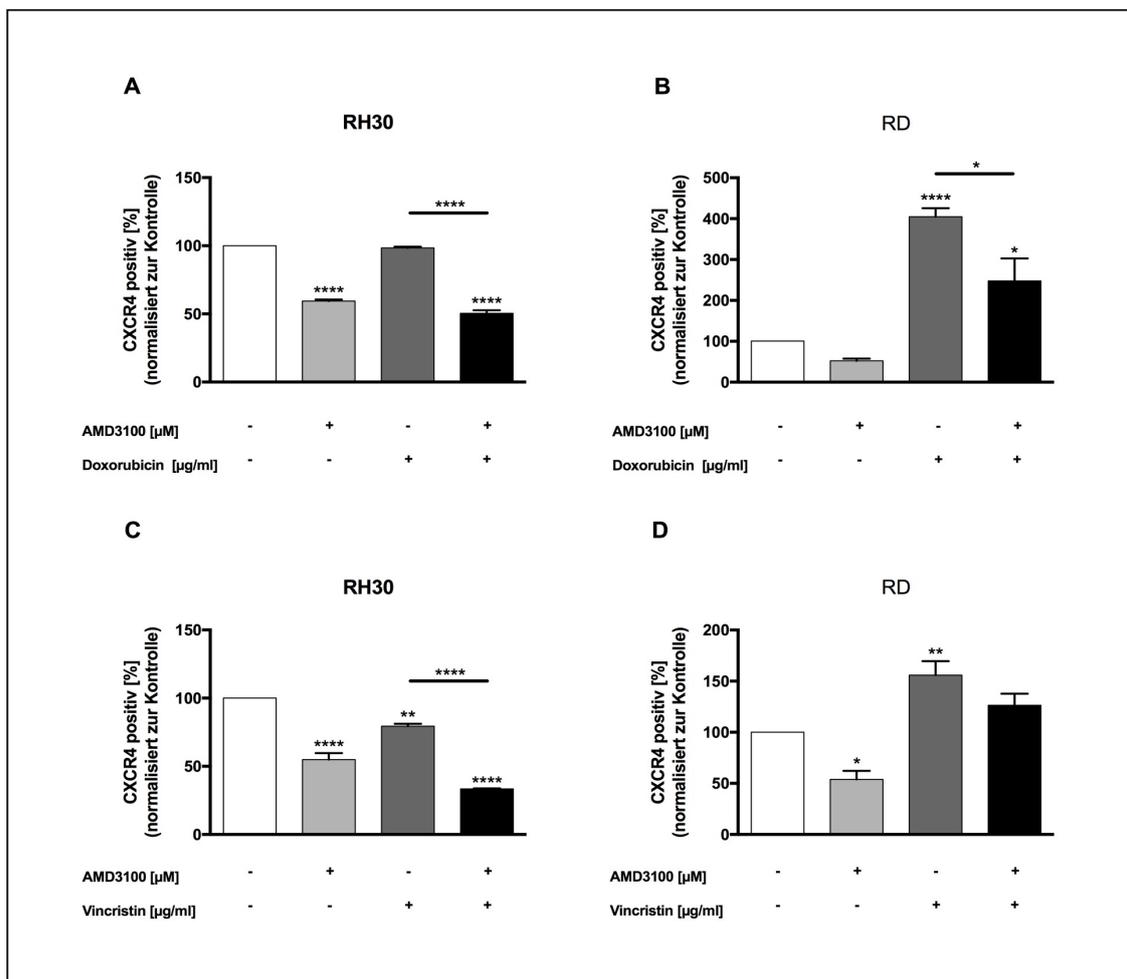


Abbildung 15: CXCR4 positive RMS-Zellen nach der Behandlung mit AMD3100 und/oder Zytostatika nach 48 Std

Dargestellt sind Ergebnisse der quantitativen Durchflusszytometrie von CXCR4 nach Einzel- und Kombinationstherapie mit (A, B) Doxorubicin [$0,2 \mu\text{g/ml}$], (C, D) Vincristin [$0,001 \mu\text{g/ml}$] und/oder AMD3100 [$10 \mu\text{M}$] für 48 Std., auf RH30- ($n=3$) und RD-Zellen ($n=4$) durchflusszytometrisch untersucht. Die Kontrolle (keine Behandlung) wurde als 100 % gesetzt. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle und die zytostatische Mono-/Kombinationstherapie mit AMD3100 untereinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

3.2.3 Untersuchung des Zusammenhangs des pharmakologischen Wirkprofils auf die CXCR4-Expression

Im Folgenden sollte exemplarisch für Vincristin untersucht werden, inwieweit die Expressionsergebnisse von CXCR4 abhängig von dessen pharmakologischer Wirkung sind. Hierzu wurde Paclitaxel verwendet, dessen Wirkung als Mitosehemmstoff in der M-Phase ähnlich zu Vincristin auf der Beeinflussung des Spindelapparats und damit auf der Veränderung der Zellstruktur beruht. Zunächst erfolgten, wie schon im Vorfeld bei Vincristin, Analysen der IC50-Werte sowie Expressionsmessungen von CXCR4.

3.2.3.1 Analyse der Zellviabilität nach Behandlung mit Paclitaxel

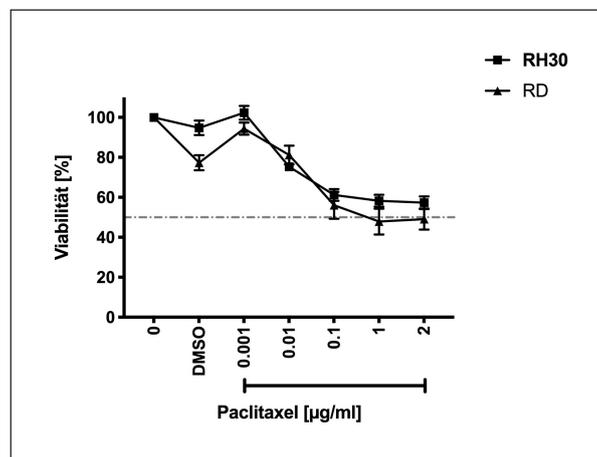


Abbildung 16: Ermittlung der IC50-Werte bei RMS-Zellen nach der Behandlung mit Paclitaxel

Dargestellt sind Ergebnisse der MTT-Assays von RH30- und RD-Zellen nach 24 Std. Behandlung mit Paclitaxel (n=5). Die Darstellung zeigt den Vergleich zur Kontrolle (ohne Behandlung). DMSO wurde entsprechend der höchsten Paclitaxel Konzentration für die Lösungsmittelkontrolle verwendet. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni) [127].

Die Evaluierung der Viabilität mittels MTT-Assay ergab eine Reduktion der Viabilität in Abhängigkeit der Konzentration von Paclitaxel (siehe Abb. 16). Nach 24 Std. betrug die IC50 von RD-Zellen näherungsweise 0,4 µg/ml, die Viabilität von RH30-Zellen lag nach 24 stündiger Behandlung stets über der IC50.

3.2.3.2 Expression von CXCR4 nach Behandlung mit Paclitaxel

Auch bei Paclitaxel wurde die CXCR4-Expression nach 24 Std.

durchflusszytometrisch und mittels RT-PCR untersucht. Um mögliche Unterschiede in Abhängigkeit der Zellviabilität deutlich zu machen, wurden hierzu zwei unterschiedliche Konzentrationen von Paclitaxel im Bereich von 40 - 80 % Zellviabilität nach 24 Std. verwendet. Bei RH30-Zellen 0,01 und 1 µg/ml und bei RD-Zellen 0,01 und 0,1 µg/ml Paclitaxel. Die Lösungsmittelkontrolle mit DMSO im Vorfeld zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Membranexpression von CXCR4.

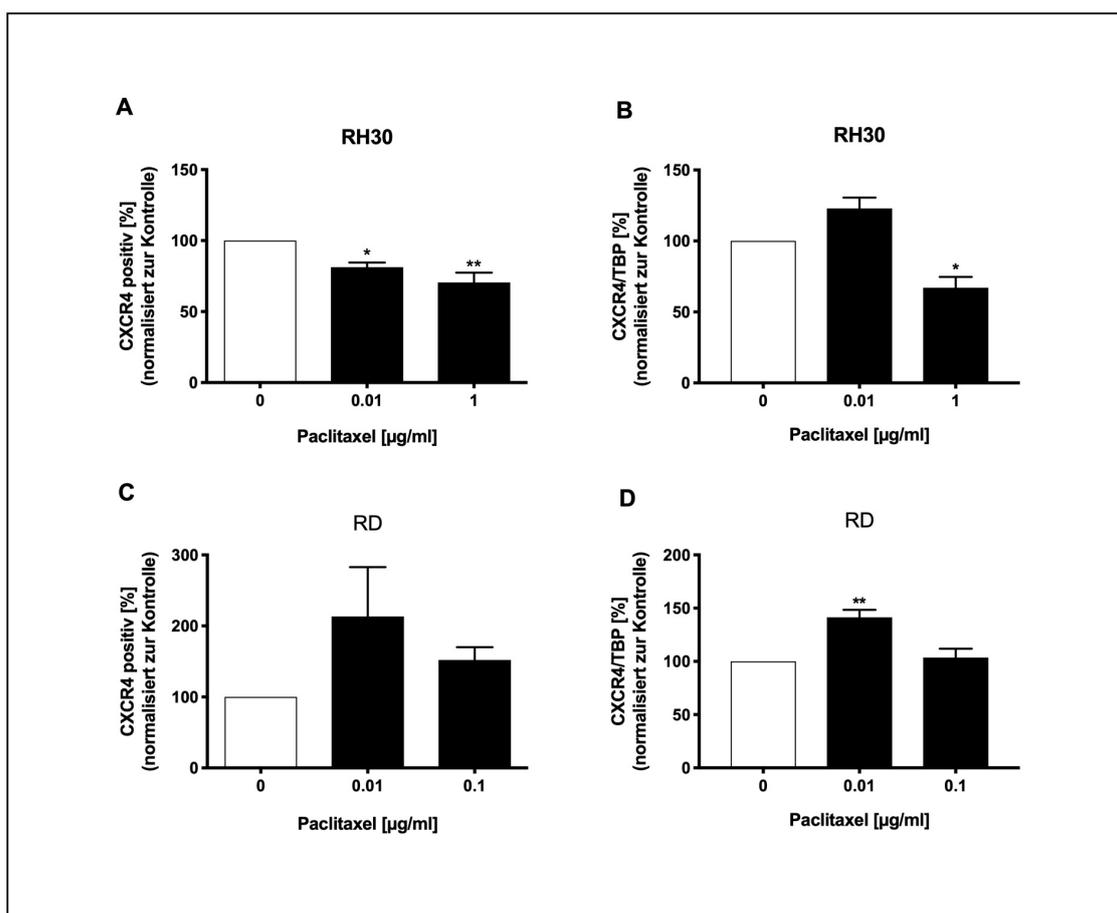


Abbildung 17: Analyse der CXCR4-Expression von RMS-Zellen nach der Behandlung mit Paclitaxel

Abbildung der Expression von CXCR4 (A, C) auf Proteinebene (links) durchflusszytometrisch gemessen und (B, D) auf der mRNA-Ebene (rechts) mittels RT-PCR (n=4), bei den Zelllinien RH30 und RD nach 24 Std. Behandlung mit Paclitaxel. Die Kontrolle 0 (ohne Behandlung) wurde als 100 % definiert. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorische Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01. Abbildung verändert aus Regenbogen et al., 2020 [127].

Durch die Behandlung mit Paclitaxel konnte auf Proteinebene bei RH30-Zellen nach 24 Std. eine signifikante Abnahme der CXCR4-Expression beobachtet werden (siehe Abb. 17, A). Bei der Messung der mRNA-Menge mittels RT-PCR

fürte lediglich die höhere Konzentration (1 µg/ml) zu einer signifikanten Reduktion von CXCR4 (siehe Abb. 17, B). Bei den RD-Zellen war die Oberflächenexpression von CXCR4 ebenfalls konzentrationsabhängig, in höheren Konzentrationen tendenziell rückläufig. Durchflusszytometrisch konnte keine und mittels RT-PCR nur bei der Behandlung mit 0,01 µg/ml eine statistische Signifikanz ermittelt werden (siehe Abb. 17, C-D) [127].

3.2.3.3 Expression der SGK3 mRNA nach Behandlung mit Paclitaxel

Um zu untersuchen, ob die SGK3 einen modulatorischen Einfluss auf die Expression von CXCR4 unter chemotherapeutischer Behandlung hat, wurde auch bei Paclitaxel die SGK3-Expression unter simultanen Bedingungen/Versuchsansätzen wie im Vorfeld die CXCR4-Expression bestimmt.

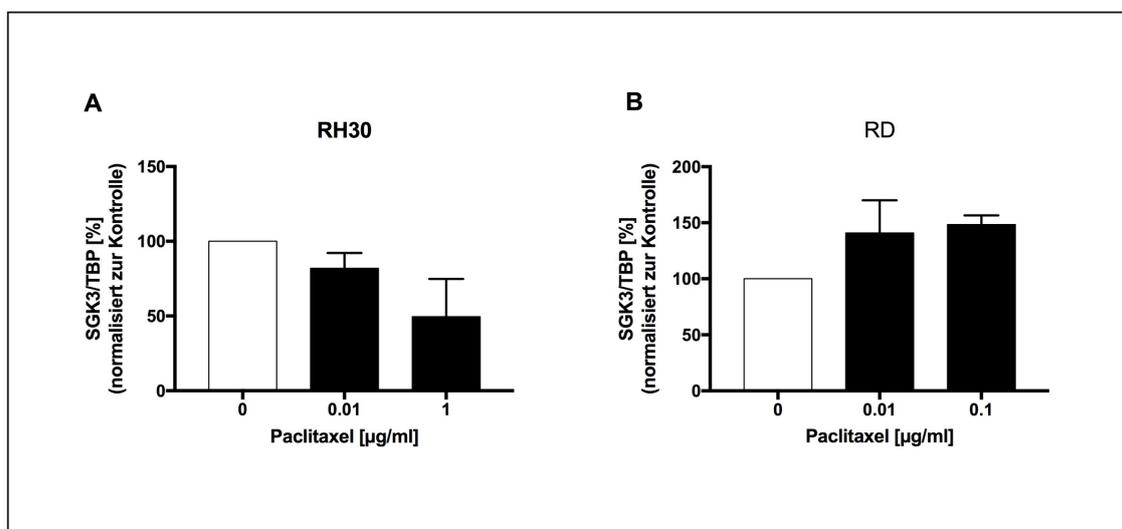


Abbildung 18: SGK3 mRNA-Expression von RMS-Zellen nach der Behandlung mit Paclitaxel

Dargestellt sind Ergebnisse der SGK3-Expression auf Transkriptionsebene mittels der RT-PCR bei (A) RH30- und (B) RD-Zellen nach 24 Std. Behandlung mit Paclitaxel (n=3). Die Kontrolle (keine Behandlung) wurde als 100 % und die Messergebnisse dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni).

Bei der alveolären Zelllinie RH30 zeigte die mRNA-Menge von SGK3 mit steigenden Konzentrationen von Paclitaxel eine Tendenz zur Abnahme. Auch bei RD-Zellen war lediglich eine tendenzielle Zunahme der mRNA-Expression von SGK3, jedoch keine Signifikanz zu erkennen (siehe Abb. 18, A-B).

3.2.4 Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies durch Zytostatika

Oxidativer Stress/reaktive Sauerstoffspezies induzieren u.a. Onkogene und scheinen einen fördernden Einfluss auf die Progression sowie Metastasierung von Tumorzellen zu haben [128]. Ferner konnte ein Einfluss von ROS auf die Expression von SGK3 sowie CXCR4 gezeigt werden [84, 128]. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde nun der Einfluss der eingesetzten Zytostatika auf die Bildung von ROS untersucht (siehe Tabelle 8 und Abb. 19, A-H).

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bei RMS-Zellen nach Zytostatika

Darstellung der ROS Bildung mittels Durchflusszytometrie bei den Zelllinien RH30 und RD nach 24 Std. Behandlung mit Zytostatika. Die Prozentangaben geben die Zunahme (+) nach zytostatischer Behandlung gegenüber der unbehandelten Kontrolle (100 %) wieder.

	RH30 (ARMS) ROS Bildung	RD (ERMS) ROS Bildung
Doxorubicin 0,2 µg/ml	+ 750 %	+ 325 % (n.s.)
Doxorubicin 0,5 µg/ml	+ 1038 %	+ 438 %
Vincristin 0,001 µg/ml	+ 315 %	+ 184 % (n.s.)
Vincristin 0,0025 µg/ml	+ 518 %	+ 640 %
Dactinomycin 0,01 µg/ml	+ 317 %	+ 237 %
Dactinomycin 0,025 µg/ml	+ 383 %	+ 76 % (n.s.)
Carboplatin 100 µg/ml	+ 480 %	
Carboplatin 200 µg/ml	+ 166 % (n.s.)	+ 317 %
Carboplatin 300 µg/ml		+ 464 %

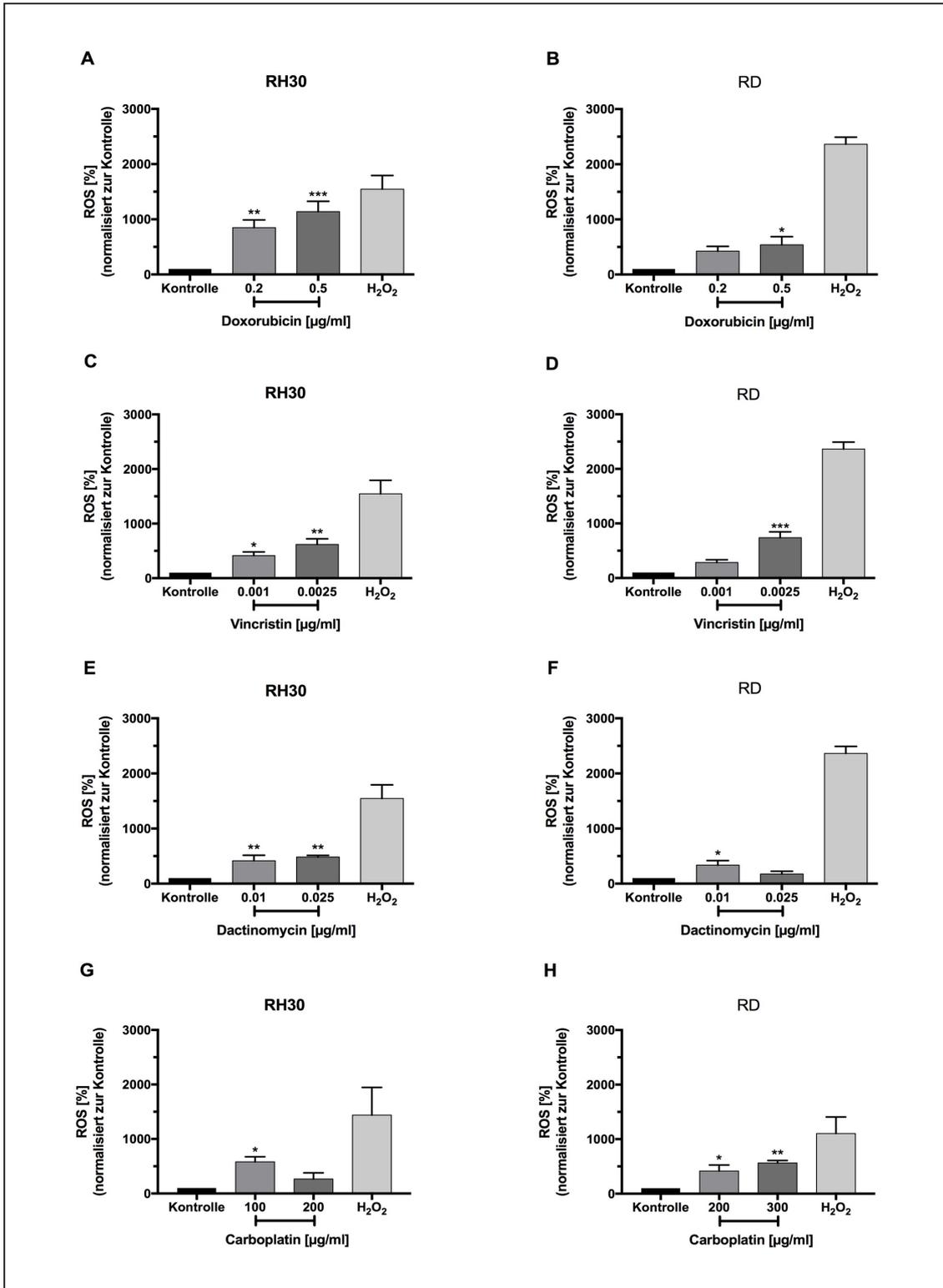


Abbildung 19: Einfluss von Zytostatika auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei RMS-Zellen

Dargestellt sind Ergebnisse der ROS-Bildung nach Behandlung mit (A, B) Doxorubicin, (C, D) Vincristin, (E, F) Dactinomycin (n=4) und (G, H) Carboplatin (n=3) für 24 Std., auf (links) RH30- und (rechts) RD-Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Die Kontrolle (keine Behandlung) wurde als 100 % gesetzt und die Messungen dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

3.3 Migration

Nachdem zunächst der Einfluss von Zytostatika auf die Zellviabilität sowie Expressionsanalysen von CXCR4 und SGK3 im Fokus standen, sollte im Folgenden deren funktionelle Bedeutung mit Hilfe von Migration-Assays untersucht werden. Bei den vorangegangenen Expressionsanalysen zeigten die Behandlung mit Doxorubicin oder Dactinomycin (u.a. Interkalation in die DNA) bzw. Vincristin oder Paclitaxel (Mitosehemmstoffe) einen weitestgehend entgegengesetzten Einfluss auf das Expressionsverhalten von CXCR4. Um zu untersuchen ob dieser regulatorische Effekt auch einen funktionellen Einfluss auf das Migrationsverhalten hat, wurde mit Doxorubicin und Vincristin für die folgenden Migrationsversuche jeweils ein Zytostatikum aus jeder Wirkgruppe ausgewählt. Aufgrund der längeren Behandlungsdauer wurde hierbei von beiden Zytostatika die geringere Konzentration verwendet.

1.1.1 Migration von RMS-Zellen in Transwells

Wie bereits beschrieben, spielt SDF-1 (CXCL12) mitunter als Aktivator von CXCR4 eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung von Tumoren. Im folgenden Versuch wurde deshalb die Kontrolle der Migration in An- und Abwesenheit von SDF-1 α untersucht.

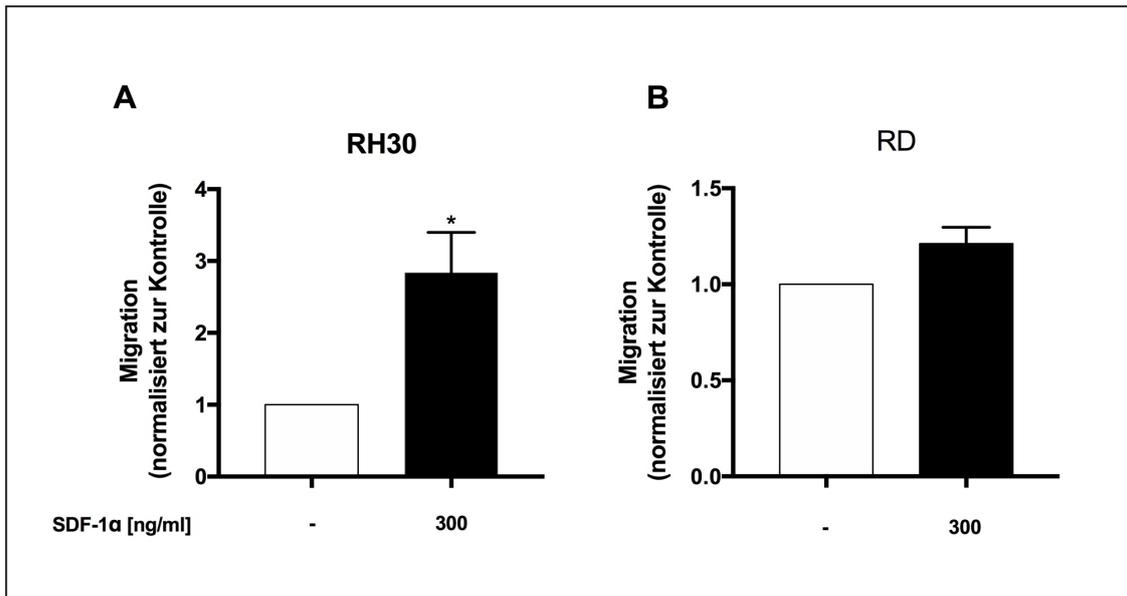


Abbildung 20: Migrationsverhalten von RMS-Zellen in Abhängigkeit von SDF-1α

Auszug und Darstellung Auszug und Darstellung aus den nachfolgenden Migrationsversuchen. Verglichen wurde die SDF-1α [300 ng/ml] abhängige Migration bei (A) RH30 und (B) RD-Zellen (n=5). Die Kontrolle (ohne SDF-1α) wurde 1 gesetzt. Die Auswertung erfolgte über einen ungepaarten T-Test mit Welch-Korrektur. *p ≤ 0.05. Abbildung verändert aus Regenbogen et al., 2020 [127].

Wie in Abb. 20 gezeigt, führte die Gabe von 300 ng/ml SDF-1α in das untere Kompartiment der Transwells zu einer signifikanten Zunahme der Migration bei RH30-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (ohne SDF-1α). Bei RD-Zellen war kein statistisch signifikanter Einfluss zu ermitteln [127]. Für die folgenden Migrationsansätze wurden stets 300 ng/ml SDF-1α im unteren Kompartiment verwendet.

3.3.1 Migration von RMS-Zellen nach zytostatischer Behandlung

Nachdem die Behandlung mit Doxorubicin und Vincristin in den vorausgegangenen Expressionsmessungen zu einer Zu-/ oder Abnahme der CXCR4-Expression auf RMS-Zellen geführt hatten, sollte im Folgenden untersucht werden ob dieser modulatorische Effekt auch funktionelle Bedeutung in Form eines verstärkten Migrationsverhaltens hat. Da die Expressionszunahme bei RD-Zellen durch Doxorubicin besonders hoch war, wurde diese Zelllinie bei den anstehenden Vorversuchen eingesetzt. Durch Vincristin nahm die CXCR4-Expression von RH30 Zellen signifikant ab, so dass hierfür RH30-Zellen eingesetzt wurden.

Die Vorbehandlung mit 0,001 µg/ml Vincristin zeigte bei RH30-Zellen eine signifikante Abnahme der Migration um 57 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 21, A). Bei der embryonalen Zelllinie RD führte die Vorbehandlung mit 0,2 µg/ml Doxorubicin zu keiner Abnahme der Migration in Richtung 300 ng/ml SDF-1α (Abb. 21, B).

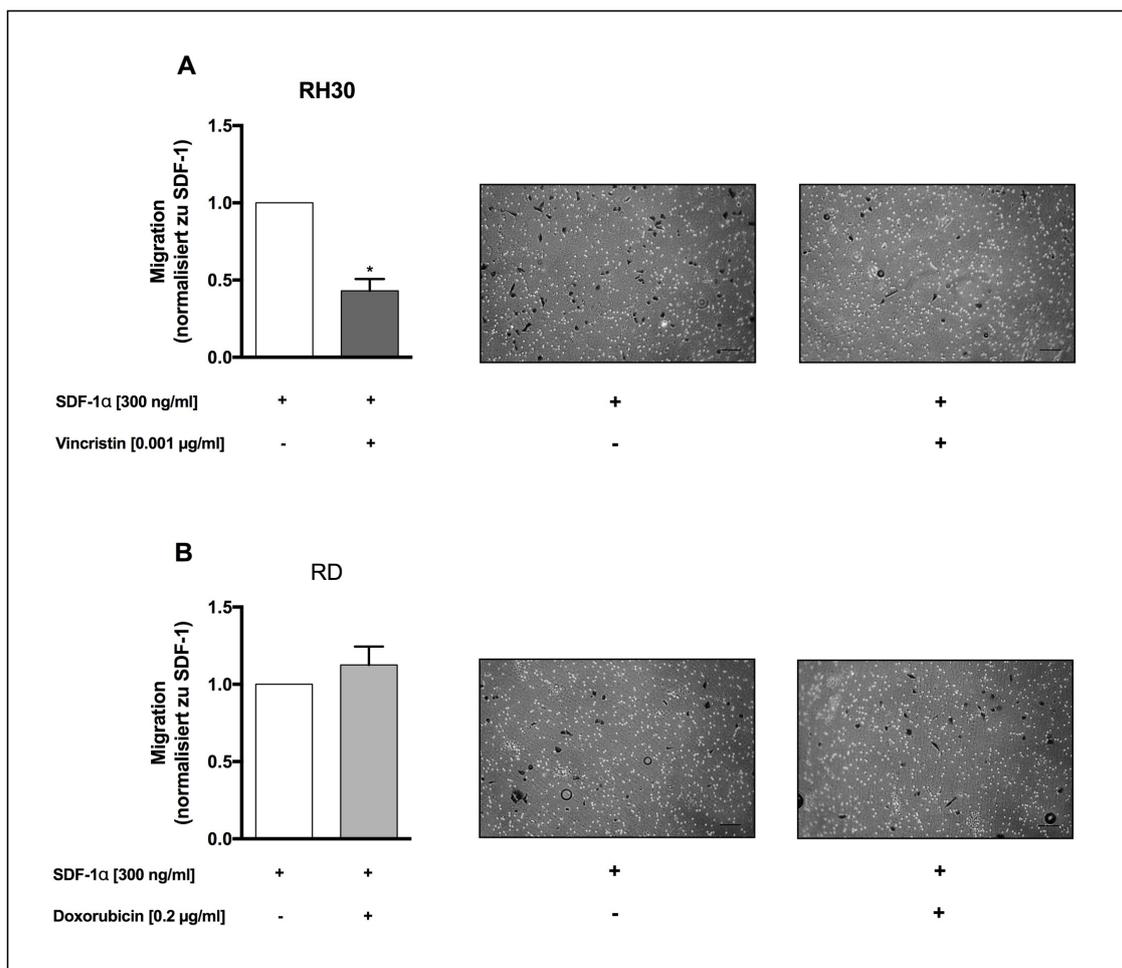


Abbildung 21: Migrationsverhalten von RMS-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung mit Doxorubicin/Vincristin

Dargestellt sind Ergebnisse der Migration im Transwell Assay. Verglichen wurde die SDF-1α [300ng/ml] abhängige Migration von (A) Vincristin [0.001 µg/ml] bei RH30-Zellen (n=3) und (B) RD-Zellen nach Doxorubicin [0,2 µg/ml] (n=4). Die Ergebnisse wurden zur Kontrolle (ohne Behandlung) ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über einen ungepaarten T-Test mit Welch-Korrektur. *p ≤ 0.05. Scalebar = 100 µm.

3.3.1.1 Migration von RMS-Zellen nach der Behandlung mit AMD3100 und/oder Doxorubicin bzw. Vincristin

Um das Migrationsverhalten unter Doxorubicin und Vincristin noch besser

beurteilen zu können, erfolgte in Anlehnung an die Ergebnisse der Vorversuche in 3.3.2, nach 24 Std. eine erneute Behandlung mit Doxorubicin bzw. Vincristin und AMD3100 nachdem die vorbehandelten Zellen in die Transwells überführt worden waren.

Die Monotherapie mit 0,2 µg/ml Doxorubicin ergab eine signifikante Abnahme der Migration von RH30-Zellen um 53 % im Transwell. Die Kombination von 0,2 µg/ml Doxorubicin und 10 µM AMD3100 konnte die Migration signifikant um 81 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduzieren. Wurde die Monotherapie mit 0,2 µg/ml Doxorubicin mit der Kombinationstherapie von 0,2 µg/ml Doxorubicin und 10 µM AMD3100 verglichen, konnte keine signifikante Reduktion des Migrationsverhaltens beobachtet werden (siehe Abb. 22, A).

Eine signifikante Abnahme der Migration durch die Monotherapie mit 0,2 µg/ml Doxorubicin wurde bei der embryonalen Zelllinie RD nicht erreicht. Allein die Kombination von 0,2 µg/ml Doxorubicin mit 10 µM AMD3100 zeigte eine signifikante Abnahme der Migration gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Im arithmetischen Mittel konnte die Migration hierdurch um 76 % reduziert werden (siehe Abb. 22, B). Die in den Vorversuchen gezeigte Tendenz zur Zunahme der Migration unter 0,2 µg/ml Doxorubicin, zeigte sich unter der Doppelbehandlung nicht [127]. Bei der alveolären Zelllinie RH30 konnte gegenüber der unbehandelten Kontrolle durch die Verwendung von 0,001 µg/ml Vincristin eine signifikante Reduktion der Migration um 39 % erreicht werden (siehe Abb. 23, A). Die kombinierte Gabe von 0,001 µg/ml Vincristin und 10 µM AMD3100 konnte die Migration signifikant um 65 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle senken. Wurde nun die Kombinationstherapie von 0,001 µg/ml Vincristin und 10 µM AMD3100 mit der Monotherapie von 0,001 µg/ml Vincristin verglichen, konnte eine signifikante Abnahme der Migration festgestellt werden (siehe Abb. 23, A). Bei der embryonalen Zelllinie RD führte eine erneute Behandlung mit 0,001 µg/ml Vincristin zu einer Zunahme der Migration gegenüber der Kontrolle um 31 %. Durch eine Kombinationsbehandlung von 0,001 µg/ml Vincristin mit 10 µM AMD3100 konnte lediglich ein tendenzieller Rückgang der Migration von 21 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (siehe Abb. 23, B) [127].

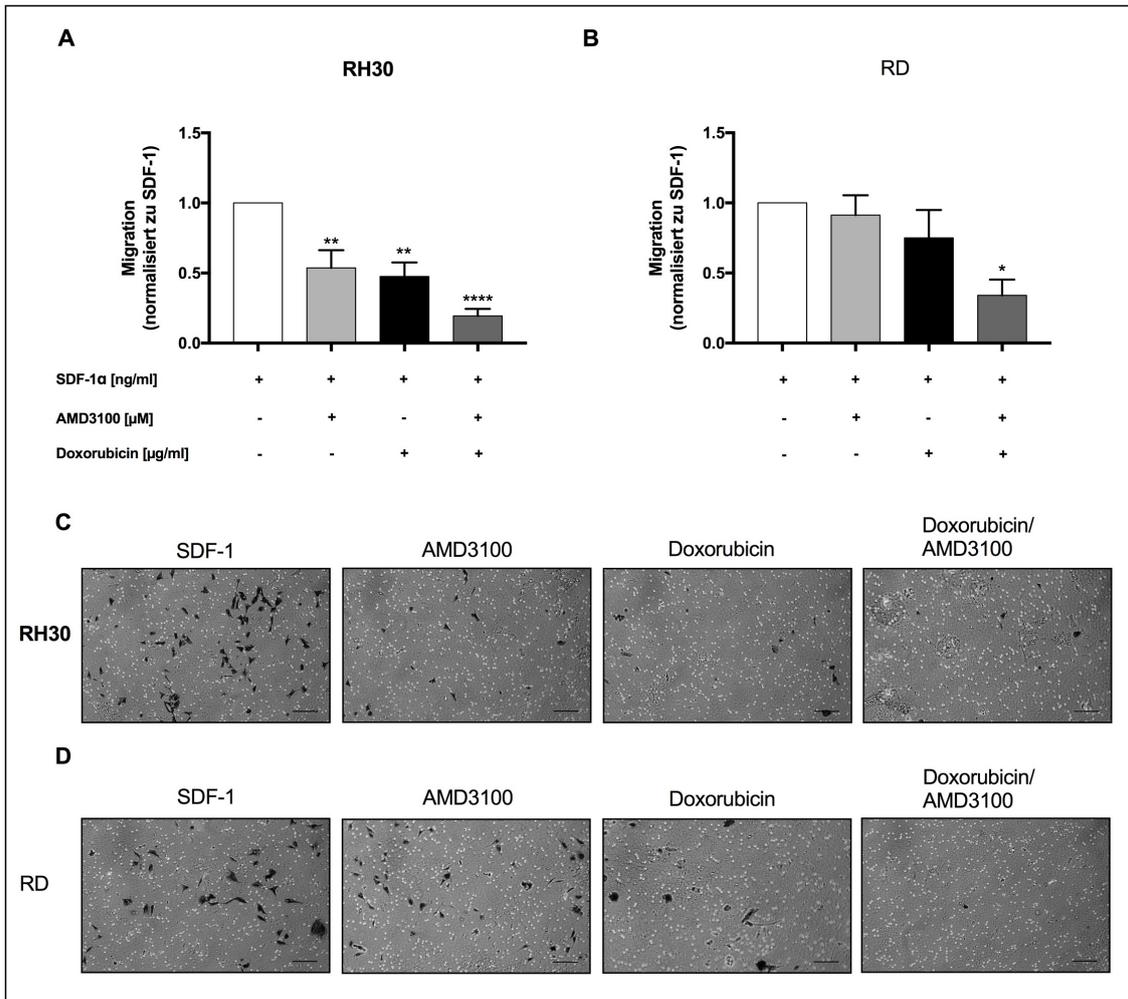


Abbildung 22: Migration von RMS-Zellen nach der Behandlung mit Doxorubicin und/oder AMD3100

Abbildung der SDF-1 α abhängigen Migration unter der Behandlung von Doxorubicin [0,2 μ g/ml] und/oder AMD3100 10 μ M] bei (A) RH30- (n=4) und (B) RD-Zellen (n=5). Die Kontrolle (SDF-1) wurde als 1 gesetzt. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle und die Mono-/Kombinationstherapie untereinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ****p \leq 0.0001. Abbildung verändert aus Regenbogen et al., 2020 [127]

Exemplarische Darstellung der SDF-1 α abhängigen Migration bei (C) RH30- und (D) RD-Zellen im Transwell Assay unter 10 x Vergrößerung fotografisch dokumentiert. Scalebar = 100 μ m.

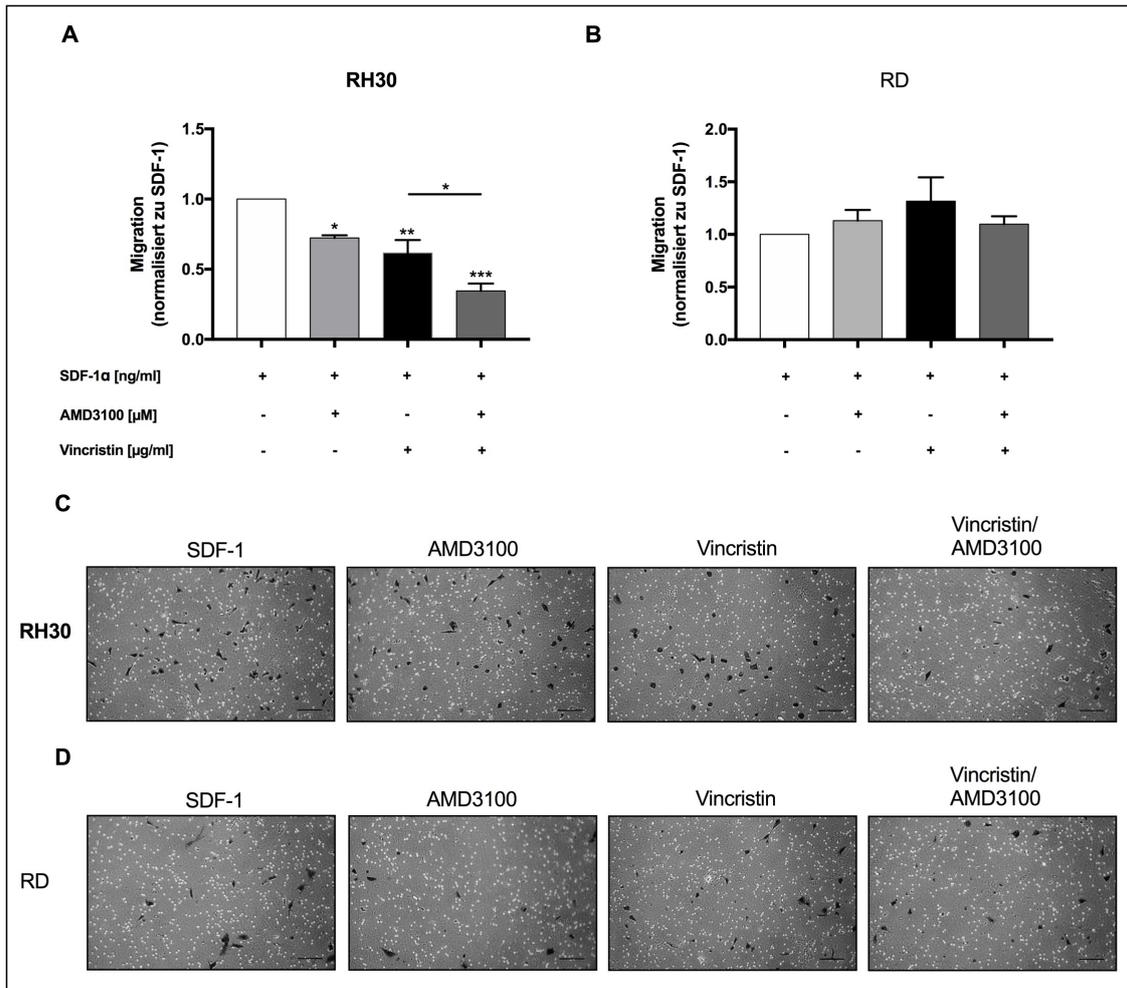


Abbildung 23: Migration von RMS-Zellen nach der Behandlung mit Vincristin und/oder AMD3100

Abbildung der SDF-1 α abhängigen Migration unter der Behandlung von Vincristin [0,001 μ g/ml] und/oder AMD3100 [10 μ M] bei (A) RH30- (n=3) und (B) RD-Zellen (n=4). Die Kontrolle (SDF-1) wurde als 1 gesetzt. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle und die Mono-/Kombinationstherapie untereinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001. Abbildung verändert aus Regenbogen et al., 2020 [127]

Exemplarische Darstellung der SDF-1 α abhängigen Migration bei (C) RH30- und (D) RD-Zellen im Transwell Assay unter 10 x Vergrößerung fotografisch dokumentiert. Scalebar = 100 μ m.

3.3.2 Mikrometastasenmodell bei RMS-Sphäroiden

Da durch Migrationsversuche im Transwell nur Rückschlüsse auf das Tumorzellverhalten in 2-dimensionaler Ebene gezogen werden konnte, wurde mit den Tumorsphäroiden ein neues Verfahren etabliert. Wie in 2.2.6 erläutert ist es hierdurch möglich das Auswachsen von Tumorzellen aus 3D-Sphäroiden unter *in vivo* ähnlicheren Bedingungen zu untersuchen und damit den Einfluss verschiedener Substanzen auf Mikrometastasierungsprozesse *in vitro* besser

analysieren zu können. In Anlehnung an die Ergebnisse der Transwell Migration, sollte im Folgenden der Einfluss von Doxorubicin und Vincristin in der Kombination mit AMD3100 auf das Wachstumsverhalten von RMS Sphäroiden untersucht werden. Zur besseren Übersicht werden die Chemotherapeutika im Folgenden getrennt voneinander dargestellt.

3.3.2.1 Auswachsen von Zellen aus RMS-Sphäroiden nach der Behandlung mit AMD3100 und/oder Doxorubicin

In der Doxorubicin-Gruppe war nach 24 Std. in allen anderen Versuchsansätzen kein signifikanter Einfluss auf die Migration von RH30-Zellen aus den Tumorsphäroiden erkennbar. Bei RD-Sphäroiden zeigten beide Doxorubicinkonzentrationen in Kombination mit AMD3100 die deutlichste Wachstumsreduktion, jedoch ohne statistische Signifikanz (siehe Abb. 24, C). Nach 48 Std. Behandlung konnte durch die Monotherapie mit 0,5 µg/ml Doxorubicin eine signifikante Abnahme der Sphäroidmigration um 24 %, in Kombination mit AMD3100 um 30 % erreicht werden (siehe Abb. 24, B). Beim Vergleich der Monotherapie mit der Kombination konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Auch die alleinige Gabe von AMD3100 zeigte lediglich eine tendenzielle Reduktion.

Bei den embryonalen RMS-Sphäroiden wurde das Auswachsen von RD-Zellen in beiden Behandlungsansätzen (0,2 und 0,5 µg/ml Doxorubicin), jeweils nur in Kombination mit 10 µM AMD3100 signifikant reduziert. Die Reduktion lag bei 39 % und 48 % (siehe Abb. 24, D). Weder bei RH30- noch bei RD-Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Monotherapie mit Zytostatika und der Kombination von Zytostatikum und AMD3100.

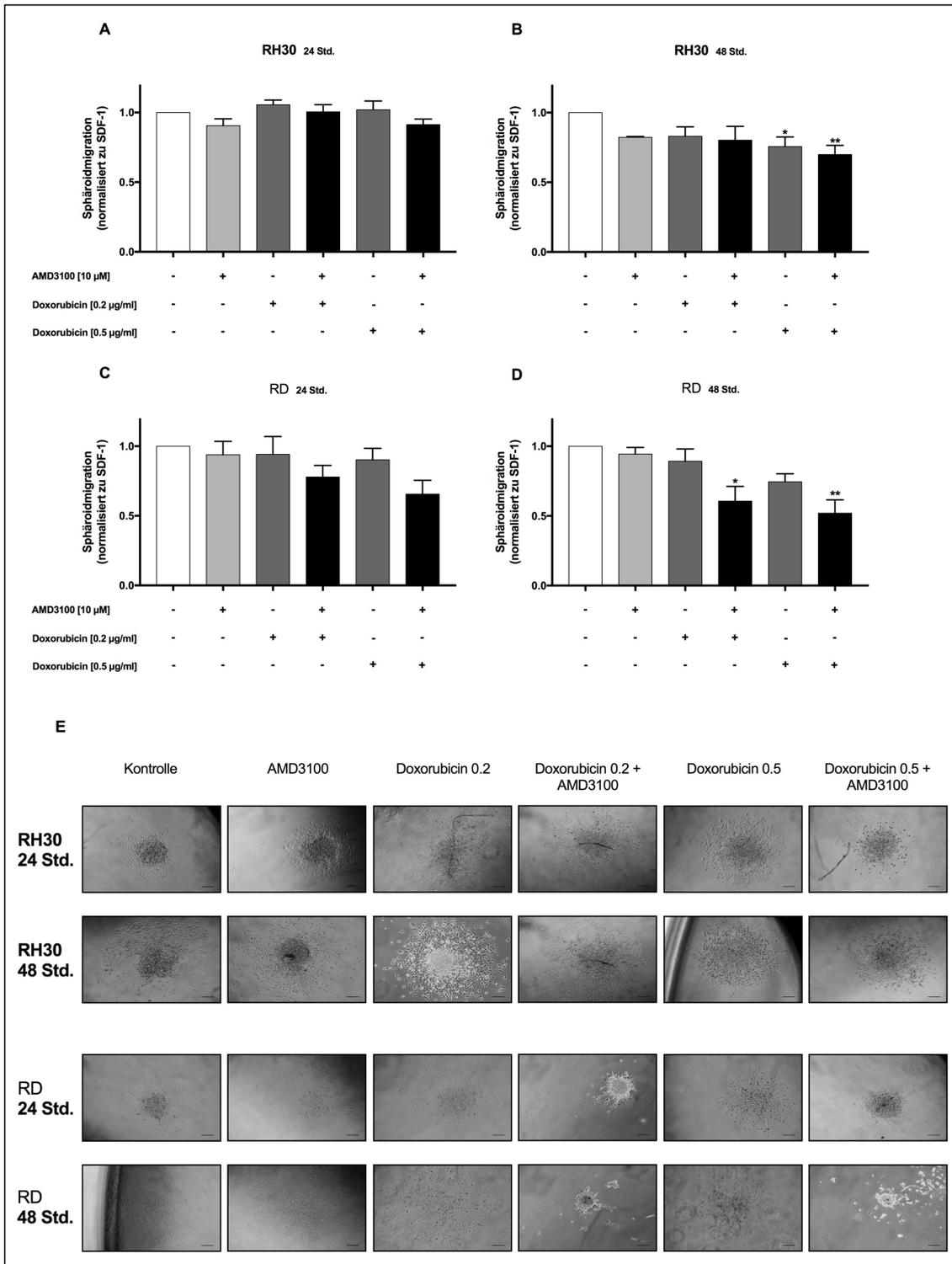


Abbildung 24: Auswachsen von RMS-Zellen aus dem 3D-Zellverband in Abhängigkeit von der Behandlung mit Doxorubicin und/oder AMD3100

Abbildung der Migration von (A, B) RH30-, (C, D) RD-Zellen aus Tumorsphäroiden in Abhängigkeit von SDF-1 α [300 ng/ml] unter der Behandlung von Doxorubicin [0,2/0,5 µg/ml] sowie AMD3100 [10 µM] (n=3). Die Behandlung erfolgte für (links) 24 Std. oder (rechts) 48 Std. Die Kontrolle (mit 300 ng/ml SDF-1 α) wurde als 1 definiert. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle und die Mono-/Kombinationstherapie untereinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p \leq 0,05, **p \leq 0,01. (E) Exemplarische Darstellung der Migration von RMS-Zellen aus den Tumorsphäroiden unter 20 x Vergrößerung fotografisch dokumentiert. Scalebar = 100 µm.

3.3.2.2 Auswachsen von Zellen aus RMS-Sphäroiden nach der Behandlung mit AMD3100 und oder Vincristin

Nach 24 Std. war in den Versuchsansätzen mit Vincristin 0,001 und 0,0025 µg/ml lediglich in Kombination mit 10 µM AMD3100 eine signifikante Abnahme der Migration um 18 und 32 % von RH30-Zellen aus dem Zellverband zu beobachten (siehe Abb. 25, A). Bei RD-Sphäroiden konnte die Zellmigration in der geringeren Vincristinkonzentration (0,001 µg/ml) nur mit AMD3100 signifikant um 26 % verringert werden. Vincristin (0,0025 µg/ml) zeigte auch in der Monotherapie einen signifikanten Effekt mit einer Abnahme um 34 %, in Kombination mit AMD3100 um 36 % (siehe Abb. 25, C). Auch wenn die Wirkung in der Kombination deutlicher war, konnte auch hier beim Vergleich der Monotherapie mit der Kombination keine Signifikanz ermittelt werden.

Nach 48 Std. nahm das Wanderungsverhaltens von RH30-Zellen aus den Sphäroiden in der Kombination von AMD3100 mit der geringeren Vincristin Konzentration von 0,001 µg/ml signifikant um 41 % ab (siehe Abb. 25, B). Bei den Ansätzen mit 0,0025 µg/ml Vincristin reduzierte sich die Migration gegenüber der unbehandelten Kontrolle, mit und ohne AMD3100, signifikant. Mit einer Reduktion um 41 % gegenüber der Kontrolle, zeigte auch die Kombination mit AMD3100 den stärksten Einfluss auf das Auswachsen von RMS-Zellen (siehe Abb. 25, B).

Bei RD-Sphäroiden konnte lediglich in der geringeren Vincristinkonzentration sowohl alleine, als auch in Kombination mit AMD3100, eine signifikante Abnahme der Migration einzelner Zellen um 23 %, in der Kombination mit 10 µM AMD3100 um 37 % festgestellt werden. Bei der höheren Konzentration von 0,0025 µg/ml Vincristin war in keinem der Versuchsansätze ein signifikanter Einfluss auf das Migrationsverhalten von RD-Zellen aus den Zellverbänden erkennbar (siehe Abb. 25, D). Wie schon im Vorfeld bei Doxorubicin war zwischen der Monotherapie mit Zytostatika und der Kombination von Zytostatikum und AMD3100 bei beiden RMS-Zelllinien kein signifikanter Unterschied festzustellen.

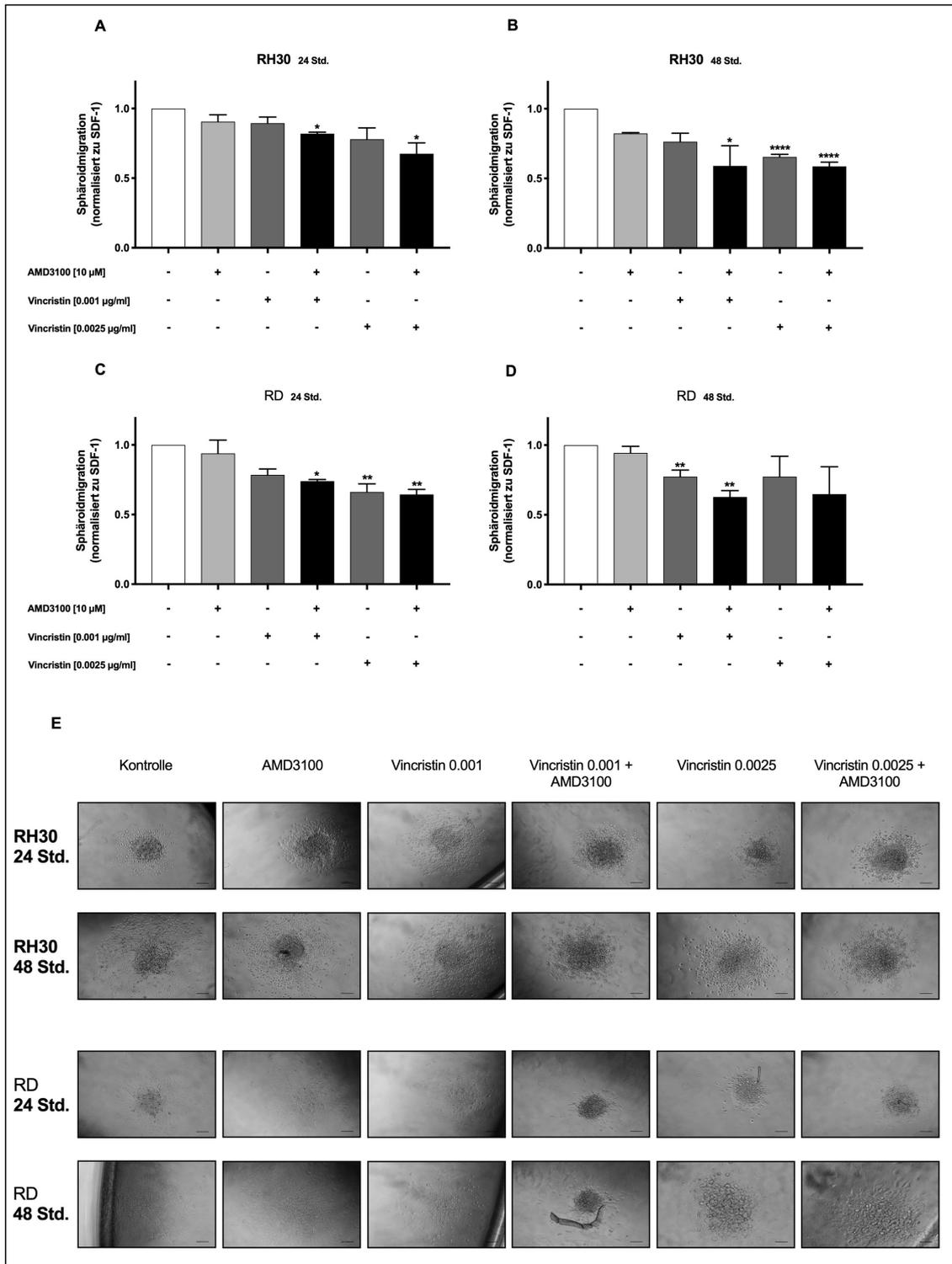


Abbildung 25: Auswachsen von RMS-Zellen aus dem 3D-Zellverband in Abhängigkeit von der Behandlung mit Vincristin und/oder AMD3100

Abbildung der Migration von (A, B) RH30-, (C, D) RD-Zellen aus Tumorsphäroiden in Abhängigkeit von SDF-1 α [300 ng/ml] unter der Behandlung von Vincristin [0,001/0,0025 µg/ml] und AMD3100 [10 µM] (n=3). Die Behandlung erfolgte für (links) 24 Std. oder (rechts) 48 Std. Die Kontrolle (mit 300 ng/ml SDF-1 α) wurde als 1 definiert. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle und die Mono-/Kombinationstherapie untereinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferronie). *p \leq 0.05, **p \leq 0.01, ***p \leq 0.001, ****p \leq 0.0001. (E) Exemplarische Darstellung der Migration von RMS-Zellen aus den Tumorsphäroiden unter 20 x Vergrößerung fotografisch dokumentiert. Scalebar = 100 µm.

3.3.2.3 Auswachsen von Zellen aus RMS-Sphäroiden nach der Behandlung mit Zytostatika in An/- Abwesenheit von SDF-1 α

Im nächsten Schritt wurde aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen (Abb. 24 und 25) statistisch untersucht, inwiefern die An- und Abwesenheit von SDF-1 α , als Ligand von CXCR4, Einfluss auf die Wirkung von Zytostatika auf das Wanderungsverhalten von RMS-Zellen aus Tumorsphäroiden hat.

Nach 24 stündiger Behandlung konnte bei der alveolären Zelllinie RH30 durch die Behandlung mit Vincristin oder Doxorubicin kein signifikanter Einfluss festgestellt werden (siehe Abb. 26, A und E). Bei der embryonalen Zelllinie RD zeigte sich durch die Behandlung mit der höheren Doxorubicinkonzentration (0,5 $\mu\text{g/ml}$) lediglich in den Ansätzen ohne SDF-1 α eine signifikante Abnahme der Sphäroidmigration um 28 %. Die Monotherapie mit Vincristin führte in der geringeren Konzentration (0,001 $\mu\text{g/ml}$) nur in Anwesenheit von SDF-1 α zu einer signifikanten Abnahme um 22 %. In der höheren Konzentration (0,0025 $\mu\text{g/ml}$) konnte das Migrationsverhalten von RD-Zellen aus den Sphäroiden in beiden Ansätzen um 42 %, bzw. 34 % signifikant gesenkt werden (siehe Abb. 26, C und G).

Nach 48 Std. konnte lediglich 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin, im Ansatz ohne SDF-1 α , die Migration von RH30-Zellen aus den Sphäroiden signifikant um 29 % reduzieren. In den Versuchen mit Vincristin zeigte sich in allen Gruppen eine signifikante Abnahme (siehe Abb. 26, F). Wie schon bei der alveolären Zelllinie RH30, so konnte auch bei RD-Sphäroiden nur mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin im Ansatz ohne SDF-1 α eine signifikante Abnahme des Wachstumsverhalten um 29 % von RD-Zellen gezeigt werden. In der Vincristin-Gruppe war in keiner Versuchsgruppe ein signifikanter Einfluss festzustellen (siehe Abb. 26, H).

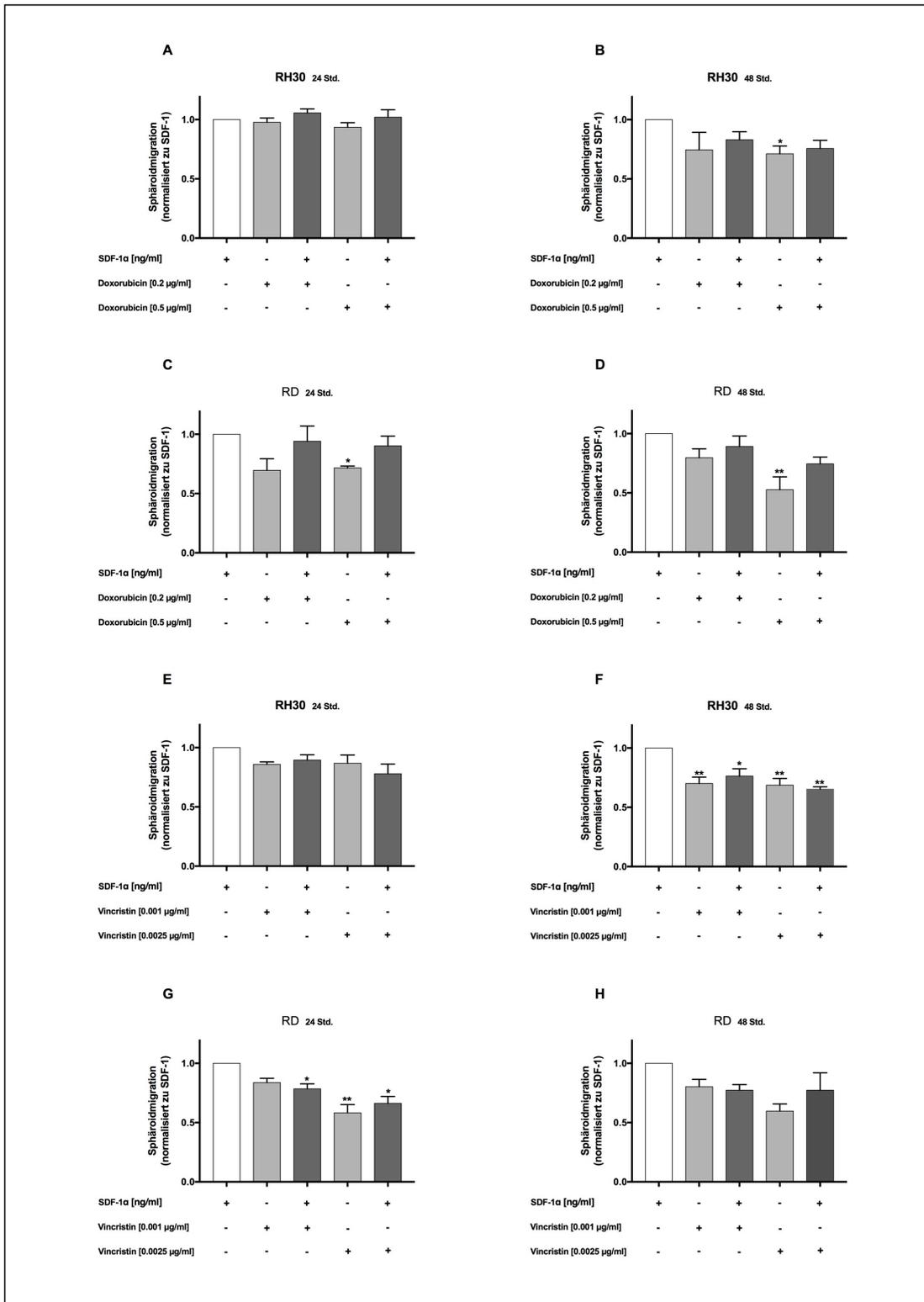


Abbildung 26: Auswachsen von RMS-Zellen aus dem 3D-Zellverband in Abhängigkeit von der Behandlung mit Zytostatika in An-/Abwesenheit von SDF-1α

Abbildung der Migration von (A, B, E, F) RH30-, (C, D, G, H) RD-Zellen aus Tumorsphäroiden in An-/ Abwesenheit von SDF-1α [300 ng/ml] (n=3). Die Behandlung erfolgte für (links) 24 Std. oder (rechts) 48 Std. Die Kontrolle (mit 300 ng/ml SDF-1α) wurde als 1 definiert. Die Messergebnisse wurden zur Kontrolle und untereinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte über die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA (Bonferroni). *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.01.

4 Diskussion

Die schlechte Prognose fortgeschrittener Tumorstadien des Rhabdomyosarkom (RMS) hat sich auch unter dem multimodalen Therapieansatz in den letzten Jahren nicht wesentlich verbessert [48, 51, 52]. Als mögliche Faktoren hierfür sind die Metastasierung, Rezidivbildung sowie die Chemoresistenz bei multimodaler Chemotherapie zu nennen [52, 129]. *In vitro* und *in vivo* konnte bereits gezeigt werden, welchen entscheidenden Einfluss die CXCR4-CXCL12-Achse, insbesondere auf die Migration und Metastasierung, aber auch am Wachstum und der Angiogenese von Tumorzellen, u.a. beim RMS, hat [68, 73, 75, 76, 78, 79, 81]. Des Weiteren konnte bei einigen Tumorentitäten ein pro-metastatischer Einfluss von Zytostatika sowie anderen Tumorthapeutika durch die Induktion von Chemokinen, Chemokinrezeptoren wie mitunter CXCR4/CXCL12 und Wachstumsfaktoren *in vitro* und *in vivo* Tumormodellen bereits beobachtet werden [130-138].

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* untersucht werden, inwiefern eine Kombination von CXCR4-Inhibition und Chemotherapie eine neue/erweiterte Therapiestrategie bei der Behandlung des RMS darstellt.

4.1 Expression von CXCR4 und der modulatorische Einfluss von Zytostatika

Zunächst konnte die Expression von CXCR4 auf den alveolären- RH30 (ARMS) und embryonalen RMS-Zellen RD (ERMS) sowohl auf der Protein- als auch auf mRNA-Ebene übereinstimmend mit der Literatur [79, 82] nachgewiesen werden. Bei anderen Tumorentitäten konnte bereits ein modulatorischer Einfluss von Chemotherapeutika auf die CXCR4-Expression beobachtet werden [130, 131, 134, 139, 140]. Dieser Effekt wurde nun auch erstmals auf RMS-Zelllinien untersucht.

Hierbei führten Doxorubicin und Dactinomycin (beide u.a. Interkalation in die DNA) bei RH30- und RD-Zellen auf Protein- und mRNA-Ebene zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme von CXCR4. Die Behandlung mit Vincristin

oder Paclitaxel hingegen (Mitosehemstoffe) zeigte bei AMRS-Zellen eine konzentrationsabhängige Reduktion von CXCR4, bei ERMS-Zellen hingegen konnte in Abhängigkeit von der Behandlungszeit sowie den Vincristinkonzentrationen eine signifikante Zunahme der CXCR4-Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden. Beim eingesetzten Alkylanz Carboplatin konnte ein dosisabhängiges Expressionsverhalten von CXCR4 auf Protein- und mRNA-Ebene bei beiden RMS-Subtypen beobachtet werden.

Vergleichbare Daten zum RMS existieren bisher keine in der Literatur. Beim adenoid-zystischen Karzinom konnte nach 24 stündiger Monotherapie mit Cisplatin ein statistisch signifikanter Anstieg der CXCR4-Expression festgestellt werden [130]. Bei den ALL-Zelllinien „Nalm-6“ und „RS4;11“ nahm die CXCR4-Expression nach 72-stündiger Behandlung mit Daunorubicin, Vincristin und Cytarabin signifikant zu [140]. Beim Melanom-Mausmodell wurde beschrieben, dass die Monotherapie mit Dacarbazin (Gruppe der Alkylantien) die Anzahl der CD133⁺ Zellen (zu 60 % auch CXCR4⁺) im Tumor um das sechsfache erhöhte. Hierbei reduzierte Dacarbazin zwar die Tumorgroße, zeigte dabei jedoch keinen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung von Lungen- und Lymphknotenmetastasen [131]. Bei kindlichen AML-Zelllinien vermittelte Vincristin einen Anstieg der CXCR4-Expression von „MOLM-14“, bei „NALM-6“ hingegen nahm die Expression durch Vincristin ab [134].

Verglichen mit unseren Daten kann somit zunächst postuliert werden, dass der modulatorische Einfluss von Zytostatika auf die CXCR4-Expression zellabhängig, sowie zeitlichen und pharmakodynamischen Faktoren unterworfen ist.

4.2 Bindungsverhalten von AMD3100 unter zytostatischer Therapie

In der Literatur ist beschrieben, dass die Bindung von AMD3100 die Bindung des monoklonalen FACS Antikörpers 12G5 gegen anti-CXCR4 zum Rezeptor blockiert [103, 141-143]. Auch in der vorliegenden Arbeit führte die Bindung von AMD3100 an CXCR4 durchflusszytometrisch gemessen zur Abnahme von CXCR4 positiven ARMS-Zellen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten bei Lymphoblasten, AML- und ALL-Zelllinien,

unterscheidet sich aber in der Konzentration und Potenz der Inhibition [103, 140, 141, 143]. Diesen Effekt nutzen wir, um zu untersuchen, inwiefern das Bindungsverhalten von AMD3100 abhängig von CXCR4-Expressionslevel ist und durch die Behandlung mit Zytostatika beeinflusst wird. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Bindungsverhalten von AMD3100 weitestgehend unabhängig vom CXCR4-Expressionlevel nach der Behandlung mit Zytostatika ist. Auch wenn die Messung nur quantitative erfolgte und vergleichbare Daten fehlen, lassen die Ergebnisse vermuten, dass der Einsatz von AMD3100 über die Besetzung der Ligandbindungsstelle von CXCL12 am CXCR4 therapeutisch genutzt werden kann. Insbesondere könnte er in Kombination mit dem modulatorischen Einfluss auf die CXCR4-Expression von Zytostatika, eine sinnvolle Ergänzung zur isolierten Chemotherapie beim RMS darstellen. Dennoch bleibt unklar warum die Gabe in der Kombination eine chemotherapeutisch-/ zeitabhängige Wirkung zeigt. Eine mögliche Erklärung läge darin, dass auch Zytostatika ein konzentrationsabhängiges Verhalten zeigen. Darüber hinaus verdeutlichen neuere Daten, dass beim RMS und anderen Tumoren neben der CXCR4 auch die CXCR7-Inhibition bedacht werden muss. CXCR7 wird auf den gleichen Chromosomen wie CXCR4 kodiert und weist eine ähnliche Ligandenspezifität zu SDF-1 auf [144-147]. Ferner wurden Ergebnisse veröffentlicht, wonach AMD3100 zu einer Zunahme der CXCR7 Expression führen kann [140, 148]. Kritisch muss auch beachtet werden, dass das Expressionslevel von Chemokinrezeptoren nicht unbedingt mit deren Funktionalität einhergeht. Mitunter können an der Membran exprimierte Rezeptoren funktionell inaktiv sein [149, 150]. Diese Funktionalität sollte im Folgenden anhand des Migrationsverhaltens genauer untersucht werden [151].

4.3 Migration von RMS-Zellen in Abhängigkeit von CXCR4

Wie bereits erwähnt konnte bei vielen Tumorentitäten ein pro-metastatischer Einfluss von Zytostatika u.a. durch die Induktion von Chemokinen, Chemokinrezeptoren wie mitunter CXCR4 beobachtet werden [130, 132, 134, 139]. Übereinstimmend mit den Daten von Tarnowski und Grymala 2010, wurde

zunächst eine signifikante Zunahme der Migration von RH30-Zellen in Abhängigkeit von SDF-1 α beobachtet [14, 81]. In den Expressionsmessungen konnte im Vorfeld gezeigt werden, dass es durch Doxorubicin bei ERMS-Zellen zu einer Hochregulation von CXCR4 kommt und Vincristin bei ARMS-Zellen zu einer Reduktion von CXCR4 führt. In den anschließenden funktionellen Vorversuchen im Transwell sank die Migration der mit Vincristin vorbehandelten alveolären RMS-Zellen signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle, die embryonalen RMS-Zellen zeigten nach Doxorubicin (Vorbehandlung) kein signifikant verändertes Migrationsverhalten. Dies lässt zunächst auf einen großen Einfluss der CXCR4-Expression schließen und wurde auch durch andere Arbeiten unterstützt. Bei Zhang et al. migrierten Neuroblastom-Zellen genauso schnell in Richtung Knochenmarkstroma wie in Richtung Stroma der Leber. Wurden die Neuroblastom-Zellen über Transfektion mit CXCR4 überexprimiert, so nahm die Migration in Richtung des Knochenmarkstroma (hohe SDF-1 Konzentration), gegenüber dem Stroma der Leber (geringere SDF-1 Konzentration), stark zu [152]. Tarnowski et al. 2010 konnte nachweisen, dass bei gleichen SDF-1 Konzentrationen die Migration von Zellen mit höherer CXCR4-Expression anstieg [14]. Auch bei Libura et al. 2002 war die SDF-1 β abhängige Lokomotion und Migration von ARMS-Zellen *in vitro* (hohe CXCR4-Expression) deutlich ausgeprägter als die von ERMS-Zellen (geringere CXCR4-Expression) [79]. Mit einem translationalen Ansatz untersuchte Strahm et al. 2008 Knochenmarkstroma-Proben von RMS-Patienten mit Metastasen und gesunde Kontrollen bezüglich ihres Einflusses auf die Proliferation, Chemotaxis und Adhäsion auf RMS-Zelllinien. Hierbei konnte eine signifikante Zunahme der Migration von RMS-Zellen (insbesondere RH30, ARMS) in Richtung des Mediums von Patientenproben, deren Tumore metastasiert waren, gegenüber der Kontrolle festgestellt werden [78]. Wurden nun die Proben der aktiven Metastasierung „Knochenmarksmetastasen zum Diagnosezeitpunkt“ und „Knochenmarksmetastasen nach einem Zyklus Zytostatika“ verglichen, konnte bei RD- (ERMS) und RH18-Zellen (ARMS) die stärkste Zunahme der Migration bei den Patienten, die einen Zyklus Chemotherapie hinter sich hatten beobachtet werden. Bei RH30-Zellen (ARMS) hingegen war keine Tendenz

innerhalb der Gruppen festzustellen [78]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Expressionszunahme von CXCR4 durch die Vorbehandlung sein. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass die Inhibition mit AMD3100 oder einem selektiven SDF-1 α -Inhibitor zu einer Abnahme der Migration führte [78]. Übertragen auf die vorliegenden Ergebnisse kommt hier jedoch einschränkend hinzu, dass die Vorbehandlung der Patienten nicht genauer definiert und dass der Einfluss auf die Expression von CXCR4 und damit auf das Tumormigrationsverhalten nicht in Korrelation gestellt wurde.

Dies lässt zu dem Schluss kommen, dass SDF-1 zwar wesentlich an der Migration beteiligt ist, jedoch bei gleicher SDF-1-Konzentration insbesondere das Expressionslevel von CXCR4 maßgeblichen Einfluss auf das Migrationsverhalten hat. Zur Bewertung der Ergebnisse kommt einschränkend hinzu, dass am Migrationsverhalten von RMS-Zellen in *BMS*-Kulturmedien, neben SDF-1 α [79], auch weitere Faktoren wie mitunter der Leukämie-Hemmfaktor [153] und Hepatozyten-Wachstumsfaktor [137] beteiligt sind. Diese jedoch, waren nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Einschränkend für die Versuche muss darüber hinaus beachtet werden, dass die Chemotherapie nur in Vorbehandlung erfolgte und nach der Überführung ins Transwell keine erneute Behandlung durchgeführt wurde. Im weiteren Verlauf wurden deshalb die Versuche zunächst auf die Mono- und dann auf die Kombinationstherapie mit AMD3100 erweitert.

Durch die Monotherapie mit CXCR4- und CXCL12-Inhibitoren nahm u.a. bei Rhabdomyosarkom-, Brustkrebs-, Lungenkrebs- und Prostatazellen *in vitro* und *vivo* die Chemotaxis, Adhäsion sowie die Metastasierung ab [75, 79, 154-157]. Bei RMS-Zellen wurde AMD3100 als Monotherapie bereits *in vitro* eingesetzt [137]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die alleinige Gabe von AMD3100 zu einer signifikanten Reduktion der Migration von RH30-Zellen (CXCR4 > 80 %) führt, auf RD-Zellen (CXCR4 < 15 %) hingegen keine Auswirkungen zeigte. Übereinstimmend mit den quantitativen Expressionsergebnissen im Vorfeld, war die Reduktion der Migration bei RH30-Zellen in der Kombination von Doxorubicin mit AMD3100 am ausgeprägtesten. Bei RD-Zellen konnte die Migration nur in der Kombination von Doxorubicin mit

AMD3100 signifikant gesenkt werden. Die Ergebnisse nach der Vorbehandlung mit Doxorubicin, konnten nach der Doppelbehandlung nicht bestätigt werden. Dennoch zeigte sich, dass der Einfluss auf die Migration bei RH30-Zellen, durch die Monotherapie mit Doxorubicin, größer als bei RD-Zellen war. Darüber hinaus muss bei diesen Ergebnissen aber auch die zunehmende Abnahme der Zellviabilität durch die längere Behandlungsdauer beachtet werden. In der Vincristingruppe war bei RH30-Zellen sowohl gegenüber der Kontrolle, als auch gegenüber der Monotherapie eine signifikante Reduktion der Migration durch die Kombitherapie festzustellen. Bei RD-Zellen wurde keine signifikante Reduktion erreicht. Interessant dabei war, dass die Migration unter $0.001 \mu\text{g/ml}$ gegenüber der Kontrolle tendenziell zunahm. Denkbar ist, dass dies durch die Expressionszunahme von CXCR4 nach 48-stündiger Vincristintherapie bedingt ist.

Der kombinierte Einsatz von Zytostatika und CXCR4-Inhibitoren wurde auch schon bei anderen Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo* untersucht. Bei Melanom-Zellen nahmen durch die Kombination mit Doxorubicin-Lip (in Liposomen eingeschlossenes Doxorubicin) und Peptide S (CXCR4 Inhibitor) die Lungenmetastasen *in vivo* gegenüber der Monotherapie deutlich ab [158]. Bei Sison et al. 2014 sank die Tumorlast im *Xenograft*-Mausmodell durch die Gabe von AMD3100 und Cytarabin gegenüber der Monotherapie mit Cytarabin [140]. Im ALL-Mausmodell führte der Einsatz von Vincristin in Kombination mit AMD11070 zu einer Reduktion der leukämischen Zellen im Blutkreislauf und Leber sowie einem signifikant längeren Gesamtüberleben gegenüber der Monotherapie [141]. Auch bei Prostatakrebszellen sind im *Xenograft*-Mausmodell ähnliche Ergebnisse bereits beschrieben [159]. Der in den vorliegenden Versuchen angewendete Transwell Assay wird *in vitro* häufig eingesetzt. Einschränkungen hat er jedoch durch die fehlende Möglichkeit Morphologie, Geschwindigkeit oder Verhalten der Zellen analysieren zu können. Weitere Probleme stellen ungenaue Randbereiche sowie eine inhomogene Zellverteilung dar.

Um die Transwellergebnisse somit genauer bewerten und verifizieren zu können, wurde im Folgenden mit den Sphäroiden ein 3-dimensionales

Mikrometastasenmodell etabliert. In den Ansätzen die SDF-1 α enthielten, konnte gezeigt werden, dass in der Kombination von Zytostatika mit AMD3100 die größte Reduktion der Migration von RMS-Zellen aus den Tumorsphäroiden erreicht werden konnte. Insbesondere bei RD-Sphäroiden war in den Ansätzen mit Doxorubicin und SDF-1 α ein tendenziell verstärktes Migrationsverhalten gegenüber den Ansätzen ohne SDF-1 α erkennbar. In Anlehnung an die Transwellergebnisse spricht dieses Verhalten dafür, dass die durch Doxorubicin bedingte Zunahme der CXCR4-Expression auch funktionell relevant ist. Bei RH30-Zellen konnte dies nicht festgestellt werden, was mitunter durch die geringfügigen Unterschiede in der CXCR4-Expression gegenüber der Kontrolle zu erklären ist. Auch bei den Versuchen mit Vincristin zeigte sich bei beiden RMS-Zelllinien keine klare Abhängigkeit von SDF-1 α . Dieses Verhalten war auch schon im Transwell zu erkennen und passt zu den durchflusszytometrischen Ergebnissen (Zunahme der CXCR4-Expression) nach 48 Stunden. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Monotherapie mit Zytostatika und der Kombination von Zytostatikum und AMD3100 war bei beiden RMS-Zelllinien nicht festzustellen.

Auch wenn in der Literatur noch keine vergleichbaren Sphäroidversuche erfolgt sind, so wurden ähnliche Beobachtungen auch bei anderen Tumorentitäten gemacht. Bei ALL-Zellen führte die vermehrte Expression von CXCR4 nach Chemotherapie *in vitro* zur Abnahme der Chemotherapieresponse und Apoptose, wenn diese in BMS kultiviert wurden. Durch die Gabe von AMD3100 konnte die Therapieresponse wieder verbessert werden [134]. Auch bei Multiplen Myelom, Prostata- und Kolonkarzinomzellen wurden *in vitro* und *in vivo* ähnliche Ergebnisse veröffentlicht [159-161]. In Anlehnung an diese Daten lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass die Modulation der CXCR4-Expression einen möglichen Mechanismus der Chemoresistenz darstellen könnte. Hierfür sind aber noch weitere, insbesondere auch Untersuchungen im Mausmodell und BMS-Kulturen notwendig. Im Vergleich zu den Schwächen des Transwell-Assays besteht bei diesem Modellversuch der Vorteil, dass *in vitro* durch die 3-dimensionale Struktur ein *in vivo* ähnliches Modell erzeugt werden kann, was im Transwell-Assay nur auf 2-dimensionaler Ebene möglich

ist. Die limitierenden Faktoren waren jedoch, dass die Beurteilung der Vincristingruppe durch den Zellzerfall vereinzelt schwierig war und die Radiusmessungen aufgrund des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens, insbesondere im Randbereich, teilweise eingeschränkt wurden. Darüber hinaus wäre ein Vergleich zum Zeitpunkt 0, auf dessen Messung aufgrund des sehr empfindlichen Anwachsverhaltens der Tumorsphäroide verzichtet wurde, noch aussagekräftiger. Des Weiteren zeigen unsere Migrationsergebnisse, dass auch noch andere Faktoren das Migrationsverhalten von RMS-Zellen beeinflussen müssen. Einer dieser Faktoren könnte der bereits angesprochene CXCR7 sein. Auch CXCR7 wird auf RMS-Zellen exprimiert und neben CXCL11 auch durch CXCL12 (SDF-1) aktiviert [81]. Weitere Untersuchungen sind essentiell, um regulatorische Effekte der CXCR4-CXCR7-CXCL12-Achse besser zu verstehen.

4.4 Kinetik der CXCR4-Expression

Wie von Guo et. al 2016 bereits postuliert, spielen neben epigenetischen und transkriptionellen, auch autokrine Mechanismen bei der Regulation der CXCR4/CXCL12 Expression eine Rolle [162]. Bei den Messungen zeigten alle untersuchten Zytostatika einen modulatorischen Einfluss auf die Expression von CXCR4 bei RMS-Zellen. Es sind diverse Moleküle bekannt die eine fördernde Wirkung auf die Transkription von CXCR4 haben [69]. Hierzu zählen der *Nuclear respiratory factor 1 (NRF-1)* [163] und das *specificity protein 1 (Sp-1)* [164] sowie Hypoxie, mitunter beim RMS [165-167]. Neueren Erkenntnissen nach spielt bei der Oberflächenexpression von CXCR4 auch die SGK3 eine wichtige Rolle [98, 99]. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb nun erstmals, die mRNA Expression von SGK3 unter dem Einfluss von Zytostatika bei RMS-Zelllinien untersucht. Hierbei konnte bei allen eingesetzten Zytostatika ein dosisabhängiges Expressionsverhalten gezeigt werden. Steigende Konzentrationen von Doxorubicin führten zu einer Zunahme der SGK3-Expression auf mRNA-Ebene sowie der Oberflächenexpression von CXCR4. Bei Vincristin war tendenziell ein gegenläufiger Effekt zu erkennen. Bei RD-Zellen nahmen beide in höheren Konzentrationen tendenziell zu. Bei

Carboplatin und Dactinomycin konnte kein Zusammenhang ermittelt werden. Im Tumorgewebe wird durch die Hypoxie der Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor-1 α* (HIF-1 α) hochreguliert, was wiederum zu einer erhöhten Expression von CXCR4 und in Folge mitunter zur vermehrten Bildung von Metastasen führt [168]. In der Tumorthherapie führen verschiedene Substanzen wie die Gamma-Strahlung sowie einzelne Zytostatika zu DNA-Schäden und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Es ist hinlänglich bekannt, dass Doxorubicin zur Bildung von ROS führt sowie einen Einfluss auf den PI3K/Akt-Signalweg hat [169, 170]. ROS wird darüber hinaus auch mit einer Expressionserhöhung von SGK3 in Verbindung gebracht [84]. In Einklang mit den Expressionsdaten von CXCR4 könnte insbesondere Doxorubicin durch die Induktion des PI3K/AKT-Signalwegs über die SGK3 zu einer Reduktion des Abbaus von CXCR4 und damit zu einer Zunahme der Oberflächenexpression führen. Bei Vincristin und den anderen Chemotherapeutika konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der ROS Bildung und der SGK3 Expression hergestellt werden.

Zusammenfassend konnte auf transkriptioneller Ebene ein modulatorischer Einfluss von Zytostatika auf SGK3 und darüber hinaus bei Doxorubicin und Vincristin eine mögliche Verbindung zur Modulation der Ubiquitinierung und somit zum Abbau von CXCR4 auf der Zelloberfläche hergestellt werden. Wie oben bereits postuliert und in Zusammenschau mit anderen Arbeiten legen auch diese Ergebnisse nahe, dass die Chemotherapie-induzierte Modulation von CXCR4 durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt wird. Der Einfluss der in der vorliegenden Arbeit untersuchten SGK3 auf die Proteinexpression von CXCR4 ist hierbei Gegenstand aktueller Untersuchungen. Um einen möglichen Signalweg weiter verifizieren zu können, sollte in einem zukünftigen Setting die PI3-Kinase, die Quantifizierung der SGK3 auch auf der Proteinebene, sowie eine Bestimmung von AIP4 in Korrelation zu SGK3 und CXCR4 nach der Behandlung mit Zytostatika erfolgen.

4.5 Klinische Relevanz

Die Metastasierung gilt als führender Mortalitätsfaktor bei Tumorerkrankungen [171]. In Metaanalysen von Brustkrebs-, Lungenkrebs-, Osteosarkom- und Sarkom-Patienten korreliert eine hohe CXCR4-Expression mit einem schlechteren Outcome, einer höheren Metastasierungsrate und schlechteren Prognose [172-175]. Bei RMS zeigte eine klinische Studie mit 40 Patienten im medianen Alter von 65,5 Monaten, dass eine hohe CXCR4-Expression mit einer ungünstigeren Lage des Primärtumors, einem fortgeschrittenen Stadium, Knochenmarkbefall und verringertem ereignisfreiem Gesamtüberleben assoziiert ist [82]. Die von Oberlin et al. 2008 publizierten Daten von an RMS erkrankten Kindern zeigen, dass Metastasen hauptsächlich in den Lymphknoten, der Lunge und des Knochenmarks lokalisiert waren [176]. Wie bereits erwähnt wird in all diesen Orten SDF-1 sekretiert, was auf eine Chemokin-abhängige Metastasierung hinweist [177].

Das Verständnis der molekularen Mechanismen von CXCR4 und deren mögliche Bedeutung für die Metastasierung, ist für die Etablierung neuer Therapieoptionen bei vielen Tumorentitäten im klinischen Setting somit von großer Bedeutung. Wie bei anderen Untersuchungen bereits festgestellt, müssen hierbei auch die pro-metastatischen modulatorischen Einflüsse durch Bestrahlung und/oder Zytostatika durch die Induktion von u.a. Chemokinen, Metallproteinasen und Wachstumsfaktoren beachtet werden [132, 178-180]. Erste Hinweise auf die klinische Relevanz beim RMS hierzu ergab die bereits diskutierte Arbeit von Strahm et al. 2008 [78]. Ein möglicher Zusammenhang von CXCR4 und Chemotherapieantwort konnte beim RMS bisher allerdings nicht beobachtet werden [137].

5 Zusammenfassung

Bei fortgeschrittenen Stadien des Rhabdomyosarkom (RMS) im Kindesalter konnte in den letzten Jahren keine weitere relevante Verbesserung der Prognose mehr erreicht werden. Die gängigen Therapieoptionen sind ausgeschöpft, deren Weiterentwicklung sowie die Implementierung neuer therapeutischer Verfahren dringend erforderlich.

Bei vielen Tumorentitäten wurde die große Bedeutung des CXC-Motiv Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) bei der Metastasierung, Adhäsion und Angiogenese in *vitro* und in *vivo* Modellen bereits mehrfach beschrieben. Auch ein pro-metastatischer Einfluss von Zytostatika und Bestrahlung durch die Induktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren konnte bereits gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher bei RMS-Zellen untersucht, inwieweit Zytostatika Einfluss auf die Expression von CXCR4 haben. Aufbauend darauf, ob eine Kombination von CXCR4-Inhibition und Chemotherapie eine neue/erweiterte Therapiestrategie bei der Behandlung des RMS darstellen kann. Dabei konnte erstmals bei den RMS-Zelllinien RH30 (alveoläres Rhabdomyosarkom) sowie der RD-Zelllinie (embryonales Rhabdomyosarkom) gezeigt werden, dass Chemotherapeutika einen modulatorischen Einfluss auf die Expression von CXCR4 haben. Dieser war abhängig von der Zelllinie, der Behandlungszeit sowie der Pharmakodynamik des Zytostatikums. In der Kombinationsanwendung von Zytostatika mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 konnte, durch die reversible Bindung an CXCR4, eine Reduktion von CXCR4 positiven Zellen gegenüber der Monotherapie festgestellt werden. In daran anschließenden funktionellen Untersuchungen hatte das Expressionslevel von CXCR4 maßgeblichen Einfluss auf das Migrationsverhalten von RMS-Zellen. Dieses Verhalten konnte bereits in anderen Tumorentitäten gezeigt werden. Darüber hinaus reduzierte die Kombination von Zytostatika mit AMD3100 die Migration von RMS-Zellen gegenüber der Kontrolle ohne Behandlung, vereinzelt auch gegenüber der Monotherapie. Präklinische Untersuchungen zeigen, dass durch die Gabe von CXCR4 Inhibitoren die therapeutische Wirkung von Chemotherapeutika

verbessert werden kann, indem sie die Interaktion mit dem Stroma Gewebe über CXCL12 unterbrechen. In Anlehnung daran lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Modulation der CXCR4-Expression einen möglichen Mechanismus der Chemoresistenz beim RMS darstellen könnte.

Des Weiteren konnte ein modulatorischer Einfluss von Zytostatika auf die Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 3 (SGK3) nachgewiesen werden. Außerdem konnte bei Doxorubicin und Vincristin eine mögliche Verbindung zum Expressionsverhalten von CXCR4 hergestellt werden. Die beteiligten Signalmechanismen hierbei sind jedoch noch unklar.

In Übereinstimmung mit der Literatur scheinen die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten vielversprechend. Insbesondere hinsichtlich ihrer Bedeutung für fortgeschrittene Stadien des RMS in Bezug auf die Metastasierung und Chemoresistenz. Allerdings legen die vorliegenden Ergebnisse auch nahe, dass eine Chemotherapie-induzierte Modulation von CXCR4 durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt wird. Im Vorfeld translationaler Überlegungen, sind somit zunächst weitere Untersuchungen im Mausmodell sowie Analysen an Tumorproben in Korrelation zur Vorbehandlung dringend erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Fuchs, J., *Solide Tumoren im Kindesalter Grundlagen - Diagnostik - Therapie in Onkologie*. 2012, Schattauer GmbH: Stuttgart.
2. Weihkopf, T., et al., *Incidence and time trends of soft tissue sarcomas in German children 1985–2004 – A report from the population-based German Childhood Cancer Registry*. *European Journal of Cancer*, 2008. **44**(3): p. 432-440.
3. Ognjanovic, S., et al., *Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005*. *Cancer*, 2009. **115**(18): p. 4218-26.
4. Ries, L.A.G., et al., *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995*, 1999.
5. Leaphart, C. and D. Rodeberg, *Pediatric surgical oncology: Management of rhabdomyosarcoma*. *Surgical Oncology*, 2007. **16**(3): p. 173-185.
6. Merlino, G. and L.J. Helman, *Rhabdomyosarcoma--working out the pathways*. *Oncogene*, 1999. **18**(38): p. 5340-8.
7. Egas-Bejar, D. and W.W. Huh, *Rhabdomyosarcoma in adolescent and young adult patients: current perspectives*. *Adolesc Health Med Ther*, 2014. **5**: p. 115-25.
8. Taulli, R., et al., *Validation of met as a therapeutic target in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma*. *Cancer Res*, 2006. **66**(9): p. 4742-9.
9. Taylor, A.C., et al., *p53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines*. *Medical and Pediatric Oncology*, 2000. **35**(2): p. 96-103.
10. Iolascon, A., et al., *Analysis of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (CDKN2A, CDKN2B, and CDKN2C) in childhood rhabdomyosarcoma*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1996. **15**(4): p. 217-222.
11. Yoo, J. and R.A. Robinson, *H-ras and K-ras mutations in soft tissue sarcoma*. *Cancer*, 1999. **86**(1): p. 58-63.
12. Stratton, M.R., et al., *Detection of Point Mutations in N-ras and K-ras Genes of Human Embryonal Rhabdomyosarcomas Using Oligonucleotide Probes and the Polymerase Chain Reaction*. *Cancer Research*, 1989. **49**(22): p. 6324-6327.
13. Xia, S.J., J.G. Pressey, and F.G. Barr, *Molecular pathogenesis of rhabdomyosarcoma*. *Cancer Biol Ther*, 2002. **1**(2): p. 97-104.
14. Tarnowski, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts*. *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(10): p. 1328-43.
15. Zibat, A., et al., *Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma*. *Oncogene*, 2010. **29**(48): p. 6323-30.
16. Boehme, K.A., et al., *Targeting hedgehog signalling by arsenic trioxide reduces cell growth and induces apoptosis in rhabdomyosarcoma*. *Int J Oncol*, 2016. **48**(2): p. 801-12.
17. Ruymann, F.B., et al., *Congenital anomalies associated with rhabdomyosarcoma: an autopsy study of 115 cases. A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Committee (representing the Children's Cancer Study Group, the Pediatric Oncology Group, the United Kingdom*

- Children's Cancer Study Group, and the Pediatric Intergroup Statistical Center*). *Med Pediatr Oncol*, 1988. **16**(1): p. 33-9.
18. Miller, R.W. and J.H. Rubinstein, *Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome*. *American Journal of Medical Genetics*, 1995. **56**(1): p. 112-115.
 19. Hennekam, R.C., *Costello syndrome: an overview*. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2003. **117C**(1): p. 42-8.
 20. Ferrari, A., et al., *Soft-tissue sarcomas in children and adolescents with neurofibromatosis type 1*. *Cancer*, 2007. **109**(7): p. 1406-12.
 21. Sung, L., et al., *Neurofibromatosis in children with Rhabdomyosarcoma: a report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma study IV*. *J Pediatr*, 2004. **144**(5): p. 666-8.
 22. Li, F.P. and J.F. Fraumeni, Jr., *Prospective study of a family cancer syndrome*. *Jama*, 1982. **247**(19): p. 2692-4.
 23. Smith, A.C., et al., *Association of alveolar rhabdomyosarcoma with the Beckwith-Wiedemann syndrome*. *Pediatr Dev Pathol*, 2001. **4**(6): p. 550-8.
 24. Dagher, R. and L. Helman, *Rhabdomyosarcoma: an overview*. *Oncologist*, 1999. **4**(1): p. 34-44.
 25. Scrabble, H., et al., *Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1989. **1**(1): p. 23-35.
 26. Dasgupta, R. and D.A. Rodeberg, *Update on rhabdomyosarcoma*. *Semin Pediatr Surg*, 2012. **21**(1): p. 68-78.
 27. Breitfeld, P.P. and W.H. Meyer, *Rhabdomyosarcoma: new windows of opportunity*. *Oncologist*, 2005. **10**(7): p. 518-27.
 28. Cao, L., et al., *Genome-wide identification of PAX3-FKHR binding sites in rhabdomyosarcoma reveals candidate target genes important for development and cancer*. *Cancer Res*, 2010. **70**(16): p. 6497-508.
 29. Davicioni, E., et al., *Molecular classification of rhabdomyosarcoma--genotypic and phenotypic determinants of diagnosis: a report from the Children's Oncology Group*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(2): p. 550-64.
 30. Sorensen, P.H.B., et al., *PAX3-FKHR and PAX7-FKHR Gene Fusions Are Prognostic Indicators in Alveolar Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group*. *Journal of Clinical Oncology*, 2002. **20**(11): p. 2672-2679.
 31. Barr, F.G., et al., *Genetic Heterogeneity in the Alveolar Rhabdomyosarcoma Subset without Typical Gene Fusions*. *Cancer Research*, 2002. **62**(16): p. 4704-4710.
 32. Davicioni, E., et al., *Gene expression profiling for survival prediction in pediatric rhabdomyosarcomas: a report from the children's oncology group*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(7): p. 1240-6.
 33. Williamson, D., et al., *Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(13): p. 2151-8.
 34. Missiaglia, E., et al., *PAX3/FOXO1 fusion gene status is the key prognostic molecular marker in rhabdomyosarcoma and significantly improves current risk stratification*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(14): p. 1670-7.
 35. Treuner, J. and E. Koscielniak, *Therapieoptimierungsstudie mit Einsatz von Chemo- und Strahlentherapie - Cooperative Weichteilsarcoma Studiengruppe (CWS)-2002 P, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH)*. 2003.
 36. Modritz, D., et al., *Treatment for soft tissue sarcoma in childhood and*

- adolescence. Wiener klinische Wochenschrift, 2005. **117**(5-6): p. 196-209.
37. Dantonello, T.M., et al., *Initial patient characteristics can predict pattern and risk of relapse in localized rhabdomyosarcoma*. J Clin Oncol, 2008. **26**(3): p. 406-13.
 38. Sebire, N.J. and M. Malone, *Myogenin and MyoD1 expression in paediatric rhabdomyosarcomas*. Journal of Clinical Pathology, 2003. **56**(6): p. 412-416.
 39. Fuchs, J., et al., *Treatment and outcome of patients suffering from perineal/perianal rhabdomyosarcoma: results from the CWS trials--retrospective clinical study*. Ann Surg, 2014. **259**(6): p. 1166-72.
 40. Seitz, G., et al., *Treatment efficiency, outcome and surgical treatment problems in patients suffering from localized embryonal bladder/prostate rhabdomyosarcoma: a report from the Cooperative Soft Tissue Sarcoma trial CWS-96*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **56**(5): p. 718-24.
 41. Urla, C., et al., *Successful in vivo tumor visualization using fluorescence laparoscopy in a mouse model of disseminated alveolar rhabdomyosarcoma*. Surg Endosc, 2015. **29**(5): p. 1105-14.
 42. Armeanu-Ebinger, S., et al., *PET/MR imaging and optical imaging of metastatic rhabdomyosarcoma in mice*. J Nucl Med, 2014. **55**(9): p. 1545-51.
 43. Raney, R.B., et al., *Rhabdomyosarcoma and undifferentiated sarcoma in the first two decades of life: a selective review of intergroup rhabdomyosarcoma study group experience and rationale for Intergroup Rhabdomyosarcoma Study V*. J Pediatr Hematol Oncol, 2001. **23**(4): p. 215-20.
 44. Mattke, A.C., et al., *Does the time-point of relapse influence outcome in pediatric rhabdomyosarcomas?* Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(7): p. 772-6.
 45. Meza, J.L., et al., *Analysis of prognostic factors in patients with nonmetastatic rhabdomyosarcoma treated on intergroup rhabdomyosarcoma studies III and IV: the Children's Oncology Group*. J Clin Oncol, 2006. **24**(24): p. 3844-51.
 46. Joshi, D., et al., *Age is an independent prognostic factor in rhabdomyosarcoma: a report from the Soft Tissue Sarcoma Committee of the Children's Oncology Group*. Pediatr Blood Cancer, 2004. **42**(1): p. 64-73.
 47. Sultan, I., et al., *Comparing adult and pediatric rhabdomyosarcoma in the surveillance, epidemiology and end results program, 1973 to 2005: an analysis of 2,600 patients*. J Clin Oncol, 2009. **27**(20): p. 3391-7.
 48. Klingebiel, T., et al., *Treatment of children with metastatic soft tissue sarcoma with oral maintenance compared to high dose chemotherapy: Report of the HD CWS-96 trial*. Pediatric Blood & Cancer, 2008. **50**(4): p. 739-745.
 49. Seitz, G., et al., *Outcome, Treatment, and Treatment Failures in Patients Suffering Localized Embryonal Paratesticular Rhabdomyosarcoma: Results From the "Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe" Trials CWS-86, -91, -96, and -2002P*. Ann Surg, 2015.
 50. Perkins, S.M., et al., *Outcome for children with metastatic solid tumors over the last four decades*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100396.
 51. Carli, M., et al., *European intergroup studies (MMT4-89 and MMT4-91) on childhood metastatic rhabdomyosarcoma: final results and analysis of prognostic factors*. J Clin Oncol, 2004. **22**(23): p. 4787-94.
 52. Koscielniak, E., M. Morgan, and J. Treuner, *Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management*. Paediatr Drugs, 2002. **4**(1): p. 21-8.
 53. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
 54. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure,*

- interactions, and antagonism. Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 787-820.
55. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 217-42.
 56. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev*, 2000. **52**(1): p. 145-76.
 57. Murphy, K.P., et al., *Janeway's immunobiology*. 8. ed. 2011: Garland Science. XIX, 868 S.
 58. Townson, D.H. and A.R. Liptak, *Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. Reprod Biol Endocrinol*, 2003. **1**: p. 94.
 59. Yoshie, O., T. Imai, and H. Nomiya, *Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. J Leukoc Biol*, 1997. **62**(5): p. 634-44.
 60. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. 2012, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
 61. Mantovani, A., *The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol Today*, 1999. **20**(6): p. 254-7.
 62. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. Nature*, 1998. **393**(6685): p. 595-9.
 63. Ratajczak, M.Z., et al., *Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. Stem Cells*, 2003. **21**(3): p. 363-71.
 64. Sun, X., et al., *CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. Cancer metastasis reviews*, 2010. **29**(4): p. 709-722.
 65. Stumm, R.K., et al., *A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. J Neurosci*, 2002. **22**(14): p. 5865-78.
 66. Hesselgesser, J., et al., *Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity. J Immunol*, 1998. **160**(2): p. 877-83.
 67. Yu, L., et al., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. Gene*, 2006. **374**: p. 174-179.
 68. Kucia, M., et al., *CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. J Mol Histol*, 2004. **35**(3): p. 233-45.
 69. Busillo, J.M. and J.L. Benovic, *Regulation of CXCR4 signaling. Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(4): p. 952-63.
 70. Chatterjee, S., B. Behnam Azad, and S. Nimmagadda, *The intricate role of CXCR4 in cancer. Adv Cancer Res*, 2014. **124**: p. 31-82.
 71. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science*, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
 72. Diaz, G.A. and A.V. Gulino, *WHIM syndrome: a defect in CXCR4 signaling. Curr Allergy Asthma Rep*, 2005. **5**(5): p. 350-5.
 73. Domanska, U.M., et al., *A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. Eur J Cancer*, 2013. **49**(1): p. 219-30.
 74. Zlotnik, A., *Chemokines and cancer. Int J Cancer*, 2006. **119**(9): p. 2026-9.
 75. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature*, 2001. **410**(6824): p. 50-6.
 76. Liang, Z., et al., *CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor*

- angiogenesis through Akt signaling pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **359**(3): p. 716-22.
77. Chu, C.Y., et al., *Involvement of matrix metalloproteinase-13 in stromal-cell-derived factor 1 alpha-directed invasion of human basal cell carcinoma cells*. *Oncogene*, 2007. **26**(17): p. 2491-501.
 78. Strahm, B., et al., *The CXCR4-SDF1alpha axis is a critical mediator of rhabdomyosarcoma metastatic signaling induced by bone marrow stroma*. *Clin Exp Metastasis*, 2008. **25**(1): p. 1-10.
 79. Libura, J., et al., *CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis, and adhesion*. *Blood*, 2002. **100**(7): p. 2597-606.
 80. Miyoshi, K., et al., *Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma*. *Hum Pathol*, 2014. **45**(9): p. 1900-9.
 81. Grymula, K., et al., *Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(11): p. 2554-68.
 82. Diomedi-Camassei, F., et al., *Clinical significance of CXC chemokine receptor-4 and c-Met in childhood rhabdomyosarcoma*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(13): p. 4119-27.
 83. Mukherjee, D. and J. Zhao, *The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis*. *American Journal of Cancer Research*, 2013. **3**(1): p. 46-57.
 84. Kobayashi, T., et al., *Characterization of the structure and regulation of two novel isoforms of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase*. *Biochem J*, 1999. **344**(Pt 1): p. 189-97.
 85. Webster, M.K., et al., *Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(4): p. 2031-40.
 86. Loffing, J., S.Y. Flores, and O. Staub, *Sgk kinases and their role in epithelial transport*. *Annu Rev Physiol*, 2006. **68**: p. 461-90.
 87. Xu, J., et al., *Regulation of cytokine-independent survival kinase (CISK) by the Phox homology domain and phosphoinositides*. *J Cell Biol*, 2001. **154**(4): p. 699-705.
 88. Lang, F., et al., *(Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms*. *Physiol Rev*, 2006. **86**(4): p. 1151-78.
 89. Bruhn, M.A., et al., *Second AKT: the rise of SGK in cancer signalling*. *Growth Factors*, 2010. **28**(6): p. 394-408.
 90. Waldegger, S., et al., *Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997. **94**(9): p. 4440-4445.
 91. Tessier, M. and J.R. Woodgett, *Serum and glucocorticoid-regulated protein kinases: variations on a theme*. *J Cell Biochem*, 2006. **98**(6): p. 1391-407.
 92. Moniz, L.S. and B. Vanhaesebroeck, *AKT-ing out: SGK kinases come to the fore*. *Biochem J*, 2013. **452**(3): p. e11-3.
 93. Sheppard, K., et al., *Targeting PI3 kinase/AKT/mTOR signaling in cancer*. *Crit Rev Oncog*, 2012. **17**(1): p. 69-95.
 94. Lu, Y., H. Wang, and G.B. Mills, *Targeting PI3K-AKT pathway for cancer therapy*. *Rev Clin Exp Hematol*, 2003. **7**(2): p. 205-28.
 95. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway*

- in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
96. Mills, G.B., et al., *The role of genetic abnormalities of PTEN and the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast and ovarian tumorigenesis, prognosis, and therapy*. Semin Oncol, 2001. **28**(5 Suppl 16): p. 125-41.
 97. Sommer, E.M., et al., *Elevated SGK1 predicts resistance of breast cancer cells to Akt inhibitors*. Biochem J, 2013. **452**(3): p. 499-508.
 98. Marchese, A., et al., *The E3 Ubiquitin Ligase AIP4 Mediates Ubiquitination and Sorting of the G Protein-Coupled Receptor CXCR4*. Developmental Cell, 2003. **5**(5): p. 709-722.
 99. Slagsvold, T., et al., *CISK attenuates degradation of the chemokine receptor CXCR4 via the ubiquitin ligase AIP4*. Embo j, 2006. **25**(16): p. 3738-49.
 100. Herdegen, T., *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. 2013, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart.
 101. Lüllmann, H., et al., *Pharmakologie und Toxikologie 2010*, Stuttgart Georg Thieme Verlag KG.
 102. Wu, M.H. and B.Y. Yung, *Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of actinomycin D in HeLa cells*. Eur J Pharmacol, 1994. **270**(2-3): p. 203-12.
 103. Hatse, S., et al., *Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4*. FEBS Letters, 2002. **527**(1-3): p. 255-262.
 104. Teicher, B.A. and S.P. Fricker, *CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(11): p. 2927-31.
 105. De Clercq, E., et al., *Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(4): p. 668-74.
 106. Wong, R.S., et al., *Comparison of the potential multiple binding modes of bicyclam, monocyclam, and noncyclam small-molecule CXC chemokine receptor 4 inhibitors*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(6): p. 1485-95.
 107. Hendrix, C.W., et al., *Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(6): p. 1667-73.
 108. Uy, G.L., et al., *A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **119**(17): p. 3917-24.
 109. Chambon, F., et al., *Mobilization of hematopoietic stem cells by plerixafor alone in children: a sequential Bayesian trial*. Transfus Apher Sci, 2013. **49**(3): p. 453-8.
 110. Srinivasan, A., et al., *Phase I study of the safety and pharmacokinetics of plerixafor in children undergoing a second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for relapsed or refractory leukemia*. Biol Blood Marrow Transplant, 2014. **20**(8): p. 1224-8.
 111. Jantunen, E. and V. Varmavuo, *Plerixafor for mobilization of blood stem cells in autologous transplantation: an update*. Expert Opin Biol Ther, 2014. **14**(6): p. 851-61.
 112. Taylor, A.C., et al., *P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines*. Med Pediatr Oncol, 2000. **35**(2): p. 96-103.
 113. Douglass, E.C., et al., *A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma*. Cytogenet Cell Genet, 1987. **45**(3-4): p. 148-55.
 114. Gibson, A.A., et al., *Selective sensitization to DNA-damaging agents in a human rhabdomyosarcoma cell line with inducible wild-type p53*

- overexpression*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(1): p. 145-52.
115. Hinson, A.R., et al., *Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 183.
 116. Hallbach, J., *Klinische Chemie und Hämatologie biomedizinische Analytik für MTLA und Studium*. 3., überarb. Aufl. ed. 2011, Stuttgart Georg Thieme Verlag KG. XVI, 503 S.
 117. Livak, K.J., et al., *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. PCR Methods Appl, 1995. **4**(6): p. 357-62.
 118. Lee, L.G., C.R. Connell, and W. Bloch, *Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes*. Nucleic Acids Research, 1993. **21**(16): p. 3761-3766.
 119. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
 120. Pfaffl, M.W., *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum, 2004. **1**(10): p. 92-5.
 121. Filzmayer, C., *Einfluss von natürlichen und modifizierten Interferonen auf die Hepatitis B und Delta Virus Infektion und Effekte der viralen Replikation auf die angeborene Immunantwort*, in *Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät*. 2011, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. p. 156.
 122. Vinci, M., et al., *Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents*. Methods Mol Biol, 2013. **986**: p. 253-66.
 123. Vinci, M., et al., *Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation*. BMC Biol, 2012. **10**: p. 29.
 124. Alamia, S., et al., *3D-Sphäroidkulturen für die onkologische Wirkstoffforschung*. BIOSpektrum, 2015. **21**(2): p. 194-195.
 125. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 839-45.
 126. Kim, J.B., *Three-dimensional tissue culture models in cancer biology*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 365-77.
 127. Regenbogen, S., et al., *Cytotoxic drugs in combination with the CXCR4 antagonist AMD3100 as a potential treatment option for pediatric rhabdomyosarcoma*. Int J Oncol, 2020.
 128. Chetram, M.A. and C.V. Hinton, *ROS-mediated regulation of CXCR4 in cancer*. Front Biol (Beijing), 2013. **8**(3).
 129. Herrmann, D., et al., *Susceptibility of rhabdomyosarcoma cells to macrophage-mediated cytotoxicity*. Oncoimmunology, 2012. **1**(3): p. 279-286.
 130. Muller, A., et al., *Chemokine receptors in head and neck cancer: association with metastatic spread and regulation during chemotherapy*. Int J Cancer, 2006. **118**(9): p. 2147-57.
 131. Kim, M., et al., *CXCR4 signaling regulates metastasis of chemoresistant melanoma cells by a lymphatic metastatic niche*. Cancer Res, 2010. **70**(24): p. 10411-21.
 132. Ratajczak, M.Z., et al., *Induction of a tumor-metastasis-receptive microenvironment as an unwanted and underestimated side effect of treatment by chemotherapy or radiotherapy*. Journal of Ovarian Research, 2013. **6**: p. 95-95.

133. Shaked, Y., et al., *Rapid chemotherapy-induced acute endothelial progenitor cell mobilization: implications for antiangiogenic drugs as chemosensitizing agents*. *Cancer Cell*, 2008. **14**(3): p. 263-73.
134. Sison, E.A., et al., *Dynamic chemotherapy-induced upregulation of CXCR4 expression: a mechanism of therapeutic resistance in pediatric AML*. *Mol Cancer Res*, 2013. **11**(9): p. 1004-16.
135. Xu, L., et al., *Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1alpha, CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer*. *Cancer Res*, 2009. **69**(20): p. 7905-10.
136. Lev, D.C., et al., *Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis in vivo*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(11): p. 2092-100.
137. Jankowski, K., et al., *Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy*. *Cancer Res*, 2003. **63**(22): p. 7926-35.
138. Liu, G., et al., *Specific chemotherapeutic agents induce metastatic behaviour through stromal- and tumour-derived cytokine and angiogenic factor signalling*. *J Pathol*, 2015. **237**(2): p. 190-202.
139. Li, J., et al., *Overexpression of CXCR4 is significantly associated with cisplatin-based chemotherapy resistance and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer*. *BMB Reports*, 2014. **47**(1): p. 33-38.
140. Sison, E.A., et al., *Plerixafor as a chemosensitizing agent in pediatric acute lymphoblastic leukemia: efficacy and potential mechanisms of resistance to CXCR4 inhibition*. *Oncotarget*, 2014. **5**(19): p. 8947-58.
141. Parameswaran, R., et al., *Combination of drug therapy in acute lymphoblastic leukemia with a CXCR4 antagonist*. *Leukemia*, 2011. **25**(8): p. 1314-23.
142. De Clercq, E., *Inhibition of HIV infection by bicyclams, highly potent and specific CXCR4 antagonists*. *Mol Pharmacol*, 2000. **57**(5): p. 833-9.
143. Stamatopoulos, B., et al., *AMD3100 disrupts the cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and a mesenchymal stromal or nurse-like cell-based microenvironment: pre-clinical evidence for its association with chronic lymphocytic leukemia treatments*. *Haematologica*, 2012. **97**(4): p. 608-15.
144. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(42): p. 35760-6.
145. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. *J Exp Med*, 2006. **203**(9): p. 2201-13.
146. Heesen, M., et al., *Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1*. *Immunogenetics*, 1998. **47**(5): p. 364-70.
147. Libert, F., et al., *Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor*. *Genomics*, 1991. **11**(1): p. 225-7.
148. Kalatskaya, I., et al., *AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties*. *Mol Pharmacol*, 2009. **75**(5): p. 1240-7.
149. Honczarenko, M., et al., *SDF-1 responsiveness does not correlate with CXCR4 expression levels of developing human bone marrow B cells*. *Blood*, 1999. **94**(9): p. 2990-8.
150. Mitra, P., et al., *Loss of chemokine SDF-1alpha-mediated CXCR4 signalling*

- and receptor internalization in human hepatoma cell line HepG2. *Cell Signal*, 2001. **13**(5): p. 311-9.
151. Rabin, R.L., et al., *Chemokine receptor responses on T cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling*. *J Immunol*, 1999. **162**(7): p. 3840-50.
 152. Zhang, L., et al., *Tissue Microenvironment Modulates CXCR4 Expression and Tumor Metastasis in Neuroblastoma*. *Neoplasia*, 2007. **9**(1): p. 36-46.
 153. Wysoczynski, M., et al., *Leukemia inhibitory factor: a newly identified metastatic factor in rhabdomyosarcomas*. *Cancer Res*, 2007. **67**(5): p. 2131-40.
 154. Ling, X., et al., *The CXCR4 antagonist AMD3465 regulates oncogenic signaling and invasiveness in vitro and prevents breast cancer growth and metastasis in vivo*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e58426.
 155. Jung, M.J., et al., *Upregulation of CXCR4 is functionally crucial for maintenance of stemness in drug-resistant non-small cell lung cancer cells*. *Oncogene*, 2013. **32**(2): p. 209-21.
 156. Wong, D., et al., *Targeting CXCR4 with CTCE-9908 inhibits prostate tumor metastasis*. *BMC Urol*, 2014. **14**: p. 12.
 157. Kashima, K., et al., *Inhibition of metastasis of rhabdomyosarcoma by a novel neutralizing antibody to CXC chemokine receptor-4*. *Cancer Sci*, 2014. **105**(10): p. 1343-50.
 158. Mei, L., et al., *Enhanced antitumor and anti-metastasis efficiency via combined treatment with CXCR4 antagonist and liposomal doxorubicin*. *J Control Release*, 2014. **196**: p. 324-31.
 159. Domanska, U.M., et al., *CXCR4 Inhibition with AMD3100 Sensitizes Prostate Cancer to Docetaxel Chemotherapy*. *Neoplasia*, 2012. **14**(8): p. 709-718.
 160. Azab, A.K., et al., *CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy*. *Blood*, 2009. **113**(18): p. 4341-51.
 161. Heckmann, D., et al., *CXCR4 Expression and Treatment with SDF-1 α or Plerixafor Modulate Proliferation and Chemosensitivity of Colon Cancer Cells*. *Translational Oncology*, 2013. **6**(2): p. 124-132.
 162. Guo, F., et al., *CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks*. *Oncogene*, 2016. **35**(7): p. 816-26.
 163. Moriuchi, M., et al., *Cloning and analysis of the promoter region of CXCR4, a coreceptor for HIV-1 entry*. *J Immunol*, 1997. **159**(9): p. 4322-9.
 164. Wegner, S.A., et al., *Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(8): p. 4754-60.
 165. Schioppa, T., et al., *Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia*. *J Exp Med*, 2003. **198**(9): p. 1391-402.
 166. Wang, X., et al., *Hypoxia enhances CXCR4 expression favoring microglia migration via HIF-1 α activation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **371**(2): p. 283-8.
 167. Tarnowski, M., et al., *Regulation of expression of stromal-derived factor-1 receptors: CXCR4 and CXCR7 in human rhabdomyosarcomas*. *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(1): p. 1-14.
 168. Vandercappellen, J., J. Van Damme, and S. Struyf, *The role of CXC chemokines and their receptors in cancer*. *Cancer Lett*, 2008. **267**(2): p. 226-44.
 169. Bezler, M., J.G. Hengstler, and A. Ullrich, *Inhibition of doxorubicin-induced*

- HER3-PI3K-AKT signalling enhances apoptosis of ovarian cancer cells.* Mol Oncol, 2012. **6**(5): p. 516-29.
170. Wallin, J.J., et al., *Nuclear Phospho-Akt Increase Predicts Synergy of PI3K Inhibition and Doxorubicin in Breast and Ovarian Cancer.* Science Translational Medicine, 2010. **2**(48): p. 48ra66-48ra66.
171. Steeg, P.S., *Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges.* Nat Med, 2006. **12**(8): p. 895-904.
172. Zhang, Z., et al., *Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis.* BMC Cancer, 2014. **14**(1): p. 1-8.
173. Liang, J.X., et al., *Chemokine receptor CXCR4 expression and lung cancer prognosis: a meta-analysis.* Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(4): p. 5163-74.
174. Laverdiere, C., et al., *Messenger RNA Expression Levels of CXCR4 Correlate with Metastatic Behavior and Outcome in Patients with Osteosarcoma.* Clinical Cancer Research, 2005. **11**(7): p. 2561-2567.
175. Li, Y.J., et al., *Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis.* Clin Exp Med, 2015.
176. Oberlin, O., et al., *Prognostic factors in metastatic rhabdomyosarcomas: results of a pooled analysis from United States and European cooperative groups.* J Clin Oncol, 2008. **26**(14): p. 2384-9.
177. Schrader, A.J., et al., *CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer.* Br J Cancer, 2002. **86**(8): p. 1250-6.
178. Liang, Y., et al., *Selection with melphalan or paclitaxel (Taxol) yields variants with different patterns of multidrug resistance, integrin expression and in vitro invasiveness.* European Journal of Cancer, 2001. **37**(8): p. 1041-1052.
179. Wang, Z., et al., *Differential effect of anti-apoptotic genes Bcl-xL and c-FLIP on sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to paclitaxel and docetaxel.* Anticancer Res, 2005. **25**(3c): p. 2367-79.
180. Gunjal, P.M., et al., *Evidence for induction of a tumor metastasis-receptive microenvironment for ovarian cancer cells in bone marrow and other organs as an unwanted and underestimated side effect of chemotherapy/radiotherapy.* J Ovarian Res, 2015. **8**.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die vorliegende Dissertation wurde an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin in Tübingen, im Labor der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie unter Betreuung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Guido Seitz und Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Guido Seitz, Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid und mir.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Matias Julian Stagno und Dr. rer. nat. Evi Schmid von mir eigenständig durchgeführt. Die Bilder der Transwellmigration und damit verbundene Messungen erfolgten mit Unterstützung durch Matias Julian Stagno. Die Proben für die RT-PCR wurden von mir vorbereitet, die Messung von Melanie Hauth (Medizinisch-technische Assistentin) durchgeführt. Die Etablierung der 3D-Tumorsphäroide erfolgte nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Sabine Schleicher selbständig durch mich.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Evi Schmid eigenständig durch mich. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Tabellen sowie Grafiken wurden von mir erstellt. Übernommene Abbildungen wurden von mir als solche gekennzeichnet.

Die Veröffentlichung „Cytotoxic drugs in combination with the CXCR4 antagonist AMD3100 as a potential treatment option for pediatric rhabdomyosarcoma“, welche aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangen ist, wurde während des Promotionsverfahrens am 07.08.2019 beim *International Journal of Oncology* eingereicht und am 26.03.2020 zur Publikation angenommen. Entnommene/Modifizierte Abbildungen wurden in der vorliegenden Arbeit entsprechend gekennzeichnet.

Ich versichere, das Manuskript nach Anleitung durch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. G. Seitz und Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Mössingen, den 09. April 2019

Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Regenbogen, S., Stagno, M. J., Schleicher, S., Schilbach, K., Bösmüller, H., Fuchs, J., Schmid, E., Seitz, G. *"Cytotoxic drugs in combination with the CXCR4 antagonist AMD3100 as a potential treatment option for pediatric rhabdomyosarcoma"*. International Journal of Oncology 57, no. 1 (2020): 289-300. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5059>

Danksagung

Herzlichen Dank an Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Fuchs für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung Kinderchirurgie und Kinderurologie, am Universitätsklinikum Tübingen erstellen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Guido Seitz sowie Frau Dr. rer. nat. Evi Schmid für die große Unterstützung und Zusammenarbeit bei diesem Projekt sowie die Geduld und das offene Ohr bei aufkommenden Fragen.

Ein großer Dank gilt Matias Julian Stagno, der mir eine große Hilfe bei der Einarbeitung war und an den ich immer wieder meine Fragen richten konnte. Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe: Melanie Hauth, Dr. rer. nat. Sabine Schleicher und Bettina Kirchner für die großartige Unterstützung bei der Laborarbeit.

Ein großes Dankeschön gilt auch der Kind-Philipp-Stiftung für pädiatrisch-onkologische Forschung im Stifterverband für die Deutsche Wissenschaft, die mir durch das Promotionsstipendium die volle Konzentration auf die Dissertation ermöglicht haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Ganz besonders gilt dieser Dank meinen Eltern.