

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
-Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Rössig-

**Plerixafor: Stammzellmobilisation mit pro-tumorigenen Eigenschaften im  
Ewing Sarkom?**

INAUGURAL – DISSERTATION  
zur  
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Philipp Berning  
aus Münster

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Mathias Herrmann

1. Referentin: Prof. Dr. med. Uta Dirksen

2. Ko-Referent: Prof. Dr. med. Wolfgang Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2017

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Rössig  
Referentin: Prof. Dr. med. Uta Dirksen  
Ko-Referent: Prof. Dr. med. Wolfgang Hartmann  
**ZUSAMMENFASSUNG**

## **Plerixafor: Stammzellmobilisation mit pro-tumorigenen Eigenschaften im Ewing Sarkom?**

Berning, Philipp

In dieser Arbeit wurde der CXCR4 Inhibitor Plerixafor als potentielle therapeutische Substanz in Ewing Sarkom Zellen evaluiert. Das Produkt des EWS/ETS Translokationsgens und dessen sekundär aktivierten Signalwege sind entscheidend für die Pathobiologie des Ewing Sarkoms (EwS). Eine hohe Expression von CXCR4 im EwS korreliert negativ mit dem Gesamtüberleben. Organe mit hoher Expression des Liganden von CXCR4, CXCL12, sind häufige Prädilektionsstellen für Metastasen bei EwS Patienten. In vitro zeigt Plerixafor, wider Erwarten, eine pro-proliferative Wirkung auf EwS Zelllinien und auf primäre EwS Kulturen. Der CXCR4-Agonist CXCL12 hingegen beeinflusste die Zellproliferation nicht, was zeigt, dass der Mechanismus der Tumorzellaktivierung unabhängig von einer CXCR4-CXCL12-Achse sein muss. In der Durchflusszytometrie zeigen die EwS Zellen ein heterogenes Muster von hoher Rezeptordichte (CXCR4 high) bis hin zu nahezu fehlendem Nachweis (CXCR4 low). Eine pro-migratorische Wirkung von Plerixafor auf CXCR4-low Zellen und von CXCL12 auf CXCR4-high Zellen wurde beobachtet. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass der CXCR4 Inhibitor Plerixafor die EwS Zellen mindestens auch über einen CXCR4-vermittelten Weg stimuliert. Plerixafor zeigte aktivierende und CXCR4-vermittelte Effekte auf EGFR, ErbB3, PDGF Rb und Eph Rezeptortyrosinkinasen (RTK). Eine Aktivierung des nachgeschalteten PI3K/AKT-Signalwegs durch Plerixafor wurde gezeigt. Dasatinib, mit inhibitorischer Wirkung auf PDGF Rb, konnte in sehr geringer Konzentration die pro-proliferative Wirkung von Plerixafor aufheben. Für die TKI Dasatinib und Sorafenib konnte eine proliferationshemmende Wirkung auf EwS Zelllinien gezeigt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt eine pro-tumorigene Wirkung des CXCR4 Inhibitors Plerixafor. Sie gibt Anlass, die Effekte von Plerixafor weiterführend zu untersuchen und den klinisch-therapeutischen Einsatz von Plerixafor zur Stammzellmobilisation bei Ewing Sarkom Patienten zu überprüfen.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2017

Ich, Philipp Berning, gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**Plerixafor: Stammzellmobilisation mit pro-tumorigenen Eigenschaften im Ewing Sarkom?**

in der Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Münster unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. med. Uta Dirksen und Frau Dr. med. Jenny Potratz aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Philipp Berning

Münster, den 23.08.2016

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
1.1. DAS EWING SARKOM.....	2
1.1. CHEMOKINE UND CHEMOKINREZEPTOREN.....	5
1.2. REZEPTOR TYROSINKINASEN (RTK) .....	10
1.3. RTK INHIBITOREN .....	11
1.4. ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT .....	15
2. Material und Methoden	16
2.1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	16
2.2. ANTIKÖRPER .....	17
2.3. MATERIAL .....	19
2.3.1. HUMANE TUMORZELLINIEN.....	19
2.3.2. PRIMÄRZELLEN AUS TUMORBIOPSIEN.....	20
2.3.3. GERÄTE.....	20
2.3.4. VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	21
2.3.5. PUFFER UND MEDIEN .....	22
2.4. SOFTWARE .....	23
2.5. METHODEN .....	23
2.5.1. ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	23
2.5.2. MIGRATIONSVERHALTEN VON ZELLEN .....	25
2.5.3. PROTEINBIOCHEMIE.....	26
2.5.4. DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	30
3. Ergebnisse	32
3.1. DER CXCR4-INHIBITOR PLERIXAFOR STIMULIERT DAS ZELLWACHSTUM.....	32
3.2. DER CXCR4 AGONIST CXCL12 BEEINFLUSST DAS ZELLWACHSTUM NICHT.....	34
3.3. G-CSF (FILGRASTIM) BEEINFLUSST DAS ZELLWACHSTUM NICHT .....	35
3.4. DER CHEMOKINREZEPTOR CXCR4 AUF PROTEINEBENE EXPRIMIERT .....	36
3.5. PLERIXAFOR BEEINFLUSST DIE CXCR4 PROTEINEXPRESSION .....	40
3.6. PLERIXAFOR UND CXCL12 BEEINFLUSSEN DAS MIGRATIONSVERHALTEN .....	43
3.7. WIRKUNG VON PLERIXAFOR AUF SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE UND RTK .....	45
3.7.1. PLERIXAFOR FÜHRT ZUR PHOSPHORYLIERUNG DER PROTEINKINASE AKT.....	45
3.7.2. AKTIVIERUNG VON RTK DURCH PLERIXAFOR.....	46
3.8. DASATINIB UND SORAFENIB HEMMEN DAS ZELLWACHSTUM.....	55
3.9. DASATINIB HEMMT PLERIXAFOR VERMITTELTES ZELLWACHSTUM .....	57
4. Diskussion	59
5. Literaturverzeichnis	69
6. Danksagung	79
7. Lebenslauf	80
8. Eigene Publikationen	81
9. Anhang	I

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Ewing Sarkom

#### 1.1.1. Definition

Ewing Sarkome sind die zweithäufigsten malignen Knochentumoren im Kindes- und Jugendalter. Das mediane Alter bei Diagnose liegt bei 15 Jahren, Fälle mit Diagnosezeitpunkt nach dem 30. Lebensjahr sind beschrieben [1]. Das Geschlechterverhältnis liegt bei 1,3:1 für das männliche Geschlecht [2,3]. Die Ewing Sarkom Familie (Ewing sarcoma family of tumors; EFT) besteht neben dem Ewing Sarkom (EwS) aus dem peripheren neuroektodermalen Tumor (pNET), dem Askin Tumor der Thoraxwand und dem atypischen Ewing Sarkom [4,5]. Nach Terminologie der World Health Organization (WHO) wird diese Gruppe von Tumoren zusammenfassend als „Ewing Sarkom“ bezeichnet [6].

Charakteristisch für das Ewing Sarkom ist eine reziproke, chromosomale Translokation, die zu einem onkogenen Fusionsprotein, bestehend aus dem EWS-Protein und einem Transkriptionsfaktor der ETS-Familie, führt [7]. Diese Translokation liegt in 85-95% der Fälle zwischen dem Chromosom 11 und 22  $t(11;22)(q24;q12)$  und führt zur Bildung des onkogenen Fusionsproteins EWS-FLI1. Fusionsproteine aus dem EWS-Protein und anderen Transkriptionsfaktoren der ETS Familie liegen weniger häufig vor [8]. Weiterhin charakteristisch ist die hohe Expression des CD99 (MIC2) Oberflächenantigens in 95-100% der Fälle [9,10]. Das EWSR1 (Ewing sarcoma breakpoint region 1) Gen kodiert für das ubiquitär exprimierte RNA-bindende EWS-Protein, das als Transkriptionsaktivator durch Bindung von Promoterregionen und durch Interaktionen mit der RNA-Polymerase II die Genexpression beeinflusst [11,12,13]. FLI1 (friend leukemia virus integration site 1) als Mitglied der ETS-Transkriptionsfaktorfamilie ist beteiligt an der Regulation von Zellproliferation, embryonaler Entwicklungsprozesse und Tumorgenese [7]. EWS-ETS Fusionsproteine, meist EWS-FLI1, enthalten die DNA-bindenden Eigenschaften des ETS-Transkriptionsfaktors und beeinflussen durch ihren EWS-Anteil die Genexpression. Das EWS-FLI1 Fusionsprotein und die alternativen EWS-ETS-Fusionsproteine sind starke onkogene Transkriptionsregulatoren, deren Wirkung auf verschiedene Zielgene

entscheidend für Tumorgenese und Tumorphänotyp des Ewing Sarkoms ist [14,15,16].

### 1.1.2. Klinik

Das Ewing Sarkom ist am häufigsten in den Beckenknochen und in den Femurdiaphysen lokalisiert. Weniger häufig befallen sind die Diaphysen von Tibia und Fibula, gefolgt von Humerus und Brustwand. Bei etwa 25% der Patienten sind zum Zeitpunkt der Diagnose Metastasen vorhanden und treten überwiegend in der Lunge, gefolgt von Knochen und Knochenmark auf [17]. Die Patienten präsentieren sich klinisch mit lokalisierten, über Wochen bestehenden Knochenschmerzen oder Schwellungen der betroffenen Extremität [18,19]. Die Schmerzintensität nimmt meist im Verlauf zu, insbesondere nachts und unter Belastung. Abhängig von Tumorlokalisierung und Tumorgröße kann es zur Nervenkompression mit entsprechenden Ausfallerscheinungen kommen. In fortgeschrittenen Krankheitsstadien können Fieber, Anämie und Gewichtsverlust auftreten [18,20].

### 1.1.3. Therapie und Prognose

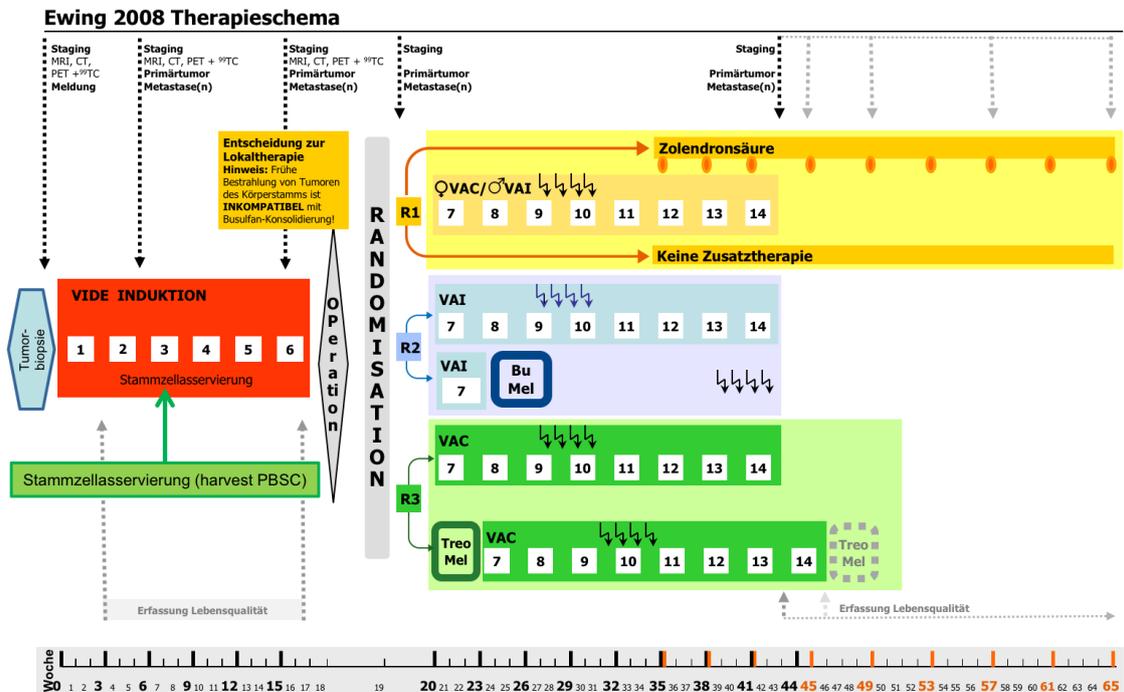
Die Therapie von Patienten mit Ewing Sarkom erfolgt multidisziplinär in spezialisierten Zentren im Rahmen multizentrischer Studien. Die präoperative, neoadjuvante Chemotherapie ist gefolgt von Lokaltherapie und Fortführung der systemischen Chemotherapie. Nach aktuellem Protokoll EWING 2008 der Cooperativen Ewing Sarkom Gruppe der Gesellschaft für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie (GPOH) [21] erhalten alle Patienten sechs Zyklen Induktionschemotherapie mit Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin und Etoposid (VIDE). Es folgt eine vollständige Tumorresektion mit Sicherheitsabstand. In Abhängigkeit von Tumolvolumen und Lokalisation kann eine präoperative Bestrahlung durchgeführt werden. Postoperativ wird eine Bestrahlung bei inkompletter Resektion und ungünstigem histologischem Ansprechen angeschlossen. Bei Inoperabilität, beispielsweise bei nicht-resezierbaren Becken- oder Stammtumoren, stellt die alleinige Bestrahlung eine Alternative dar. Es folgt eine postoperative Erhaltungskemotherapie. Bei gutem histologischen Ansprechen und loka-

lisierter Erkrankung werden Therapieschemata mit Vincristin, Actinomycin und Cyclophosphamid oder Ifosfamid (VAC/VAI) eingesetzt. Patienten mit schlechtem histologischen Ansprechen, pulmonalen Metastasen oder primär disseminierter Erkrankung werden in weiteren Therapiearmen für hohes Risiko bzw. sehr hohes Risiko behandelt. Hier werden neben einer Erhaltungstherapie mit VAI/VAC eine Hochdosis-Chemotherapie (HDT) mit Busulfan und Melphalan bzw. Treosulfan und Melphalan mit anschließender autologer Stammzelltransplantation eingesetzt (Abbildung 1). Die Stammzellasservierung erfolgt während der Induktionschemotherapie. Zur Mobilisation wird in erster Linie Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (GCSF; Filgrastim; z.B. Neupogen®) eingesetzt. Bei unzureichender Mobilisation wird der CXCR4 Inhibitor Plerixafor (AMD3100; z.B. Moboziil®) eingesetzt (Abbildung 1).

Zu den Prognose bestimmenden Faktoren zählen Tumorlokalisierung und Tumorgroße, das Vorhandensein von Metastasen, Patientenalter und histologisches Ansprechen auf die Chemotherapie [17,22]. Durch moderne, multimodale Therapiekonzepte kann heute bei lokalisierter Erkrankung und gutem histologischen Ansprechen ein 3-Jahres Überleben von über 70% für die Patienten erzielt werden [23]. Eine schlechtere Prognose besteht bei ungünstigem histologischen Ansprechen, Tumolvolumen über 200ml, Alter bei Diagnose über 14 Jahre und insbesondere für die 25% der Patienten mit primär metastasierter Erkrankung [17,19,23]. Die Prognose für Patienten mit Skelett- plus Lungenmetastasierung ist für das Überleben besonders ungünstig [24]. Insgesamt reduziert das Vorliegen einer primären Metastasierung die Prognose mit einem 4-Jahres-Überleben von 27% deutlich [24]. Kommt es zu einem Erkrankungsrezidiv, ist das 5-Jahres-Überleben mit 13% noch deutlich ungünstiger [25]. Durch ergänzende Hochdosischemotherapie konnte bei Patienten mit Rezidiv eines Ewing Sarkoms, die ein Ansprechen auf die Standardrezidivtherapie zeigen, ein um 14% verbessertes 2-Jahres-Überleben erzielt werden [26].

Dies zeigt die Notwendigkeit der Erforschung neuer metastasengerichteter Therapieansätze. In der Therapie verschiedener Krebserkrankungen werden be-

reits erfolgreich Rezeptor Tyrosinkinase Inhibitoren eingesetzt. Sie wirken gezielt auf molekulare Zielstrukturen der Tumorzellen und hemmen Signalwege, die an Proliferation und Migration von Tumorzellen beteiligt sind [27,28]. Weitere potentielle Zielstrukturen sind Chemokinrezeptoren [29,30].



**Abbildung 1 Therapiealgorithmus nach dem EWING 2008 Studienprotokoll**

Übersetzt und modifiziert nach dem Ewing 2008 Studienprotokoll [21]. Hervorgehoben dargestellt ist die Stammzellasservierung (harvest PBSC) autologer Stammzellen im Rahmen des Induktionszyklus mit 6 Zyklen VIDE.

### 1.1. Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind, mit einem Molekulargewicht von 8-10kDa, kleine Polypeptid-Moleküle, die Leukozyten- und Endothelzellaktivierung und damit Immunzellmigration und Chemotaxis durch die Bindung G-Protein-gekoppelter Chemokinrezeptoren vermitteln. Chemokinrezeptorinteraktionen mit Chemokinen tragen auch zu tumorunterhaltenden Prozessen wie Zellwachstum, Angiogenese und Metastasierung von Tumoren bei [31,32]. Beschrieben sind etwa 50 humane Chemokine und 20 Chemokinrezeptortypen, die sich anhand der Cysteinreste (C steht für Cystein, X für eine weitere Aminosäure zwischen zwei Cysteinres-

ten) des Amino-Terminus in vier Untergruppen einteilen (CXC, CC, C, und CX3C) [33,34]. Chemokinrezeptoren weisen als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sieben Transmembrandomänen auf, die über extrazelluläre Loops verbunden sind. Die Signaltransduktion führt nach Chemokinbindung und Rezeptorstrukturänderung über G-Protein-Aktivierung schließlich zur Effektorenzymaktivierung [31,34]. Die Liganden-unabhängige Kreuzaktivierung von RTK durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), zu denen auch der Chemokinrezeptor CXCR4 zählt, ist ebenfalls beschrieben [35,36]. Über Adapter-Proteine wie Src Kinasen kommt es zur Transphosphorylierung von RTK, die zur Aktivierung ihrer nachgeschalteten Signalwegen führt, mit Wirkung auf Zellproliferation, Zellüberleben und Angiogenese [37]. Die Transaktivierung der RTK EGFR durch GPCR und nachfolgende Aktivierung des MAPK und des PI3K/Akt/mTor Signalwegs ist für verschiedene solide Tumore beschrieben [38]. Diese Interaktionen sind bislang nur unzulänglich untersucht.

#### 1.1.1. Der Chemokinrezeptor CXCR4

Der CXC-Motiv-Rezeptor Typ 4 (CXCR4 oder CD184) zählt zu den Chemokinrezeptorproteinen. Durch spezifische Ligandenbindung des Chemokins CXCL12 (CXC-Motiv-Chemokin 12), auch SDF-1a (stromal cell-derived factor 1a), werden Prozesse wie Zellmigration, neuronale und kardiale Organogenese, Angiogenese sowie das Homing von hämatopoetischen Stammzellen gesteuert [39].

In Ewing Sarkom Patienten ist die Assoziation hoher CXCR4 Expression mit schlechtem Gesamtüberleben beschrieben [40,41]. Eine positive Korrelation der CXCR4 Expression mit dem Tumolvolumen zum Diagnosezeitpunkt ist außerdem bekannt [41]. Weiterhin konnte eine hohe CXCR4 Expression in Tumorproben von Ewing Sarkom Patienten mit Metastasen festgestellt werden, sodass eine Beteiligung einer SDF-1a-CXCR4-Achse an Metastasierungsprozessen beim Ewing Sarkom angenommen wird [40,42]. Auch weitere pathologische Prozesse werden durch CXCR4 vermittelt. CXCR4 ist auf T-Helferzellen

exprimiert und dient neben dem CCR5 Chemokinrezeptor als Co-Rezeptor für das zelluläre Eindringen HI-Virus [43]. Tumorzellproliferation und Tumorzellmigration von hämatologischen und soliden Tumoren werden auch durch CXCR4 vermittelt [44]. Eine CXCR4 Expression korreliert auch mit schlechter Prognose bei hämatologischen Tumoren [45] und weiteren soliden Tumoren, wie Tumoren der Brust, des Darms sowie Knochen- und Weichgewebssarkomen [46,47,48]. CXCR4 ändert durch Bindung seines Liganden CXCL12 an den N-Terminus seine Konformation. Dies führt zur Aktivierung des gekoppelten heterotrimeren Gi-Protein Komplex mit GTPase Aktivität. Die nachfolgend vom G-Proteinkomplex dissoziierte aktive Ga-GTP Untereinheit aktiviert nachgeschaltete Signalwege [34]. Zu den nachgeschalteten aktivierten Signalwegen zählen MEK1/2, ERK1, JAK/STAT sowie auch der AKT Signalweg, die sowohl Zellproliferation vermitteln als auch Zellmigration durch vermehrte VEGF Sekretion [49,50,51,52].

#### 1.1.2. Das Chemokin CXCL12

Das Chemokin CXCL12, auch stromal cell-derived factor 1a (SDF-1a), zählt zu der Gruppe CXC-Motiv Chemokine [53]. Mehrere, teils organspezifische, Splice-Varianten des CXCL12 sind beschrieben, wobei funktionelle Unterschiede nicht genau geklärt sind. Hohe physiologische Bedeutung haben die Isoformen SDF-1a und SDF-1b [43,54]. CXCL12 wird von Bindegewebs- und Endothelzellen exprimiert und sezerniert. Physiologisch hohe CXCL12 Konzentrationen sind für Knochenmark, Leber, Lunge, Herz und ZNS beschrieben [54,55,56]. Es besteht eine Rezeptor-Liganden Beziehung zwischen den Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 [57]. Abbildung 2 bildet schematisch die Ligand-Rezeptor Interaktion mit Aktivierung nachgeschalteter Signalweg der CXCL12-CXCR4 Achse ab. Als chemotaktisch wirkendes, also an Zellbewegung beteiligtes Chemokin, spielt SDF-1a eine große Rolle bei der Angiogenese, der Organbildung sowie bei der Organ- und Wundheilung [56,58]. Ferner ist eine SDF-1a-CXCR4 Interaktion entscheidend für die Bindung der Stammzellen an ihren Speicherorten. Dieses gilt insbesondere auch für die Hämatopoese und Myelopoese im Knochenmark [43,57,59,60]. Eine Hohe SDF-1a Expression wurde in

Lungen und Knochen(-mark) festgestellt, die gleichzeitig bei Ewing Sarkom Patienten häufige Manifestationsorte von Tumormetastasen sind [41,61].

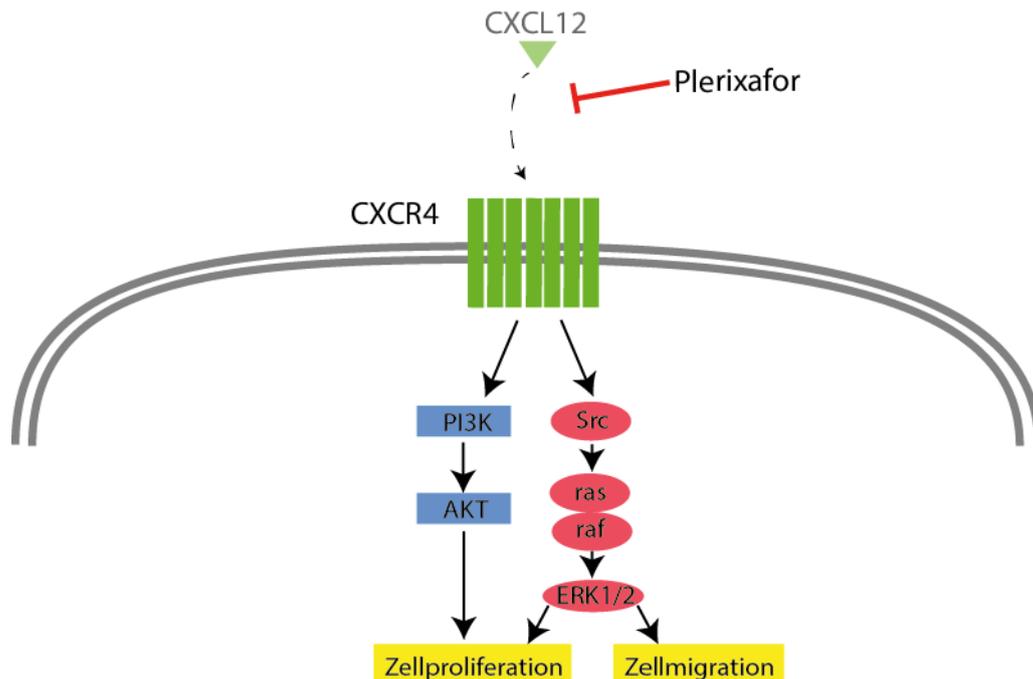
### 1.1.3. Der Granulozyten-stimulierender Faktor (G-CSF) und der Chemokinrezeptor Antagonist Plerixafor (AMD3100, Mobozil®)

G-CSF wird physiologisch bei Entzündungsprozessen von Makrophagen, Endothelzellen und Immunzellen sezerniert [62]. G-CSF wirkt durch Bindung an den transmembranen G-CSF-Rezeptor (CD114) auf hämatopoetischen Stammzellen, myeloiden Progenitorzellen, Granulozyten und Monozyten [63]. Es führt über eine komplexe Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Tyrosinkinasen wie Src Kinasen und des PI3K-Akt-Signalwegs zu Proliferation und Differenzierung [64,65] von Vorläuferzellen und determinierter Progenitorzellen neutrophiler Granulozyten (CFU-GM) im Knochenmark. Dies führt zur vermehrten Ausschleusung reifer neutrophiler Granulozyten, ein klinisch-therapeutisch genutzter Effekt von G-CSF zur Behandlung von Neutropenie nach zytostatischer Therapie [66,67]. Weiterhin erfolgt die Verwendung aufgrund stammzellmobilisierender Wirkung zur Stammzellasservierung im Rahmen von Knochenmarkstransplantation und Chemotherapie mit Hochdosistherapiekonzept [68,69,70]. Plerixafor wird als CXCR4-Antagonist für die Freisetzung hämatopoetischer Stammzellen in die Blutbahn zur Stammzellasservierung erfolgreich verwendet [71]. Die von der amerikanischen Aufsichtsbehörde FDA im Jahr 2008 und von der europäischen Aufsichtsbehörde EMA im Jahr 2009 erteilte Zulassung umfasst den Zweitlinien Einsatz zur verbesserten Stammzellmobilisation in Kombination mit dem Granulozyten-stimulierender Faktor (G-CSF) bei Non-Hodgkin Lymphomen und beim Multiplem Myelom bei Hochdosischemotherapiekonzepten mit autologer Stammzelltransplantation [71,72].

Die Wirkung von Plerixafor erfolgt über einen Antagonismus am CXCR4 Rezeptor von hämatopoetischen Stammzellen. Die stammzellmobilisierende Wirkung durch alleinige CXCR4 Inhibition ist gering. In Kombination mit G-CSF zeigt Plerixafor eine synergistische Wirkung bei der Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen. So kann bei Patienten, bei denen G-CSF alleine nicht zu einer

ausreichenden Mobilisation von Stammzellen ausreicht, eine erfolgreiche Stammzellmobilisation induziert werden [73]. Plerixafor als Partialagonist hemmt über eine starke Bindung an die Ligandenbindungsstelle des CXCR4 Rezeptors eine Interaktion mit dem N-Terminus des Liganden CXCL12 [74,75]. Weiterhin fungiert Plerixafor als allosterischer Agonist am Chemokinrezeptor CXCR7 [76].

Über die Plerixafor-vermittelte Inhibition einer Interaktion von CXCL12 mit dem CXCR4-Rezeptor, der in verschiedenen Tumorentitäten exprimiert wird [46,47,48], konnten im Mausmodell das Metastasierungsverhalten von Mammakarzinom Zellen negativ beeinflusst werden [77]. Eine Arbeit hat gezeigt, dass durch Plerixafor in TC32 und CHLA-25 EwS Zelllinien in vitro die Zellmigration in Richtung eines CXCL12 Gradienten inhibiert werden konnte [42].



**Abbildung 2 Darstellung des Signalwegs der CXCL12-CXCR4-Achse**

Modifiziert nach Liao et al. [30] und Xu et al. [78]. Der Ligand CXCL12 bindet an CXCR4 mit nachfolgender Aktivierung der nachgeschalteten PI3K-AKT und MAPK-ERK Signalwege, mit Wirkung auf Zellproliferation und Zellmigration. Plerixafor (AMD3100) inhibiert die CXCL12-CXCR4 Rezeptor-Interaktion. Plerixafor dargestellt als Antagonist an CXCR4.

## 1.2. Rezeptor Tyrosinkinasen (RTK)

Rezeptor Tyrosinkinasen sind Transmembranproteine, die in vielzelligen Organismen zur Kommunikation verschiedener Zellen beitragen. Zelluläre Prozesse und Interaktionen wie Zellwachstum, Zellüberleben, Zelltod, Migration und Adhäsion werden durch sie gesteuert [79].

Die Einteilung der bisher identifizierten humanen 58 RTK erfolgt in 20 Unterfamilien. Die RTK bestehen aus einer N-terminalen Liganden-bindenden extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne, und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität [80]. Durch Liganden-abhängige Aktivierung, zum Beispiel durch die Bindung eines Wachstumsfaktors, kommt es zur Konformationsänderung der RTK mit Homo- oder Heterodimerisierung zweier zuvor inaktiver mono- oder oligomerer RTK [81,82]. Hierdurch kommt es zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten der Rezeptoren sowie benachbarter Rezeptoren,

die als Bindungsstellen für intrazelluläre Proteine der intrazellulären Signalweiterleitung dienen [82]. Durch Besetzung dieser Phospho-Tyrosinreste mit Proteinen mit spezifisch bindender SH2-Domäne (SRC-homology 2 domains) können weitere intrazelluläre Signalwege aktiviert werden [83]. Abweichend vom physiologischen Aktivierungs- und Regulationsvorgang sind Dysregulation und unkontrollierte Aktivierung von RTK an der Entstehung von Tumoren beteiligt [81]. Zu den Mechanismen zählen Überexpression, Genamplifikation, chromosomale Translokation, aktivierende Mutationen und Störungen der RTK Inaktivierung [84]. Die Identifizierung und gezielte Hemmung dieser Mechanismen stellt einen wichtigen Ansatz für molekular zielgerichtete Therapieansätze dar.

Zielgerichtete Therapieansätze beim Ewing Sarkom mit RTK als Zielstrukturen sind Gegenstand aktueller Forschung. Das EWS-FLI1 Fusionsprotein wirkt als pathogenetischer Transkriptionsfaktor. Das Fusionsprodukt wirkt zu einem großen Teil über die Interaktion mit sekundären zellulären Aktivierungswegen und beeinflusst zum Beispiel auch die Expression von RTK und RTK-Liganden. Dieses konnte beispielsweise für die an der Angiogenese und Tumorigenese beteiligten RTK-Liganden VEGF und IGF-1 (IGF-1: insuline-like growth factor) [85,86]. Für andere RTK, die nicht direkte Zielstrukturen von EWS-FLI1 sind, konnte eine Überexpression in EwS Zellen nachgewiesen werden. Weitere, wie ROR1 und FGFR1, scheinen zur Tumorprogression und Metastasierung beizutragen [87,88]. Das Verständnis von RTK Interaktionen mit weiteren Proteinen der Signaltransduktionswege sowie in Netzwerken von RTK und Chemokinrezeptoren ist wichtig für den Einsatz moderner zielgerichteter Therapie wie RTK Inhibitoren zur Therapie von Resistenzentwicklung und Metastasierungsprozessen beim Ewing Sarkom.

### **1.3. RTK Inhibitoren**

Die Gruppe der RTK stellt wichtige Angriffspunkte zielgerichteter Therapieansätze in der Tumorthherapie dar. Zwei Typen zielgerichteter Therapieansätze werden unterschieden: sogenannte Small Molecule Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI) und monoklonale Antikörper. Small Molecule Inhibitoren durchdringen die

Zellmembran und konkurrieren mit ATP um die ATP-Bindungsstelle von Rezeptor Tyrosinkinasen und inhibieren damit eine nachfolgende Signalkaskadenaktivierung [28].

In verschiedenen hämatologischen und onkologischen Tumorerkrankungen mit treibenden Mutationen in Tyrosinkinasen bieten Small Molecule Inhibitoren moderne zielgerichtete und effektive Therapieansätze. Von großer klinischer Bedeutung ist beispielsweise Imatinib, mit Wirkung auf die chimäre intrazelluläre Tyrosinkinase Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1 (ABL) und das pathogene Fusionsprotein BCR-ABL aus dem breakpoint cluster region Gen (BCR) und dem ABL-Gen bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) [89]. Imatinib hat auch eine inhibitorische Wirkung auf die RTK c-KIT bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) [89]. Erlotinib, ein weiterer Tyrosinkinaseinhibitor, wird therapeutisch im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom angewandt und hat als Zielstruktur die RTK Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-R) [28,89].

Eine gut beschriebene Zielstruktur RTK-basierter Therapieansätze im Ewing Sarkom ist die RTK IGF-1R. Die EWS-FLI1-abhängige Überexpression des Liganden IGF-1 führt über die Interaktion mit dem IGF-1R zur Bildung einer autokrinen Aktivierungsschleife [90,91]. Gleichzeitig ist die Expression von IGF-bindenden Proteine wie Insuline-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), das freies IGF-1 bindet und somit eine IGF-1R Aktivierung inhibiert, durch EWS-FLI1 herunterreguliert [15]. Durch diesen Signalweg kommt es zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege, wie dem Phosphoinositid-3-Kinase-Proteinkinase B (PI3K-AKT) Signalweg und Ras-Raf-Mitogen-activated protein kinase (Ras-Raf-MAPK) Signalweg [92,93]. IGF-1R Inhibition führte in präklinischen Studien zu verminderter Phosphorylierung von Proteinkinase B (AKT) und MAPK, d.h. zur Inaktivierung von Proteinen der nachgeschalteten Signalwege mit Hemmung des Tumorzellwachstums sowie Induktion von Apoptose [94,95]. In klinischen Studien zeigte die Therapie mit IGF-1R Antikörpern moderate Effekte mit eher mäßigen Responseraten im Bereich von 10-17%

[96,97,98]. Resistenzentwicklungen durch Wechsel zu IGF-2/IR-A (IR-A: insulin receptor A) mit IGF-1R-unabhängiger Aktivierung der AKT und MAPK Signalwege sind beschrieben [99]. Durch siRNA-basiertes Ausschalten der RTK MST-1R, die zur Familie der MET gehört, zeigte sich in Ewing Sarkom Zellen eine wiederhergestellte IGF-1R Sensitivität [100].

Die Entwicklung von Resistenzmechanismen gegen TKI und RTK-basierte Therapieansätze sind beschrieben und stellen eine Herausforderung in der modernen Krebstherapie dar. Durch Amplifikation bzw. Überexpression, Punktmutation in der Kinasedomäne sowie klonale Evolution, d.h. durch Auftreten weiterer zytogenetischer Aberrationen, kann es beispielsweise zur Imatinib Resistenzbildung bei der CML im Therapieverlauf kommen [101]. Die kompensatorische Kreuzaktivierung oder Überexpression weiterer RTK und damit die Aktivierung gemeinsamer nachgeschalteter Signalwege sind weitere Mechanismen der Resistenzbildung [102]. Die genannten Resistenzmechanismen bilden die Rationale für den Einsatz moderner Multityrosinkinaseinhibitoren mit simultaner Inhibition mehrerer RTK und nachgeschalteter Signalproteine. Eine Kenntnis von Mechanismen der Resistenzentwicklung und die Entwicklung verfeinerter Strategien im Umgang mit der RTK Therapie gehören zu den Aufgaben aktueller Tumorforschung.

### 1.3.1. Sorafenib

Sorafenib ist ein oraler Multityrosinkinaseinhibitor, der seit 2006 für die Behandlung von Patienten mit Nierenzellkarzinom in fortgeschrittenen Stadien und nicht-resezierbarem Leberzellkarzinom (HCC) zugelassen ist [103,104]. Molekulare Zielstrukturen von Sorafenib sind die häufig in HCC Zellen überexprimierten Raf-Kinasen [105]. Wie für alle TKI sind auch für Sorafenib mehrere Zielstrukturen beschrieben, so wird durch Inhibition der Raf-Kinase eine Signalkaskadenaktivierung des Ras-Raf-MAPK Signalwegs blockiert. Eine übermäßige Aktivierung des protoonkogenen Raf-Kinase Signalwegs durch Mutation kann in 30% unterschiedlicher humaner maligner Tumore nachgewiesen werden [106]. Hingegen konnte in Ewing Sarkom nur in wenigen Fällen aktivieren-

de Mutationen der Raf-Kinase festgestellt werden [107]. Eine Inhibition des aktiven MAPK Signalweges kann hier dennoch einen Angriffspunkt für Sorafenib bieten [92]. Weitere potentielle Zielstrukturen von Sorafenib in Ewing Sarkomen sind die RTK VEGFR und PDGFR, die an Tumorangiogenese und Tumorzellproliferation beteiligt sind [108,109]. Dieser Ansatz scheint bei Patienten mit Ewing Sarkomen in frühen klinischen Studien wirksam zu sein [109].

### 1.3.2. Dasatinib

Dasatinib ist ein oraler Multityrosinkinaseinhibitor, der seit 2006 für die Behandlung von Patienten mit Imatinib-resistenter Mutation der BCR-ABL Tyrosinkinase bei CML zugelassen ist. Dasatinib besitzt TKI-Aktivität gegenüber den Tyrosinkinasen BCR-ABL, Src-Gruppe, c-Kit, Ephrinrezeptoren (Eph), PDGFR [110]. Eine Überaktivierung der protoonkogenen Src-Gruppe der Tyrosinkinasen ist in verschiedenen Tumoren beschrieben, u.a. auch in Ewing Sarkom Zellen [111,112]. Src Tyrosinkinasen sind nicht-Rezeptor gebundene Tyrosinkinasen, die im Zytosol lokalisiert sind. Funktionell sind Src Tyrosinkinasen an der Signaltransduktion von RTK wie EGFR, PDGFR, FGFR2a, CSF-1R, IGF1R [113] sowie ROR1 [114] beteiligt. Bereits niedrige Dasatinib Konzentrationen zur Blockierung von Src Tyrosinkinasen zeigten in präklinischen Studien eine apoptos-einduzierende, migrationshemmende und proliferationshemmende Wirkung in Ewing Sarkom Zellen [112].

#### **1.4. Zielsetzung dieser Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den CXCR4 Chemokininhibitor Plerixafor als potentielle therapeutische Substanz im Ewing Sarkom zu evaluieren. Dabei sollte die proliferationshemmende Wirkung von Plerixafor und zusätzlich der Tyrosinkinaseinhibitoren Dasatinib und Sorafenib auf Ewing Sarkom Zellen untersucht werden. Wider Erwarten zeigte sich eine proliferationsfördernde Wirkung von Plerixafor. Basierend darauf sollte die Wirkung von Plerixafor in Ewing Sarkom Zellen auf

1. CXCR4-vermittelte Mechanismen der Zellproliferation, auf
2. Mögliche RTK-vermittelte Mechanismen, sowie
3. die Möglichkeit, diese durch Kombination mit RTK Inhibitoren zu unterbinden, untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien und Reagenzien

(di-)Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Acrylamid 30% 29:1	BIO-RAD, München
Agarose	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Antifect N liquid	Schülke, Norderstedt
Aqua ad iniectionabilia	Braun, Melsungen
Beta-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Carbenicillin	AppliChem, Darmstadt
Chloroquine	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Citronensäure	AppliChem, Darmstadt
Complete Mini Protease Inhibitor	Roche, Basel Schweiz
D(+)-Glucose	AppliChem, Darmstadt
Dasatinib	Selleckchem, München
4',6-Diamidino-2-phenylindole·2HCl (DAPI)	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
DMEM Dulbeccos modified eagle medium	Life technologies, Darmstadt
DNase/RNase freies Wasser	Life technologies, Darmstadt
dNTPs (2-Desoxyribonukleosid-triphosphat)	Promega, Fitchburg USA
Doxycyclin-Hyclat	AppliChem, Darmstadt
DTT	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Life technologies, Darmstadt
Dulbecco's Phosphate buffered saline (DPBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol 70%	AppliChem, Darmstadt
Ethanol 96%	AppliChem, Darmstadt
Ethanol absolute >99%	AppliChem, Darmstadt
Fetales bovines Serum	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum tet-prove	GE Healthcare Life Sciences, Frei-
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
HEPES Puffer	AppliChem, Darmstadt
Hygromycin B	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Lipofectamine RNAiMax	Life technologies, Darmstadt
Lipofectamine 2000	Life technologies, Darmstadt
Luminol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	AppliChem, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Fitchburg USA
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt

Natriumfluorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
Natriummolybdat	AppliChem, Darmstadt
Natriumpyrophosphat	AppliChem, Darmstadt
NP40/Igepal	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
PEG-it Solution	System Bio, Santa Clara USA
Phusion HotStart Polymerase	Thermo Scientific, Schwerte
Plerixafor	Selleckchem, München
Platinum Taq Polymerase	Life technologies, Darmstadt
Polybrene	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Precision Plus Protein Standard	BIO-RAD, München
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Puromycin	PAA
Random Primer	Promega, Fitchburg USA
RNase out	Life technologies, Darmstadt
RPMI-1640 Medium	Life technologies, Darmstadt
Salzsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Sodiumdodecylsulfat granuliert	AppliChem, Darmstadt
CXCL12/SDF-1 alpha recombinant	R&D Systems, Minneapolis, USA
Sorafenib	Selleckchem, München
SybrSafe	Life technologies, Darmstadt
TaqMan universal Master Mix	Life technologies, Darmstadt
TEMED(N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	BIO-RAD, München
Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt
Tris ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis USA
Trypsin EDTA (1x) 0,05%	Life technologies, Darmstadt
Tryptone	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Wasser demineralisiert Milli Q™	Millipore, Neu-Isenburg
WST1 Cell Proliferation Reagent	Roche Applied Sciences, Mannheim
Xylol	AppliChem, Darmstadt
Zeocin	Life technologies, Darmstadt

## 2.2. Antikörper

### 2.2.1.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Einsatz	Hersteller
Human Anti-CXCR4	Rabbit	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Human Anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Leiden, Niederlande

Human Anti-phospho-Akt (Ser473)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Human Anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Anti Aktin	Goat	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti $\beta$ -Aktin	Mouse	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Human Anti-phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Human Anti-phospho-c-Kit (Tyr719)	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Human Anti-c-Kit	Rabbit	1:1000	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Human Anti-ROR1	Goat	1:250	R&D Systems, Minneapolis, MN USA

#### 2.2.1.2. Sekundäre Antikörper und konjugierte Antikörper

Antikörper	Spezies	Einsatz	Hersteller
Anti-mouse IgG sek HRP konjugiert	Horse	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA USA
Anti-rabbit IgG sek HRP konjugiert	Donkey	1:4000	GE Healthcare Europe, Freiburg
Anti-goat IgG HRP konjugiert	Rabbit	1:3000	Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA USA

#### 2.2.1.3. Fluorchrom-konjugierte Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Spezies	Menge	Hersteller
Anti-Human CXCR4 PE-Cy7 konjugiert	Mouse	0,1 $\mu$ g	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
IgG2a K Isotype Control PE-Cy7	Mouse	0,1 $\mu$ g	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Anti-Goat IgG FITC konjugiert Sekundärantikörper	Rabbit	0,75 $\mu$ g	Jackson Immuno Reasearch, PA, USA
Human Anti-ROR1 Primärantikörper	Goat	0,4 $\mu$ g	R&D Systems, Minneapolis, MN , USA
Goat Gamma Globulin Isotypkontrolle	Goat	0,75 $\mu$ g	Jackson Immuno Reasearch, PA, USA

#### 2.2.2. Kits

Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher, Schwerte
Human phospho RTK Array Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN USA

## 2.3. Material

### 2.3.1. Humane Tumorzelllinien

Die Zelllinien TC32, TC71, 5838, A673 und SK-NMC stammen ursprünglich von der Zellbank des Children's Hospital Los Angeles. Die Zelllinien 697 (ACC 42), HL60 (ACC 3) und VH64 stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) und wurden uns von Dr. Frans van Valen überlassen. A673 iEF2 und A673 iERG Zelllinien sind beschrieben [115] und wurden freundlicherweise von Prof. S. Lessnick (Nationwide Children's Hospital, Columbus, Ohio, USA) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien DCES-6, DCES- 5, DCES-16, DCES-17 wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Uta Dirksen etabliert. Alle weiteren Zelllinien stammen von der DSMZ oder von der American Type Culture Collection (Manassas, Virginia, USA).

Zelllinie	Tumorentität	Zytogenetik	Ursprung	Kulturbedingungen
A673 (CRL1598)	Ewing Sarkom	t (11;22) EWS-FLI1	weiblich, 15 Jahre	RPMI + 10% FBS
TC32	Ewing Sarkom	t (11;22) EWS-FLI1	weiblich, 17 Jahre, Ileum und angrenzendes Weichgewebe	RPMI +10% FBS
TC71	Ewing Sarkom	t (11;22) EWS-FLI1	Männlich, 22 Jahre, Humerus, metastasiert	RPMI +10% FBS
VH64	Ewing Sarkom	Nicht bekannt	EwS des Metatarsus, isoliert aus malignem Pleuraerguss	RPMI +10% FBS
5838	Ewing Sarkom	EWS-ERG	Weiblich, 27 Jahre, EwS des Radius	RPMI +10% FBS
LAN5	Neuroblastom		Männlich, 0,4 Jahre	RPMI +10% FBS
697	Akute lymphatische Leukämie (ALL)	t (1;19) prä B-ALL	Männlich, 12 Jahre	RPMI +10% FBS, in Suspension
Capan-1	Adenocarcinom des Pancreas		Männlich, 40 Jahre, isoliert aus Lebermetastase	RPMI +20% FBS
HL60	Akute myeloische Leukämie (AML FAB M2)		Weiblich, 35 Jahre	RPMI +10% FBS, in Suspension

### 2.3.2. Primärzellen aus Tumorbiopsien

Zelllinie	Tumorentität	Zytogenetik	Ursprung	Kulturbedingungen
DCES-6	Ewing Sarkom	t (11;22) EWS-FLI1	Männlich, 14 Jahre, EwS eines Brustwirbelkörpers, isoliert 2011	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin + 1%Penicillin/Streptomycin
DCES-15	Ewing Sarkom	t (11;22) EWS-FLI1	Männlich, 24 Jahre, maligner Pleuraerguss, isoliert 2012	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin + 1%Penicillin/Streptomycin
DCES-16	Ewing Sarkom	t (11;22) EWS-FLI1	Männlich, 17 Jahre, EwS rechter Femur, aus Lungenmetastasen isoliert 2013	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin + 1%Penicillin/Streptomycin
DCES-28	Ewing Sarkom	t (11;22) EWS-FLI1	Weiblich, 16 Jahre, maligner Pleuraerguss, isoliert 2014	RPMI + 10% FBS + 1% L-Glutamin + 1%Penicillin/Streptomycin

### 2.3.3. Geräte

Agarosegelkammern	BIO-RAD, München
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser Hämocytometer	Thermo Scientific, Schwerte
Durchflußzytometer, Typ BD FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Sanyo-Panasonic, Hamburg
Nano Drop	Eppendorf, Hamburg
Neubauerzählkammer improved	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim/Rhön
pH-Meter	IKA <sup>®</sup> -Werke, Staufen
Pipetboy Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Supplie Power Pac 300	BIO-RAD, München
Power Supplie Power Pac HC power supply	BIO-RAD, München
Scanner S1300i	Fujitsu, Augsburg
Schüttler	IKA <sup>®</sup> -Werke, Staufen
Sterilbank HERA Safe	Thermo Scientific, Schwerte
T Professional Trio Thermocycler	Biometra, Göttingen
UV-Licht-/Durchlicht-Tisch	PEQLAB, Erlangen
Vortexer	VWR International, Darmstadt
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

### 2.3.4. Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Cryo freeze racks	Biozym, Hessisch Oldendorf
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,2/1,5ml)	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen 12x75 mm	BD, Heidelberg
Falcons 15 ml	BD bzw. Corning, Heidelberg
Falcons 50 ml	BD bzw. Corning, Heidelberg
Halbmikroküvetten	Eppendorf, Hamburg
Handschuhe	Braun, Melsungen
Kapillarspitzen	Biozym, Hessisch Oldendorf
Kodak X-Omat Blue XB Film	Kodak, Rochester, New York USA
Kryobox Pappe	Baacklab, Schwerin
Kryoröhrchen Cryo Pure 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
MicroAmp Optical Film	Applied Biosystems
Mini Protean Cell/tetra short Plates	Diagonal
Mini Protean comb 10-well 1mm	BIO-RAD, München
Mini Protean comb15-well	BIO-RAD, München
Mounting Medium Vectashield Vector, H- 1000	Vector Laboratories, London UK
Nitrocellulose Membran 0,45 µM 20x20cm	BIO-RAD, München
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Illinois USA
Petrischalen 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (10; 200; 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen ohne Filter (10; 200; 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Rastereinsatz für Pappbox	Baacklab, Schwerin
Reaktionsgefäße (0.5, 1.5, 1.6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
serologische Pipetten 10 ml	Corning, New York USA
serologische Pipetten 2 ml	Corning, New York USA
serologische Pipetten 25 ml	Corning, New York USA
serologische Pipetten 5 ml	Corning, New York USA
Spritzflasche	Roth, Karlsruhe
Sterile syringe Filter 0,2 und 0,45 µm	Corning, New York
ThinCert 8µM, 24-Well	Greiner, Kremsmünster Österreich
UVette einzeln	Eppendorf, Hamburg
Whatman Filterpapier	Whatman, Dassel
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup>	Corning, New York USA
Zellkulturplatten 6 well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten 24 well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten 96 well	Corning, New York USA
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.3.5. Puffer und Medien

#### Durchflusszytometrie

FACS-Fix	4% Formaldehyd in PBS
FACS-Puffer	0,5% BSA, 0,1% NaN <sub>3</sub> in PBS

#### Lysepufferlösung (bei 4°C)

500 mM HEPES Puffer	5ml
1M NaF	5ml
100 mM Natriumpyrophosphat	5ml
2 mM EDTA	0,2ml
2 mM Natriummolybdat	1ml
MiliQ H <sub>2</sub> O	Ad 50ml
vor Gebrauch zugesetzt für 5ml Puffer:	
NP40 20%	12 µl
c0mplete Mini EDTA-free Proteaseinhibitor	½ Tablette
Natriumorthovanadat	1 Spatelspitze

#### Probenpuffer (5x)

1 M Tris-HCl pH 6,8	6,25ml
10% SDS	12,5ml
Bromphenolblau	ein paar Kristalle
100% Glycerol	20ml
MiliQ	ad 50ml
+ vor Gebrauch: 99%β-Mercaptoethanol	40µl auf 960µl Probenpuffer

#### Transferpuffer (10x)

Tris Base	60,6g
Glycin	288g
MiliQ H <sub>2</sub> O	ad 2l
Für Transferpuffer (1x):	
10x Transferpuffer	75ml
Methanol	150ml
MiliQ H <sub>2</sub> O	525ml

#### TBS (Tris-buffered saline Puffer) (10x, pH 7,4)

NaCl	80g
KCl	2g
Tris Base	30g
Mili-Q	Ad 1000ml
HCl 37,5%	Bis pH 7,4
TBST (Tris-buffered saline Puffer mit Tween20):	
TBS 10x	100ml

Tween 20%	500µl
Mili-Q H <sub>2</sub> O	Ad 1000ml

## 2.4. Software

- Graphpad Prism 6 (Testversion) – statistische Auswertung und Grafikerstellung
- FlowJo 10.6 (Testversion) – zur Auswertung durchflusszytometrischer Messungen
- ImageJ vom U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Protein Array Analyzer for ImageJ von Gilles Carpentier, Université Paris Frankreich – zur densitometrischen Auswertung der RTK Array Daten
- Adobe Illustrator CS4 – zur Grafikerstellung

## 2.5. Methoden

### 2.5.1. Zellbiologische Methoden

#### 2.5.1.1. Kultivierung von adhärennten Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden in unbeschichteten 25 bzw. 75cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im angegebenen Medium kultiviert. Einmal pro Woche erfolgte ein Mediumwechsel, bei Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden die Zelllinien passagiert. Hierfür wurde mit PBS einmalig gewaschen und die Zellkulturflasche mit Trypsin zur Zellvereinzellung und Ablösung versetzt. Abgelöste Zellen wurden nach etwa fünf Minuten Inkubation bei 37°C in FBS-haltigem Zellkulturmedium aufgenommen und in entsprechender Verdünnung in neu angesetztem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Auf Mykoplasmenkontamination wurde regelmäßig mittels PCR getestet, nur Mykoplasmen-freie Zellen wurden für Versuche eingesetzt.

#### 2.5.1.2. Kultivierung von Zelllinien in Suspension

In Suspension wachsende Zelllinien wurden analog zu adhärennten Zelllinien kultiviert. Bei jeweiliger Konfluenz von 80% wurde passagiert. Hierbei wurde die

Zellsuspension bei 1.200rpm für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium aufgenommen.

#### 2.5.1.3. Kryokonservierung von Zellen

Subkonfluente Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS trypsinisiert (adhärente Zellen), in Zellmedium resuspendiert und abzentrifugiert (1.200rpm, 5 Minuten). Zellpellets wurden in Einfriermedium (RPMI bzw. DMEM Medium + 20% FBS + 10% DMSO) resuspendiert zu einer Zielkonzentration von etwa  $3-5 \times 10^6$  Zellen/ml bei  $-80^\circ\text{C}$  in Kryoröhrchen eingefroren. Nach 24h erfolgte die Überführung der Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff.

#### 2.5.1.4. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mittels Neubauer Zellkammer bestimmt. Hierzu wurde Zellsuspension 1:10 in Trypanblau verdünnt, in die Zählkammer gegeben, und 4 Quadrate unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung gezählt. Mithilfe folgender Formel wurde die Zellzahl in Suspension ermittelt:

$$\text{Zellzahl [1/mL]} = (\text{gezählte Zellzahl} / 4) \times 10^4 \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

#### 2.5.1.5. Zellbehandlung mit Inhibitoren

Zellen wurden in 10cm Zellkulturschalen ausgesiedelt. Nach Absetzen der Zellen, erfolgte der Wechsel des Zellmediums auf serumhaltiges und serumfreies Medium, wie angegeben. Am Folgetag erfolgte die Zugabe des in DMSO gelösten Inhibitors in angegebener Konzentration.

#### 2.5.1.6. Zellviabilitätsbestimmung

Der Effekt verschiedener Rezeptor Tyrosinkinase- und Chemokinrezeptorinhibitoren auf die Zellvitalität wurde mittels der WST-1 Reagenz bestimmt: Mittels enzymatischer Umsetzung einer absorbierenden Substanz durch metabolisch aktive und vitale Zellen erfolgte die Zellviabilitätsbestimmung. Zugrunde liegt die enzymatische Umsetzung des roten Tetrazoliumsalzes (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-

(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) durch eine intakte Atmungskette vitaler Zellen in einen Formazan-Farbstoff. Wasserlösliches WST-1 wurde im Verhältnis 1:10 dem Zellkulturmedium zugesetzt. Ein sich einstellender Farbumschlag wurde zwei Stunden nach Reagenzzugabe gemäß Herstellerangaben photometrisch bei 450nm bestimmt. Es wurden, abhängig von der jeweiligen Zelllinie, 2.000 – 10.000 Zellen pro 100µl Medium in eine 96-Kavitätenplatte ausgesiedelt. Am Folgetag wurde der jeweilige Inhibitor in Konzentrationen zwischen 0,001µM – 10µM zugegeben. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Lösungsmittel des jeweiligen Inhibitors in gleicher Konzentration behandelt, d.h. bei in DMSO gelösten Inhibitoren wurde als Kontrolle DMSO in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte unter Zellkulturbedingungen, nach 72h erfolgte die Zellviabilitätsbestimmung. Alle Einzelversuche wurden im Triplikat durchgeführt.

## **2.5.2. Migrationsverhalten von Zellen**

### **2.5.2.1. Transwell-Chamber-Assay**

Zur Analyse der CXCR4-vermittelten Migration von Ewing Sarkom Zellen wurde der Transwell-Chamber-Assay eingesetzt. Hierzu wurden ThinCert Transwell Membraneinsätze für 24-Kavitätenplatten mit einer Porengröße von 8µM verwendet, durch die eine Zellmigration in einem Zwei-Kompartimentenaufbau stattfinden kann. Die Kompartimente wurden, wie angegeben, mit Inhibitoren und Stimulantien unterschiedlich befüllt. Die eingesetzten Zellen wurden zuvor für 24h mit Minimalmedium (RPMI Medium + 0,2% BSA) inkubiert. Die Kompartimente wurden wie angegeben mit den entsprechenden Wirkstoffen in angegebener Konzentration befüllt. Die Inkubation des Versuchs erfolgte über 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Zum Abstoppen des Assays wurde überschüssiges Medium und auf der Membranoberseite befindliche Zellen mit einem Wattetupfer entfernt. Anschließend wurden die migrierten Zellen an der Membranunterseite mit 4% PFA in PBS für 10 min fixiert. Nach Waschen in PBS erfolgte die Zellkernfärbung mittels DAPI (in 2x SSC Puffer) über 10min. Die Membran wurde bei Raumtemperatur für 1-2h getrocknet, abgetrennt und auf einem Objektträger mit Mounting Medium eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluo-

reszenzmikroskopie. Bei 40x Vergrößerung wurden pro Membran Zellen in fünf Gesichtsfeldern gezählt.

#### 2.5.2.2. Woundhealing-Assay

Im 24-Kavitätenformat mit Kollagenbeschichtung wurden Zellen in verschiedenen Konzentrationen ausgesiedelt. Etwa 24h bis 48h nach Aussiedlung der Zellen lag die Konfluenz bei 70-80% und es erfolgte ein Mediumwechsel auf Vollmedium mit Plerixafor-Zusatz in angegebenen Konzentrationen. 12h nach Plerixaforbehandlung wurde mit einer 200µl Pipettenspitze ein Scratch, d.h. eine Unterbrechung im weitgehend konfluenten Zellrasen durchgeführt. Das Ausfüllen der Unterbrechung im Zellrasen wurde mit dem Lichtmikroskop bei 10x Vergrößerung zu angegebenen Zeitpunkten fotografisch dokumentiert.

### 2.5.3. Proteinbiochemie

#### 2.5.3.1. Herstellung von Zelllysaten

Zum Proteinnachweis wurden Zellen in 100µl NP40-Lysepuffer pro Kavität einer 6-Kavitäten Platte lysiert. Zellmembranbestandteile werden durch den Lysepuffer aufgelöst und Zellproteine in Lösung gebracht: Das Zellkulturmedium wurde entfernt, mit ca. 4°C kaltem PBS zweimal gewaschen und anschließend wurden die Zellen in NP40-Lysepuffer mit einem Zellkulturschaber vom Gefäßboden abgelöst. Die Arbeiten wurden auf Eis, also bei ca. 4°C, und unter Zusatz von Proteaseinhibitor im NP40-Lysepuffer. Das gewonnene Lysat wurde bei -80°C für 1h eingefroren und anschließend bei 4°C unter Rotation für weitere 30min inkubiert. Zellbestandteile wurden daraufhin durch Zentrifugation bei 13.000rpm bei 4°C abgesetzt und der Proteinüberstand aspiriert. Die Proteinlösung wurde direkt eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

#### 2.5.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Mittels Protein BCA Assay Kit wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Abgeleitet der Biuret-Reaktion werden hierbei Proteine mit mehr als zwei Peptidbindungen mit zweiwertigen Kupfer-Ionen komplexiert. In wässrig-alkalischem Milieu erfolgt die Reduktion zu einwertigen Kupfer-Ionen, die durch Komplexbil-

dung mit Bicinchoninsäure (BCA) einen photometrisch bestimmbaren Farbkomplex bilden. Jeweils 5µl der Proteinlösung wurden mit 995µl BCA Lösung (Reagenz A + Reagenz B, im Verhältnis 50:1) für 30min bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 562nm bestimmt. Die Kalibrierung des Photometers zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach dem Lambert-Beer-Gesetz erfolgte mit einer Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin FBS (0,125mg/ml – 8mg/ml). Die Proteinlysate wurden anschließend in Lysepuffer und Probenpuffer (5x) für eine Western Blot Analyse verdünnt, in jeder 30µl Western Blot Probe befanden sich 50µg Protein.

### 2.5.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch ein kombiniertes Sammel- und Trenngel wurden Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt. Im Gel enthaltenes Natriumdodecylsulfat (SDS) stellt eine negative Ladung der Proteine sicher und erlaubt so eine Auftrennung im elektrischen Feld. Durch Aufkochen der Zellysate mit Probenpuffer bei 95°C über 5min wurden Proteinsekundärstrukturen denaturiert durch enthaltenes beta-Mercaptoethanol. Die Proteine wurden auf ein Polyacrylamid-Gel umgeben von Tris-haltiger Pufferlösung aufgetragen und unter Anlage einer elektrischen Spannung nach Molekulargewicht aufgetrennt. Der Polyacrylamidgehalt bzw. der Vernetzungsgrad des Gels wurde an dem jeweiligen Proteingewicht angepasst. Verwendet wurden 7-10% Polyacrylamidgele bei konstant angelegter Spannung von 70V für das Sammelgel und 110V für das Trenngel.

**Tabelle 1** Zusammensetzung des Polyacrylamidgels zur SDS-PAGE

Reagenz	Trenngel 7%	Sammelgel
ddH <sub>2</sub> O	3,7ml	ad 50ml
1M Tris HCl pH 8,8	4ml	-
1M Tris-HCl pH 6,8	-	6,25ml
30% Acrylamid	2,3ml	6,5ml
10% SDS	100µl	500µl
10% APS	100µl	1ml
TEMED	7µl	50µl
Bromphenolblau	-	1 Spatelspitze Kristalle

#### 2.5.3.4. Proteintransfer auf Nitrocellulose Membranen (Western Blot)

Der Transfer zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennter Proteine auf Nitrocellulosemembranen erfolgte mittels Western Blot. In dem Gel enthaltene und durch den SDS-Gehalt des Gels negativ geladene Proteine binden unter Anlage eines elektrischen Feldes an die Nitrocellulosemembran. Die benötigten Schwämme, Whatman-Filterpapiere und Nitrocellulosemembranen wurde in Transferpuffer (1x, 20% Methanol) durchfeuchtet. Der Aufbau der Bestandteile der Transfer-Kammer erfolgte nach Herstellerangaben unter Vermeidung von Luftblaseneinschluss. In die Transfer-Kammer wurden Transferpuffer (1x), ein Magnetrührer zur gleichmäßigen Temperaturverteilung und ein Kühlelement eingebracht. Die gesamte Kammer wurde auf Eis gelagert, um ein Überhitzen des Gels während des Transfers zu vermeiden. Zum Transfer wurde eine Spannung von 100V über 90min angelegt. Die Kontrolle des Proteintransfers erfolgte mittels Ponceau-S Proteinfärbung. Hierbei werden mit Ponceau-S, einem roten Azofarbstoff, an die Membran gebundene Proteine gefärbt. Anschließend wurde die Membran durch Waschen mit TBS Puffer entfärbt.

#### 2.5.3.5. Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper

Zum Nachweis membrangebundener Proteine wurde eine Kombination aus spezifischen Erstantikörpern und gegen den speziestypischen Fc-Teil des Erstantikörpers gerichteter Zweitantikörper verwendet. Die Membranen wurden zunächst in Blockierlösung, die abhängig vom eingesetzten Antikörper und Herstellerangaben 5% Magermilchpulver oder 5% BSA enthielt, für 2-3h bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplatte inkubiert, um freie und unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Erstantikörper wurden zugegeben (siehe 2.2.1.1). Die Inkubation der Membranen mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C unter Schütteln. Im Anschluss wurde unspezifisch bindender Erstantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Der eingesetzte Zweitantikörper war gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtet und mit Meerrettichperoxidase (HRP, engl. Horse radish peroxidase) konjugiert. Die Membran wurde in verdünnter Zweitantikörperlösung (abhängig vom Anti-

körper 1:1000-5000; in 0,5% Magermilchpulver in TBST) für 2h auf der Schüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde die Membran dreimal in TBST gewaschen. Die Detektion der membrangebundenen Antikörper erfolgte mittels Chemilumineszenz. Hierzu wurde Luminol- und Wasserstoffperoxidhaltiger Elektrochemilumineszenzlösung (ECL) für eine Minute auf die Membran gegeben und in eine Entwicklerkassette eingelegt. Unter Dunkelkammerbedingungen wurden Autoradiographiefilme mit Expositionszeiten von drei Sekunden bis zu fünf Minuten auf die Membran aufgelegt. Entwickelt wurden die exponierten Filme mittels Dürr Dentrax XR 24 Pro Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine. Als Ladekontrolle zum Nachweis vergleichbarer Proteinmengen auf der Nitrocellulosemembran wurden Antikörper gegen beta-Aktin eingesetzt.

#### 2.5.3.6. Membran- Stripping

Für die Wiederverwendung der Nitrocellulose Membran zur Detektion weiterer Proteine nach durchgeführtem Western Blot wurden gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Hierzu wurde die Membran 0,2M Natronlauge auf dem Schüttler für 15min inkubiert. Gefolgt von je dreimaligem Waschen mit MilliQ Wasser und TBST (1x) und erneutem Blocken in Blockierlösung konnte eine erneute Proteindetektion durchgeführt werden.

#### 2.5.3.7. Phospho-Rezeptor Tyrosinkinase Array

Zur Bestimmung der Phosphorylierung von 49 verschiedenen Rezeptor Tyrosinkinasen wurde das Human Phospho-RTK Array Kit von eingesetzt. Nach Herstellerangaben wurden subkonfluente Zellen nach jeweiliger Inhibitor Behandlung im mitgelieferten Lysepuffer lysiert. Der Lysepuffer wurde zuvor mit cOmplete Mini EDTA –free Proteaseinhibitor Tabletten der Firma Roche versetzt (1 Tablette/10ml Lysepuffer). Die Zellen wurden dazu mit PBS gewaschen, in Lysepuffer aufgenommen und die Lösung über 30min bei 4°C auf dem Schüttler platziert. Die Lösung wurde dann bei 14.000rpm zentrifugiert für 5min und der Überstand abgenommen. Eine Proteinmenge von 267µg/ml (400µg Gesamtproteinmenge) in der zu analysierenden Probe wurde mittels BCA Assay eingestellt. Die Membranen wurden über Nacht mit der Proteinlösung auf dem

Schüttler bei 4°C inkubiert, sodass eine Bindung an die membrangebundenen Antikörper erfolgen konnte. Durch dreimaliges Waschen im mitgelieferten Waschpuffer wurde ungebundenes Protein abgewaschen und die Membranen 2h bei Raumtemperatur mit anti-pan-phospho tyrosine HRP detection antibody (1:2000 angegebene Verdünnung) zur Proteindetektion inkubiert. Enthaltene Chemilumineszenz Substrat wurde zum Entwickeln der Membranen eingesetzt (1, 5 und 10min Filmexposition).

Die Pixeldichte wurde mit der java-basierten Image J Software und dem Protein Array Analyzer Plugin bestimmt. Zur Vergleichbarkeit der Arrays untereinander wurde die Pixeldichte der einzelnen Duplikate, die jeweils eine phospho-RTK repräsentieren, auf den Array Membranen bestimmt und die gemessenen Pixeldichten gegen den Mittelwert der sechs Positivkontrollen jeder Membran normalisiert. Zur Ermittlung signifikant veränderter Pixeldichten einzelner RTK wurden t-Tests mit Holm-Sidak Korrektur für multiples Testen durchgeführt und jeweils eine nach bestimmter Pixeldichte abgestufte heatmap generiert.

#### **2.5.4. Durchflusszytometrie**

Die durchflusszytometrischen Analysen zur Oberflächenantigenbestimmung wurden am FACS Calibur durchgeführt. Die Datenerfassung und -auswertung erfolgte mit den Programmen BD FACSDiva und FlowJo 10.6. Verwendete Antikörper waren direkt fluorochrom-markierte Antikörper oder sekundäre Antikörper mit Fluorochrom-Konjugation, d.h. gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtete Antikörper. Eingesetzt wurden die Fluoreszenzfarbstoffe FITC und als Tandemfarbstoff PE-Cy7. Zur FACS Analyse wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden bei 400g für 5min zentrifugiert und in 2ml FACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation und Resuspension in 100µl FACS-Puffer unter Zusatz der entsprechenden Menge des direkt Fluoreszenz-markierten Antikörpers bzw. des Primärantikörpers. Nach Inkubation für 10min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss (bei Fluorochromgekoppelten Antikörpern) wurden 2ml FACS-Puffer zugegeben und für 5min bei 400g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es folgte zweimaliges

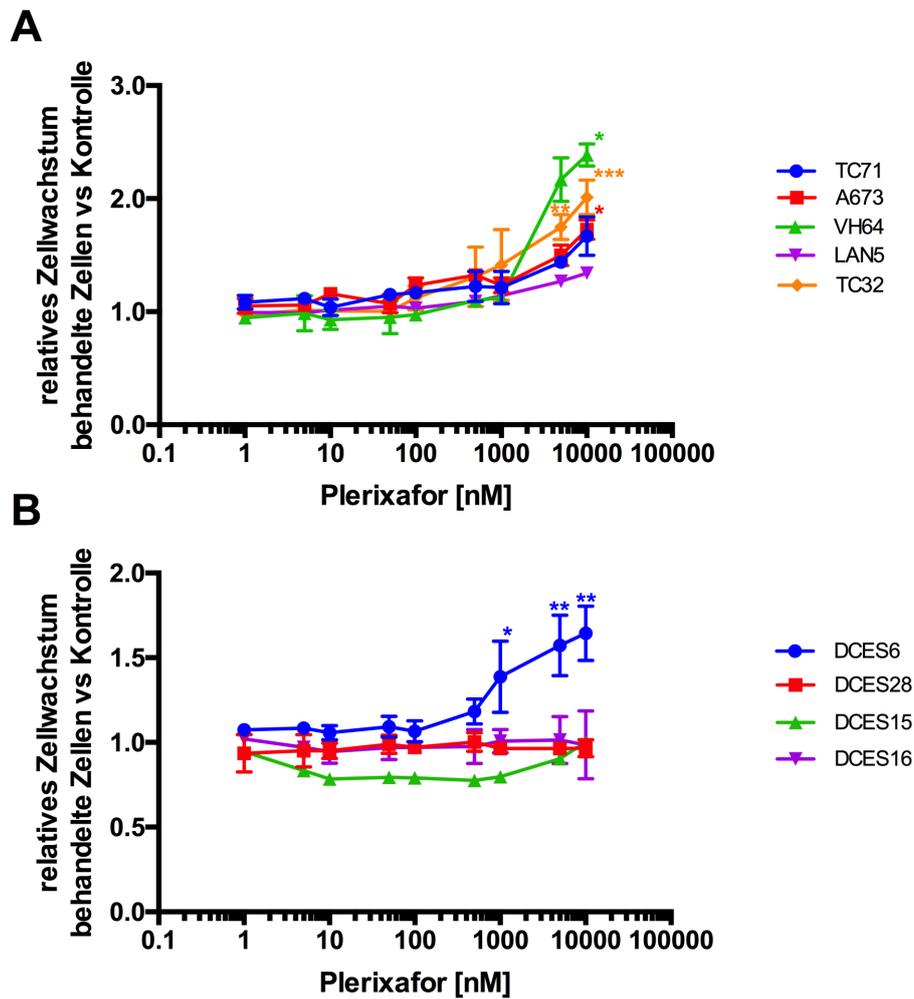
Waschen mit FACS-Puffer. Verwendete Zweitantikörper wurden in entsprechender Menge in 100µl FACS-Puffer verdünnt und zur Resuspension der Zellpellets eingesetzt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 300µl PBS für PE-Cy7 Konjugate bzw. 300µl FACS-Fix Puffer für FITC Konjugate aufgenommen und die Zellen am Durchflusszytometer analysiert. Als Isotypkontrolle zur Bestimmung unspezifischer Antikörperbindungen und damit unspezifischer Färbung wurden Antikörper gleichen Isotyps des Primärantikörpers in gleicher Menge eingesetzt. Mit FACS-Fix Puffer fixierte Zellen wurden innerhalb von 48h analysiert, nicht fixierte Zellen innerhalb weniger Stunden.

Die Einteilung nach Expressionsgehalt in angegebene Gruppen erfolgte anhand der relativen Fluoreszenzintensität als Verhältnis spezifischer Fluoreszenz zu unspezifischer Fluoreszenz der Isotypkontrolle.

### 3. Ergebnisse

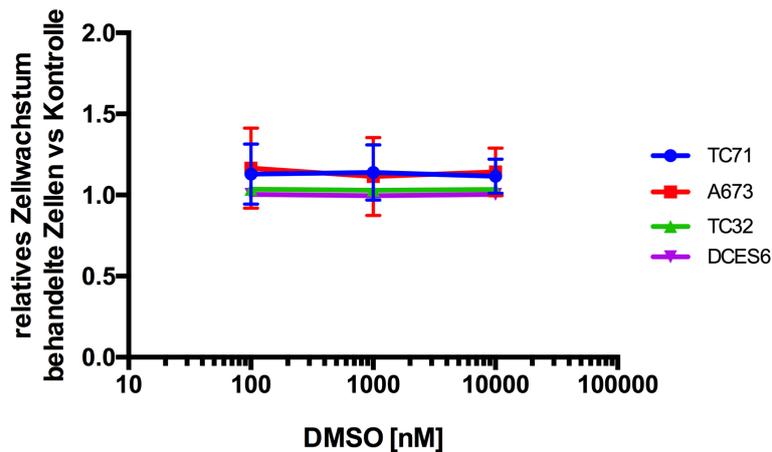
#### 3.1. Der CXCR4-Inhibitor Plerixafor stimuliert das Zellwachstum

Es wurde die Wirkung des CXCR4-Chemokinrezeptor Antagonisten Plerixafor (AMD3100) auf das Wachstum der Ewing Sarkom Zelllinien A673, TC71, VH64 und TC32 überprüft. Als Kontrolle wurde die Neuroblastom Zelllinie LAN5 mit bekannt hoher CXCR4 Oberflächenexpression [116] eingesetzt. In Abbildung 3 ist die ermittelte Zellvitalität/Proliferation mittels WST-1 Assay nach 72-stündiger Inkubation mit Plerixafor in angegebener Konzentration dargestellt. Da die Inhibitoren in DMSO gelöst vorlagen, wurde als weitere Kontrolle die Wirkung des DMSO Lösungsmittels überprüft. DMSO in äquimolaren Mengen beeinflusst das Zellwachstum nicht (Abbildung 4). Für alle untersuchten Zelllinien konnte eine Wachstumszunahme durch Plerixafor im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Für die Zelllinien TC32, A673 und VH64 ist dieser Effekt signifikant bei den in Abbildung 3 angegebenen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Für die Zelllinien TC32 und VH64 zeigte sich eine Verdopplung des Anteils vitaler Zellen bei Behandlung mit 10 $\mu$ M Plerixafor. Bei Behandlung mit 10 $\mu$ M Plerixafor zeigte sich für TC71 Zellen eine Wachstumszunahme von etwa 67%, bei A673 von ca. 72% und bei LAN5 von ca. 34%. Ferner konnte, wie in Abbildung 3 dargestellt, in der primären Ewing Sarkom Kultur DCES6 eine signifikante Wachstumszunahme von ca. 64% nach Behandlung mit 10 $\mu$ M Plerixafor. Für die primären Ewing-Sarkom Zellen DCES15, DCES16 und DCES28 zeigte sich keine signifikante Veränderung des Anteils vitaler Zellen durch Plerixafor.



**Abbildung 3 Plerixafor aktiviert das Zellwachstum von Ewing Sarkom Zellen**

**A** TC71, A673, VH64, LAN5 und TC32 Zelllinien und **B** DCES6, 15, 16, 28 primäre Kulturlinien wurden mit Plerixafor in Konzentrationen von 0,001 $\mu$ M – 10 $\mu$ M (logarithmisch skaliert) für 72h inkubiert. Alle Werte sind in Bezug zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD aus 3 unabhängigen Versuchen (2 für LAN5). Student's t-Test Behandlung vs. Kontrolle  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*.

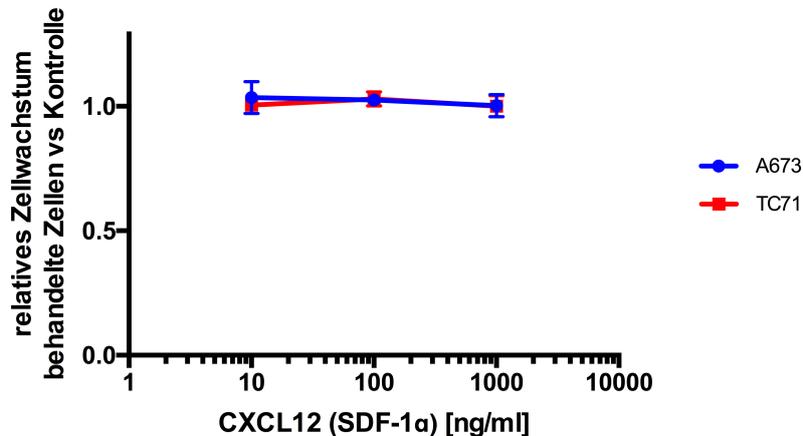


**Abbildung 4 DMSO Lösungsmittelkontrolle beeinflusst das Zellwachstum nicht**

TC71, A673, TC32 und DCES6 Zellen wurden mit 100nM, 1000nM und 10000nM DMSO für 72h inkubiert. Alle Werte sind in Bezug zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD aus 3 unabhängigen Versuchen (2 für TC32 und DCES6).

### 3.2. Der CXCR4 Agonist CXCL12 beeinflusst das Zellwachstum nicht

Folgernd aus den Ergebnissen zum CXCR4 Inhibitor Plerixafor wurde die Wirkung des CXCR4 Liganden bzw. Agonisten CXCL12 (SDF-1a) auf die Proliferation von Ewing Sarkom Zelllinien untersucht. A673 und TC71 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von CXCL12 behandelt und der Anteil vitaler Zellen im WST-1 Assay nach 72h Inkubation bestimmt. Es konnte, wie in Abbildung 5 gezeigt, keine Beeinflussung des Zellwachstums durch CXCL12 festgestellt werden.

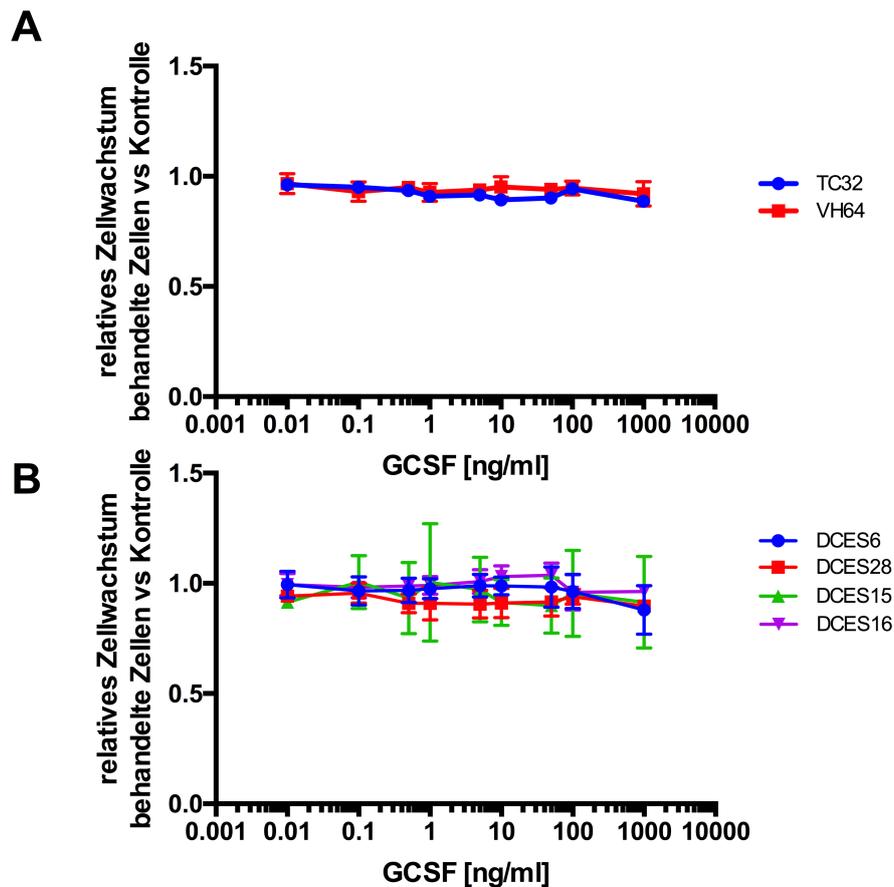


**Abbildung 5 Zellwachstum in A673 und TC71 Ewing Sarkom Zellen unbeeinflusst von CXCL12**

TC71 und A673 Zellen wurden mit 10ng/ml, 100ng/ml, und 1000ng/ml CXCL12 (SDF-1a) für 72h inkubiert. Alle Werte sind in Bezug zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD aus mindestens 2 unabhängigen Versuchen.

### 3.3. G-CSF (Filgrastim) beeinflusst das Zellwachstum nicht

Zur Untersuchung der Spezifität des proliferationsfördernden Effekts einer Zellbehandlung mit Plerixafor wurden zum Vergleich WST-1 Assays unter Einsatz des Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktors G-CSF durchgeführt. Eingesetzt wurden TC32 und VH64 Ewing Sarkom Zelllinien, die ein deutlich erhöhtes Wachstum durch Plerixafor Behandlung zeigten. Wie in Abbildung 6A dargestellt, zeigt sich keine Beeinflussung des relativen Zellwachstums in Bezug zur unbehandelten Kontrolle bei TC32 und VH64 Ewing Sarkom Zelllinien. Weiterhin konnte bei den vier verwendeten primären Zellkulturen aus Ewing-Sarkom Tumorbiopsien (Abbildung 6B) keine signifikante Beeinflussung des Zellwachstums festgestellt werden.



**Abbildung 6 Zellwachstum von Ewing Sarkom Zelllinien bleibt unbeeinflusst von Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF)**

**A** TC32 und VH64 Zellen und **B** primäre Zellen aus Tumorproben wurden mit ansteigenden Konzentration von 0,01-1000ng/ml G-CSF im Zellmedium für 72h inkubiert. Alle Werte sind in Bezug zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD aus 3 unabhängigen Versuchen.

Insgesamt zeigte sich also in den Versuchen 3.8 - 3.9 eine inhibitorische Wirkung der TKI Dasatinib und Sorafenib auf das Zellwachstum von Ewing Sarkom Zelllinien. Plerixafor zeigte hingegen eine proliferationssteigernde Wirkung, insbesondere auf die Zelllinien TC32, A673 und VH64, sowie die primäre Kultur DCES6, die zu den folgenden Versuchen veranlasste.

### 3.4. Der Chemokinrezeptor CXCR4 auf Proteinebene exprimiert

Die Proteinexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 als Zielstruktur von Plerixafor wurde in den oben verwendeten Ewing Sarkom Zelllinien analysiert.

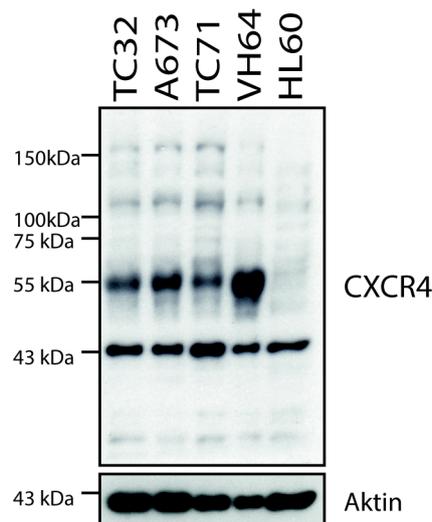
Die Gesamtproteinexpression des Rezeptors CXCR4 ist in Abbildung 7 dargestellt. Es zeigen sich in der Western Blot Analyse mit einem polyklonalen CXCR4 Antikörper mehrere Isoformen. Die HL60 Leukämiezelllinie diente als Kontrolle, deren CXCR4 Expression mit einem Molekulargewicht von 43kDa beschrieben ist [117]. In Ewing Sarkom Zelllinien konnte neben einer 43kDa Bande zusätzlich eine 55kDa Isoform nachgewiesen werden. Die 55kDa Bande stellt sich deutlich in den Zelllinien VH64, TC32, A673 und TC71 in absteigender Intensität dar und damit in den Zelllinien, die unter Plerixafor eine signifikante Wachstumszunahme zeigen (Abbildung 3). VH64 und TC32 Zellen mit der deutlichsten 55kDa Bandenintensität zeigten auch anteilig die größte Wachstumszunahme unter Plerixafor, sodass eine Korrelation dieses Proliferationseffekts mit einer 55kDa CXCR4-Isoform möglich ist.

Die Bestimmung der CXCR4 Oberflächenrezeptorexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wurde ein monoklonaler, gegen CXCR4 gerichteter Antikörper eingesetzt, der als PE-Cy7 Fluorchrom-Konjugat vorlag. Als Kontrolle diente ein unspezifischer, isotypengleicher Antikörper. Wie in Abbildung 8 exemplarisch dargestellt, zeigen die Zelllinien TC32, VH64 und 5838 sowie die als Positivkontrolle für CXCR4 eingesetzte LAN5 Neuroblastom Zelllinie eine CXCR4 Oberflächenexpression. Die Einteilung der Oberflächenexpression erfolgte in angegebenen Gruppen anhand der mittleren Fluoreszenzintensitäten der analysierten Zellen als Quotient der Fluoreszenzintensitäten spezifischgefärbter Zellen und der Isotypkontrolle. Die Angabe dieser Werte erfolgt als relative mittlere Fluoreszenzintensität (RFI) (Tabelle 2). Für TC32 Zellen konnte eine starke CXCR4 Oberflächenexpression nachgewiesen werden (Abbildung 8), sowie für die LAN5 Zelllinie als Positivkontrolle [116]. 5838 und VH64 Ewing-Sarkom-Zelllinien hatten eine mittelstarken bzw. schwache CXCR4 Oberflächenexpression (CXCR4-medium oder low). Eine CXCR4 Rezeptorexpression in A673 und TC71 Zelllinien auf der Zelloberfläche war nicht nachweisbar.

Die Ergebnisse zeigen durchgehend eine deutliche CXCR4 Proteinexpression in allen verwendeten Ewing Sarkom Zelllinien. Diese korreliert nicht mit der

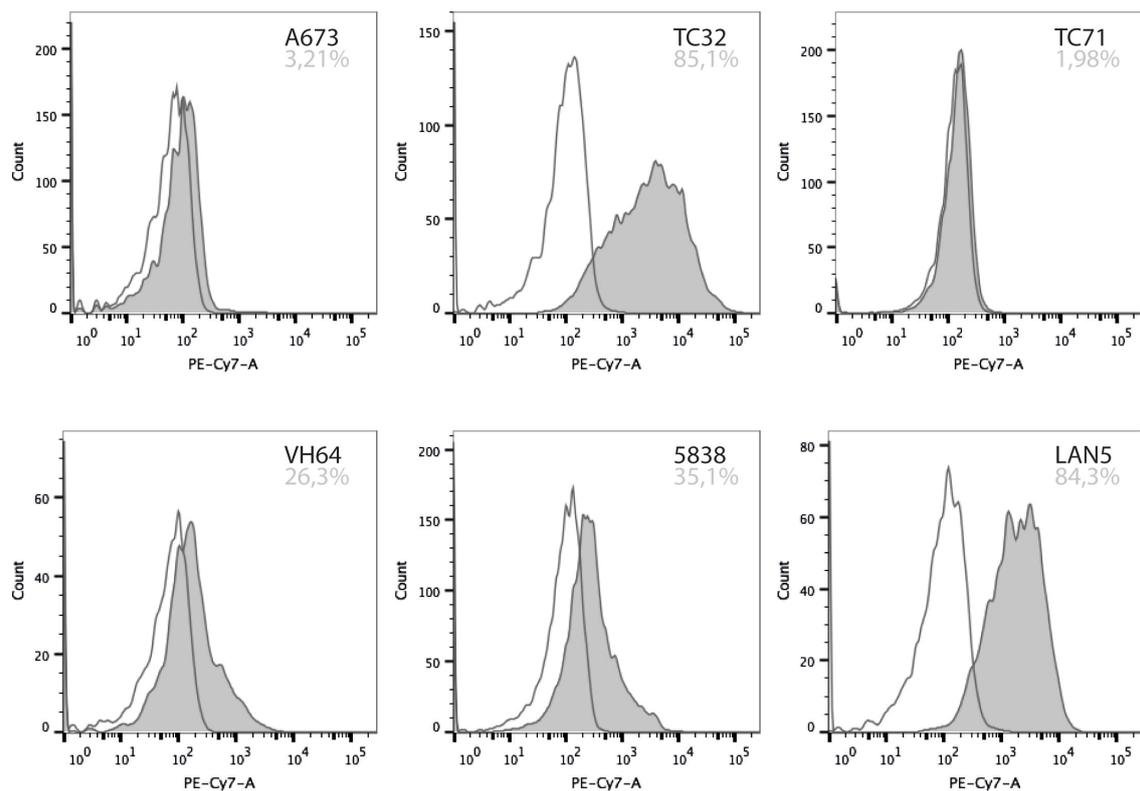
CXCR4 Oberflächenexpression, so haben beispielsweise A673 und TC71 Zellen, trotz deutlicher CXCR4 Expression im Western Blot, keinen nachweisbaren CXCR4 Zelloberflächenanteil (CXCR4-low).

Als Nächstes wurde die Abhängigkeit der CXCR4 Oberflächenexpression von den Kultivierungsbedingungen untersucht. Dazu erfolgte die Bestimmung der CXCR4 Oberflächenexpression nach Kultivierung im serumfreien Medium. Die Kultivierung der Zelllinie LAN5 unter identischen serum-freien Bedingungen war nicht möglich, sodass hier keine Daten für die CXCR4 Oberflächenexpression vorliegen. Wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigte sich im Vergleich der jeweiligen Zelllinie unter serumfreien und serumhaltiger Kultivierung keine signifikante Veränderung der CXCR4 Oberflächenexpression in den analysierten Ewing Sarkom Zelllinien TC32, A673, TC71 und VH64.



**Abbildung 7 CXCR4 Proteinexpression im Zelllysat**

TC32, A673, TC71, VH64 und HL60 Zellen wurden unter Standardbedingungen (10% FBS) kultiviert. Die Bestimmung erfolgte mittels Western Blot unter Einsatz eines polyklonalen CXCR4 Antikörpers. Aktin diente als Ladekontrolle.



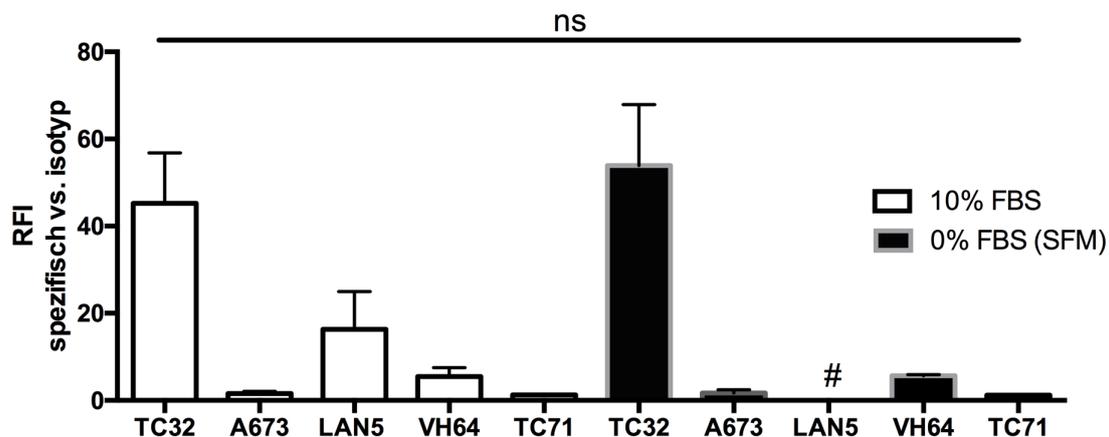
**Abbildung 8 Expression von CXCR4 an der Zelloberfläche**

Zellen der verschiedenen Zelllinien wurden mit einem fluorchrom-konjugierten, spezifischen Antikörper gegen CXCR4 behandelt (gefüllter Graph). Der nichtgefüllte Graph entspricht der unspezifischen Isotyp-Antikörperkontrolle. Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil spezifisch gefärbter Zellen an den analysierten Zellen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.

Zelllinie	RFI Zellen vs. Isotyp Kontrolle	CXCR4
A673	1,6	-
TC32	79,8	+++
TC71	1,2	-
VH64	5,5	+
LAN5	16,29	++
5838	5,2	+

**Tabelle 2 Übersicht über die CXCR4 Oberflächenexpression von Ewing Sarkom Zelllinien**

Einteilung der CXCR4 Oberflächenexpression nach relativer Fluoreszenzintensität RFI als Verhältnis von spezifischer Antikörperbindung und Isotypkontrolle. RFI < 2 „-“ und RFI 2-7 „+“ sehr geringe bis schwache Expression (low), RFI 7-20 mittelstarke Expression „++“ (medium), RFI > 20 starke Expression „+++“ (high). Dargestellt als Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 9 CXCR4 Oberflächenexpression bei Kultivierung in serumhaltigen und serum-freien Medium**

Die Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (10% FBS) und im serum-freien Medium (0% FBS) für 24h kultiviert. Dargestellt als Mittelwerte +/- SD der RFI aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Eingesetzte Zelllinien: CXCR4-high TC32, CXCR4-medium LAN5 als Positivkontrolle, CXCR4-low VH64, A673 und TC71. ns: kein signifikanter Unterschied der RFI Werte zwischen Kultivierung in 10% FBS und 0% FBS (SFM) (t-test). #: nicht durchführbar.

### 3.5. Plerixafor beeinflusst die CXCR4 Proteinexpression

Zur Untersuchung eines Einflusses des CXCR4 Inhibitors Plerixafor auf die CXCR4 Expression als Hinweis auf CXCR4-vermittelte Wirkung erfolgte die Bestimmung der CXCR4 Oberflächenexpression und der CXCR4 Gesamtprotein-expression nach Behandlung mit Plerixafor.

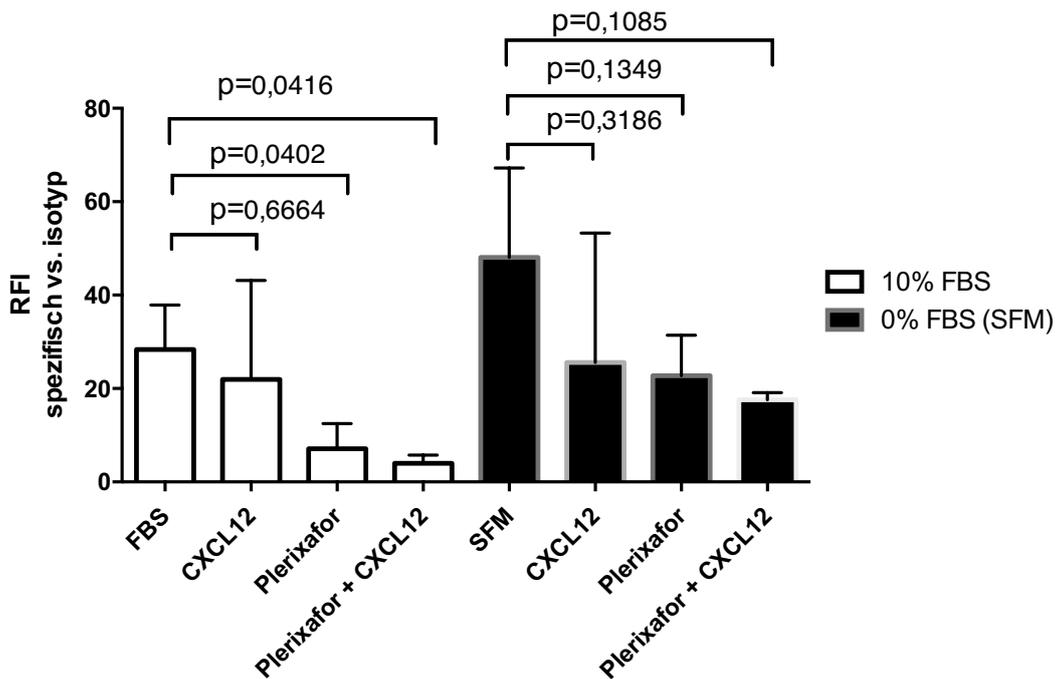
Für die durchflusszytometrische Bestimmung der Zelloberflächenexpression wurde die Ewing Sarkom Zelllinie TC32 eingesetzt, die eine hohe CXCR4 Oberflächenexpression aufwies (Abbildung 8). Die Zellen wurden mit CXCL12, Plerixafor oder beiden Substanzen in Kombination behandelt. CXCL12 bindet als Ligand und Agonist an CXCR4 wurde daher als Kontrolle eingesetzt. Um eine kurzfristige Wirkung von CXCL12 abzubilden, erfolgte die Behandlung in der Konzentration von 100ng/ml über 2h, während die Behandlung mit 1µM Plerixafor über 12h erfolgte. Ferner erfolgte die Behandlung sowohl unter serumhaltigen (10% FBS) als auch unter serum-freien (SFM, 0% FBS) Bedingungen.

Es ergibt sich eine signifikant ( $p < 0,05$ ) verminderte CXCR4 Oberflächenexpression nach Behandlung mit Plerixafor und in der Kombination von Plerixafor und CXCL12 bei serumhaltigen Bedingungen. Bei serumfreien Bedingungen konnte, eine nicht signifikante und daher als Tendenz zu verstehende, verminderte CXCR4 Oberflächenexpression nach Plerixafor bzw. in Kombination mit CXCL12 gezeigt werden.

Es konnte unter beiden Kultivierungsbedingungen keine signifikante Veränderung der CXCR4 Expression durch Behandlung mit CXCL12 detektiert werden. Insgesamt zeigen der CXCR4-Inhibitor Plerixafor und der Agonist CXCL12 gleichgerichtete Effekte. Der CXCR4 Membrananteil nimmt unter beiden Wirkstoffen, deutlicher bei Behandlung mit Plerixafor, ab.

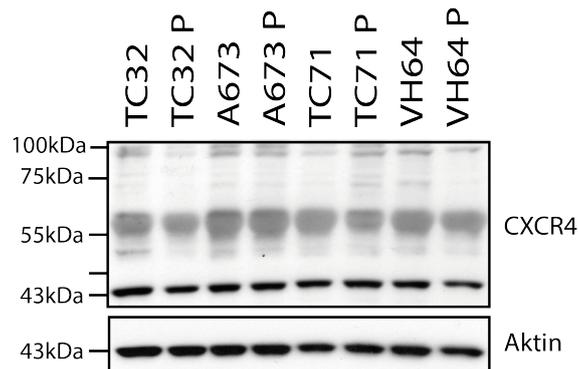
Abbildung 11 bildet die CXCR4 Gesamtproteinexpression nach Behandlung mit Plerixafor ab. Hier wurden neben der zuvor durchflusszytometrisch analysierten Zelllinie TC32 weitere Zelllinien mit nur geringer bis keiner CXCR4 Oberflächenexpression eingesetzt. Auf die Behandlung mit CXCL12 wurde hier bei geringer CXCR4 Oberflächenexpression verzichtet. Die Zelllinie TC32 zeigt nach Plerixafor eine verminderte CXCR4 Expression sowohl der 43kDa Isoform als auch, deutlicher ausgeprägt, der 55kDa Isoform. Weniger deutlich zeigt sich dies auch in VH64 Zellen.

In Zusammenschau mit der durchflusszytometrischen Bestimmung zeigt sich für TC32 Zellen, mit der deutlichen Abnahme der Intensität der 55kDa Bande und weniger der 43kDa nach Plerixafor, die Beteiligung dieser Isoform am CXCR4 Membrananteil.



**Abbildung 10 CXCR4 Oberflächenexpression von TC32 nach Behandlung mit Plerixafor und CXCL12**

Durchflusszytometrische Bestimmung der CXCR4 Oberflächenexpression nach Behandlung mit 100ng/ml CXCL12 für 2h, 1µM Plerixafor für 12h und in Kombination. Die Behandlung erfolgte unter serumhaltigen (10% FBS, weiß) und serumfreien Bedingungen (0% FBS, schwarz). FBS und SFM stellen die jeweilige Kontrolle dar. Dargestellt als Mittelwerte +/- SD aus drei unabhängigen Versuchen. p-Werte bestimmt mit t-Test: Behandlung vs. Kontrolle (FBS bzw. SFM).



**Abbildung 11 CXCR4 Proteinexpression nach Behandlung mit Plerixafor**

TC32, A673, TC71 und VH64 Zellen wurden in serum-haltigem Medium inkubiert. Aufgetragen sind jeweils die unbehandelte Kontrolle und die Behandlung mit Plerixafor (P) in 1µM Endkonzentration für 16h. Aktin diente als Ladekontrolle. Repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen. Eingesetzte Antikörper wie angegeben.

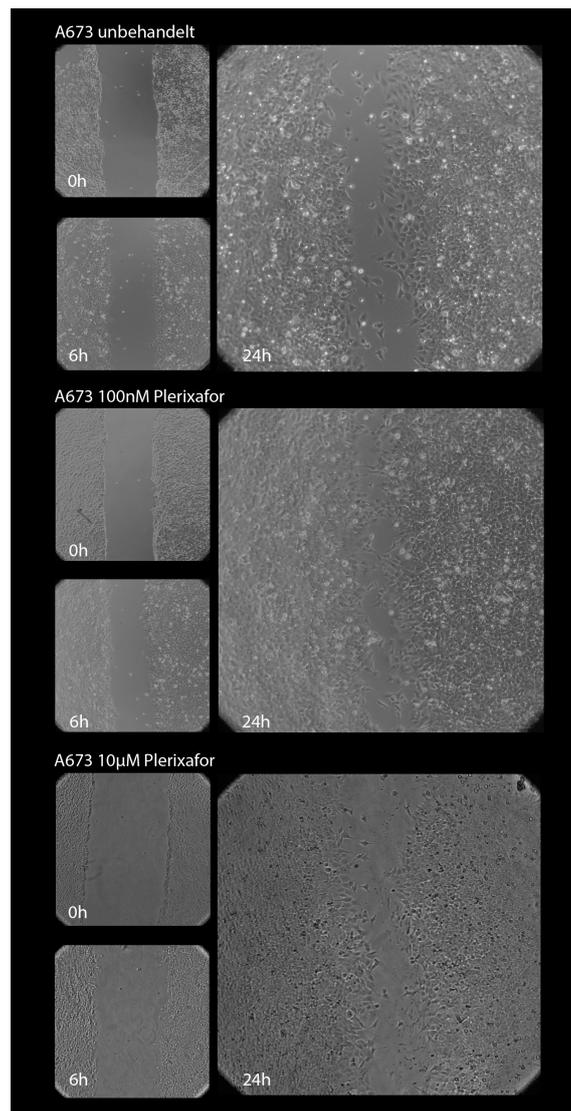
### **3.6. Plerixafor und CXCL12 beeinflussen das Migrationsverhalten**

Zur Untersuchung eines Effekts des CXCR4 Chemokinrezeptor Inhibitors Plerixafor und des Agonisten CXCL12 (SDF-1a) auf die Ewing Sarkom Zellmigration wurden Woundhealing-Assays und Transwell-Chamber-Assays durchgeführt. Für Woundhealing-Assays wurden A673 Ewing Sarkom Zellen genutzt, da TC32 Zellen nicht konsistent reproduzierbare Zellrasen bilden.

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, bei denen ein Scratch nach 24h nicht vollständig durch migrierte Zelle ausgefüllt ist, zeigt sich bei Plerixafor behandelten Zellen eine verstärkte Zellmigration (Abbildung 12). Dieser Effekt ist insbesondere bei der Behandlung mit 100nM Plerixafor nach 24h im Vergleich zur Kontrolle erkennbar (Abbildung 12).

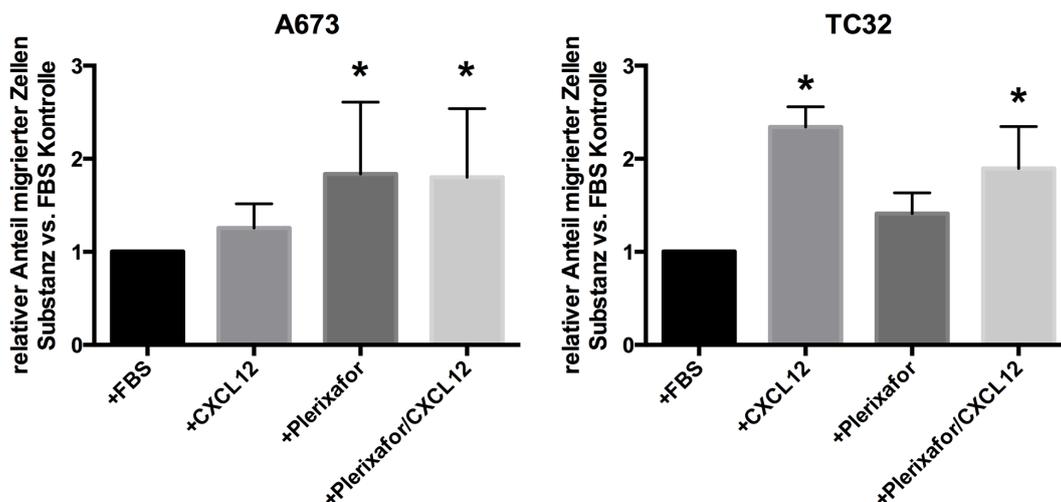
Des Weiteren wurden Transwell-Chamber-Assays eingesetzt, um die Migration von Ewing Sarkom Zelllinien in Richtung eines Plerixafor Gradienten zu untersuchen. Es wurden A673 Zellen, mit geringer CXCR4 Oberflächenexpression, und TC32 Zellen, mit hoher CXCR4 Oberflächenexpression, eingesetzt. CXCL12 wurde hier als Kontrolle für eine CXCR4-vermittelte Migration verwendet. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Transwell-Chamber-Assays zusammengefasst. Bei A673 Zellen mit fehlender CXCR4 Oberflächenexpression konnte kein signifikantes Migrationsverhalten zu CXCL12 nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich bei A673 Zellen eine um ca. 60% vermehrte Migration in Richtung des Plerixafor Gradienten im Kontrollvergleich. Die Kombination eines Gradienten aus CXCL12 und dem Inhibitor Plerixafor bei A673 Zellen zeigt hierzu keine Veränderung des Migrationsverhaltens. TC32 Zellen zeigten eine signifikante Migration in Richtung CXCL12 im Vergleich zur Serumkontrolle. Ein Plerixafor Gradient zeigte eine tendentielle, aber keine signifikante, promigratorische Wirkung auf TC32 Zellen. Die Zellmigration von TC32 Zellen in Richtung des Lockstoffs CXCL12 konnte durch Zusatz von Plerixafor nicht signifikant inhibiert werden (Abbildung 13).

Insgesamt ergibt sich also eine promigratorische Wirkung von Plerixafor im Woundhealing-Assay und Transwell-Chamber-Assay. Diese zeigte sich insbesondere auch bei Zellen geringer bzw. nicht-nachweisbarer CXCR4 Oberflächenexpression (A673). Andererseits scheint Plerixafor eine CXCL12-vermittelte Migration nicht zu inhibieren. Wir vermuteten daher auch nicht-CXCR4-vermittelte Effekte von Plerixafor, die im Folgenden näher untersucht wurden.



**Abbildung 12 Woundhealing Assay Behandlung von A673 mit Plerixafor**

A673 Zellen wurden 24h vor dem Scratch wie angegeben mit Plerixafor in 24-Wellplatten behandelt Der Scratch erfolgte zum Zeitpunkt  $t=0h$ . Die Photographische Dokumentation erfolgte zu angegebenen Zeitpunkten (40x Vergrößerung). Dargestellt ist einer von vier unabhängigen Versuchen.



**Abbildung 13 Migration von A673 und TC32 abhängig von einer Behandlung mit CXCL12 (SDF-1a) oder Plerixafor im Transwell-Chamber-Assay**

A673 und TC32 Zellen wurden für 24h in serumfreiem Medium kultiviert, dann auf Transwell-Membranen mit 8µM großen Poren ausgesiedelt. Die Anzahl migrierter Zellen wurden gegen die Serumkontrolle (+FBS) normalisiert. 100ng/ml CXCL12 und 1µM Plerixafor befanden sich im unteren Kompartiment. Dargestellt sind Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen. Mann-Whitney-U Test Behandlung vs. FBS Kontrolle \*p<0,05.

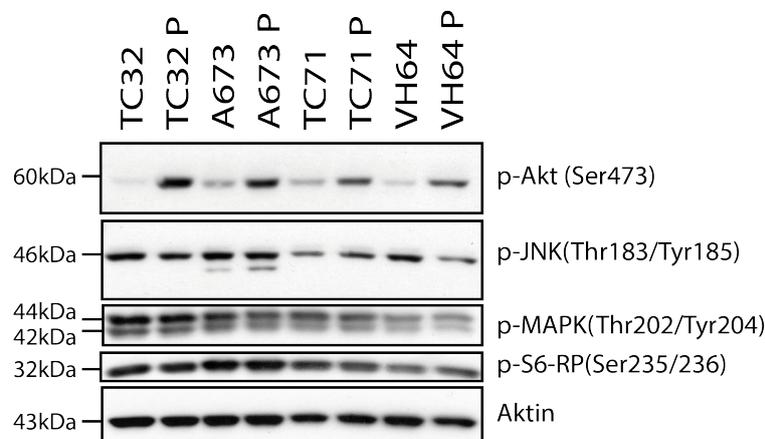
### 3.7. Wirkung von Plerixafor auf Signaltransduktionswege und RTK

#### 3.7.1. Plerixafor führt zur Phosphorylierung der Proteinkinase AKT

Wir analysierten die Wirkung von Plerixafor auf nachgeschaltete Proteinkinasen der Signaltransduktion von RTK und damit auch CXCR4-vermittelte Effekte von Plerixafor. Ziel war es, den Mechanismus der proliferationsinduzierenden und promigratorischen Effekt von Plerixafor zu untersuchen. Detektiert wurden dazu im Western Blot mit der AKT Proteinkinase (p-AKT) und des S6-ribosomalen Proteins (p-S6-RP) phosphorylierte Signalproteine mit Wirkung auf Zellproliferation, sowie mit c-Jun N-terminalen Kinasen (p-JNK) und MAP-Kinasen (p-MAPK) auch Proteine des an Zellmigration beteiligten MAPK-Signalwegs.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, zeigt sich in allen vier eingesetzten Zelllinien nach Plerixafor Behandlung eine vermehrte Phosphorylierung der Proteinkinase AKT, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Phosphorylierung der Proteinkinase JNK ist in den Zellen mit geringer CXCR4 Oberflächenexpression (siehe

Tabelle 2), A673 und TC71 Zellen, nach Behandlung mit Plerixafor leicht vermehrt. Für die Proteinkinasen MAPK und das S6-ribosomales Protein kann keine Veränderung des Phosphorylierungsstatus, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit Plerixafor zeigte sich in den eingesetzten Zelllinien eine vermehrte Aktivierung des p-AKT Signalproteins als Teil des pro-proliferativen PI3K/AKT-Signalwegs. Da auch p-JNK aktiviert wird, kommt es auch zur Aktivierung von Proteinen des promigratorischen MAPK-Signalwegs.



**Abbildung 14 Einfluss des CXCR4 Inhibitors Plerixafor auf die Aktivierung von Signalkaskadenproteinen in Ewing Sarkom Zelllinien.**

TC32, A673, TC71 und VH64 Zellen wurden in serum-haltigem Medium inkubiert. Aufgetragen sind jeweils die unbehandelte Kontrolle und die Behandlung mit Plerixafor (P) in 1µM Endkonzentration für 16h. Aktin diente als Ladekontrolle. Repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen. Eingesetzte Antikörper wie angegeben.

### 3.7.2. Aktivierung von RTK durch Plerixafor

Die Wirkung von Plerixafor auf den Phosphorylierungsstatus von 49 Rezeptor Tyrosinkinasen wurde mit phospo-RTK Arrays untersucht. Es sollten hierbei CXCR4-vermittelte und direkte Wirkungen von Plerixafor auf das RTK Netzwerk abgebildet werden. Verwendet wurden daher TC32 Zellen mit hohem CXCR4 Membrananteil sowie A673 Zellen mit niedriger CXCR4 Oberflächenexpression. Beide Zelllinien zeigten zuvor unter Plerixafor vermehrtes Zellwachstum. Die Behandlungszeiten von einer Stunde (1h) bzw. 16 Stunden (16h) wurden ge-

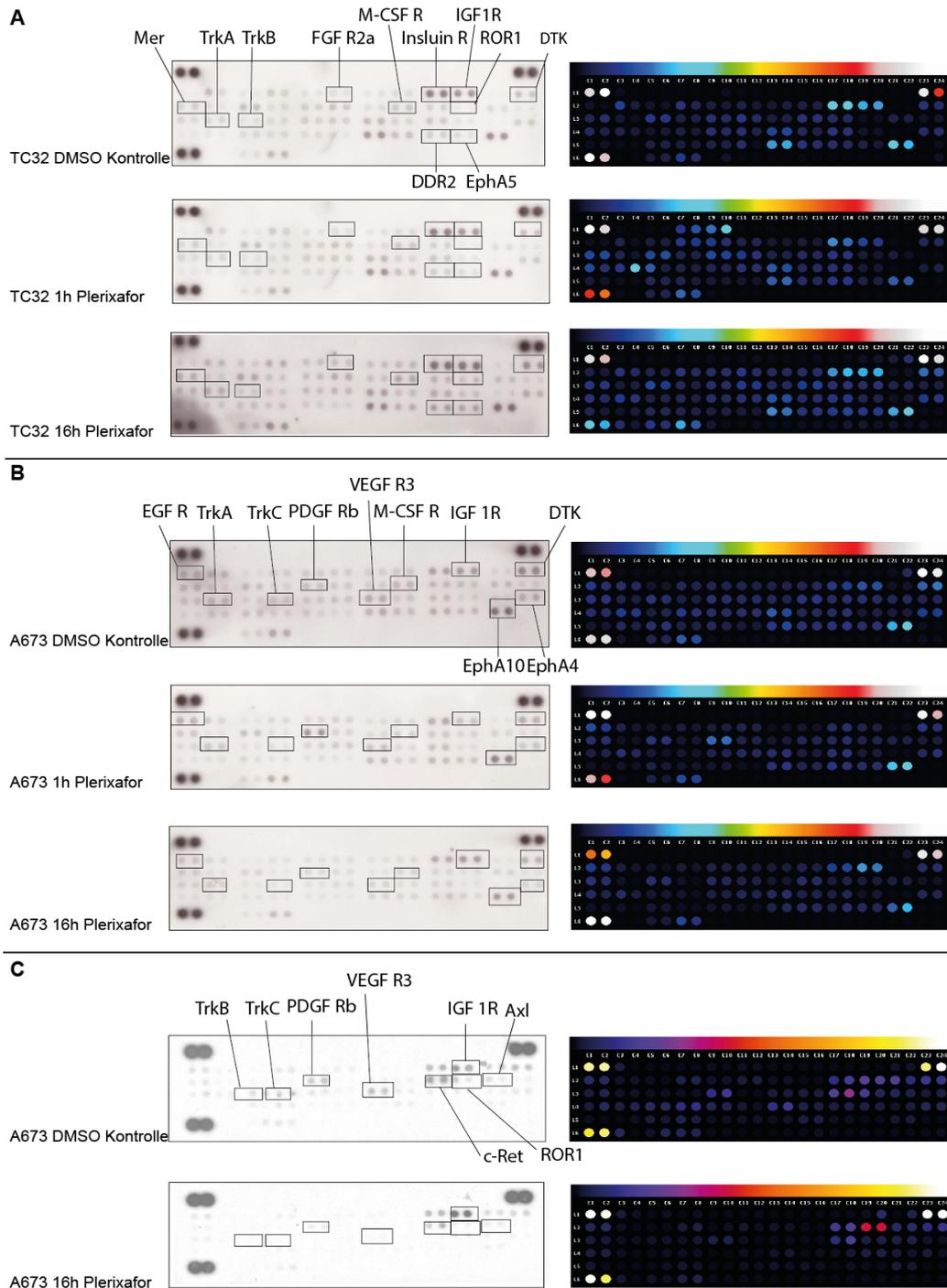
wählt, um kurzwirksame, direkte (1h) sowie langfristige, indirekte Effekte (16h) aufzugreifen. Zur Untersuchung des Effekts auf die RTK Aktivierung bei hoher Plerixafor Konzentration wurden A673 Zellen in einem weiteren Versuch mit 5 $\mu$ M Plerixafor über 16h behandelt. DMSO behandelte Zellen wurden als Lösungsmittelkontrolle eingesetzt. Abbildung 15 bildet die jeweiligen Array Membranen sowie generierte heatmaps zur Übersicht ab, markiert sind hier im jeweiligen Vergleich zur DMSO Kontrolle RTK Duplikate mit signifikant veränderter Pixeldichte. Bereits optisch, anhand der Array Membranen, wie in Abbildung 15, zeigt sich für die Zelllinie TC32 eine Phosphorylierung der IGF-1R und Insulin R RTKs nach Behandlung mit 1 $\mu$ M Plerixafor für 1h und 16h im Vergleich zur DMSO behandelten Kontrolle (Abbildung 15A). Bei der A673 Zelllinie ist ebenfalls eine Phosphorylierung der IGF-1R und Insulin R RTKs sowie der EphA10 RTK erkennbar. Die RTK PDGF Rb ist bei der DMSO Kontrolle der A673 nur schwach phosphoryliert, eine Zunahme der Phosphorylierung ist aber nach Behandlung mit Plerixafor erkennbar.

Abbildung 16 stellt die densitometrische Auswertung der RTK Aktivierung dar. Abbildung 17 fasst die Ergebnisse aus Abbildung 16 zur RTK Phosphorylierung in der Übersicht zusammen. Dargestellt sind hier diejenigen RTK mit signifikant veränderter Pixeldichte, d.h. Phosphorylierung nach Behandlung mit Plerixafor. Es zeigt sich hier für TC32 Zellen nach Behandlung mit Plerixafor die Aktivierung der RTK TrkA, TrkC, EphA4, EphA5, EphA10, FGFR2a, FGF R1, DTK und M-CSF R. Initial (1h Plerixafor) ist IGF-1R deaktiviert, überwiegend TrkA, TrkB sind hier initial aktiv. Bei längerer Behandlung (16h) zeigt sich insbesondere die Aktivierung IGF-1R und mit EphA4, EphA5, EphA10 die Aktivierung von RTK der Ephrinrezeptor Familie.

Herausstechend in Abbildung 17 ist bei der TC32 Zelllinie eine scheinbar deutliche Aktivierung der RTK ROR1, die mit ca. 20-facher Aktivierung im Vergleich deutlich heraussteht. Bei insgesamt aber sehr geringer Pixeldichte ist hier von einem Messartefakt auszugehen, zu dessen Aufdeckung wir im Folgenden die ROR1 Proteinexpression untersuchten.

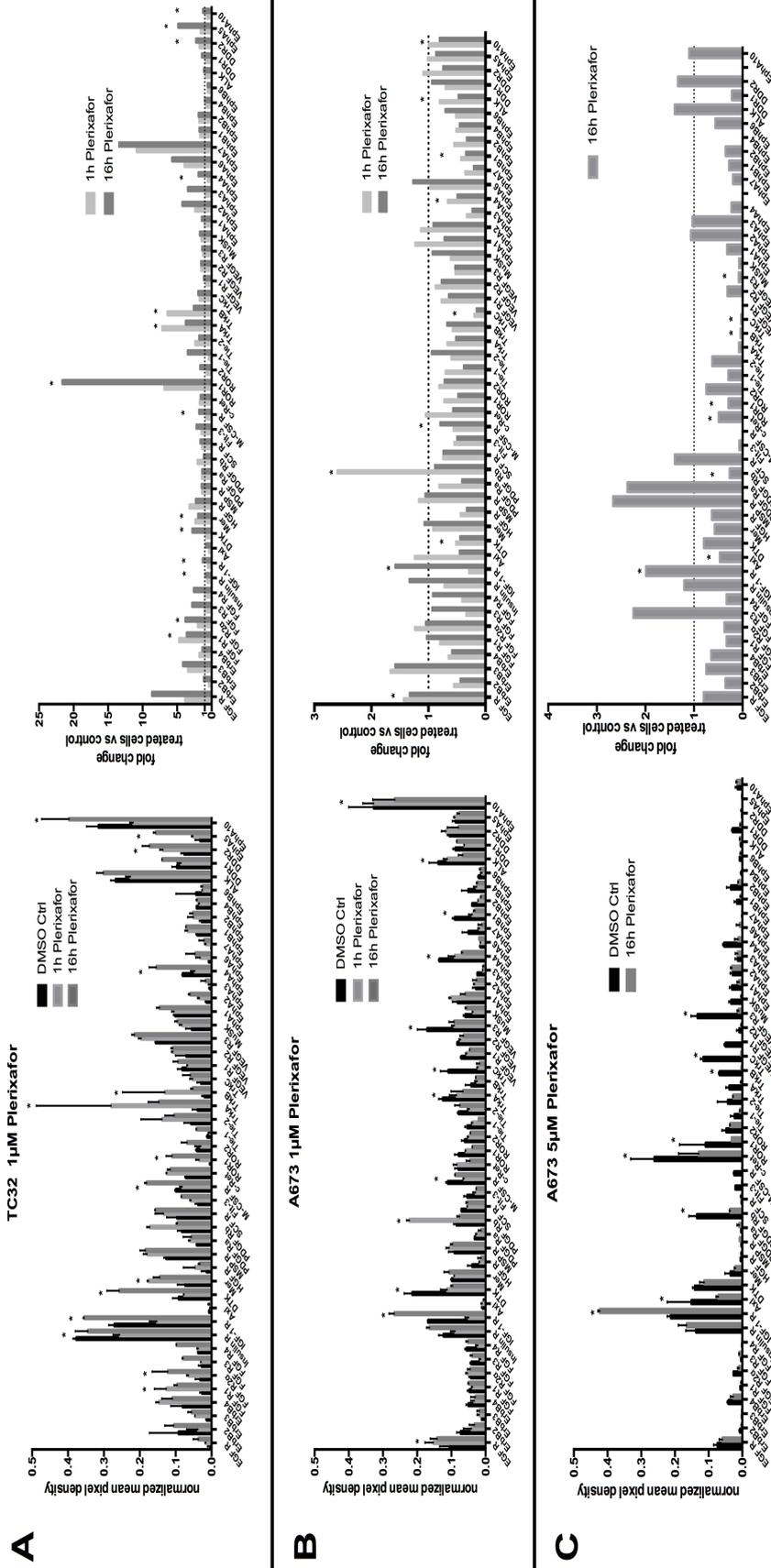
Im Gesamtbild zeigen sich untersuchte RTK für A673 Zellen nach Behandlung mit Plerixafor überwiegend desaktiviert. Vorrübergehend (nach 1h) zeigt sich durch Plerixafor eine deutliche Aktivierung von PDGF Rb und EGF R in A673 Zellen. IGF-1R ist zunächst desaktiviert, zeigt allerdings nach längerer Behandlung (16h) und nach Einsatz erhöhter Plerixaforkonzentration (5 $\mu$ M) eine deutliche Aktivitätssteigerung. ROR1 zeigt in A673 Zellen, im Gegensatz zu TC32 Zellen, keine signifikante Aktivitätsänderung.

Zusammenfassend zeigt sich für TC32 und A673 ein unterschiedliches Muster der RTK Aktivitätsänderung nach Plerixafor. TC32 Zellen zeigen nach der Behandlung mit Plerixafor eine überwiegende Aktivitätszunahme von RTK, u.a. von TrkA, TrkC und der Ephrinrezeptor Kinasen, einer Zielstruktur von Dasatinib. A673 Zellen zeigen insgesamt eher eine RTK Aktivitätsabnahme. Auffällig ist die Aktivierung von PDGF Rb, einer weiteren Zielstruktur von Dasatinib, in A673 Zellen nach Plerixafor. Bemerkenswert ist außerdem eine konstante Aktivierung von den RTK EGF R und Erb B3 in beiden verwendeten Zelllinien sowohl als direkter als auch als indirekter Effekt von Plerixafor.



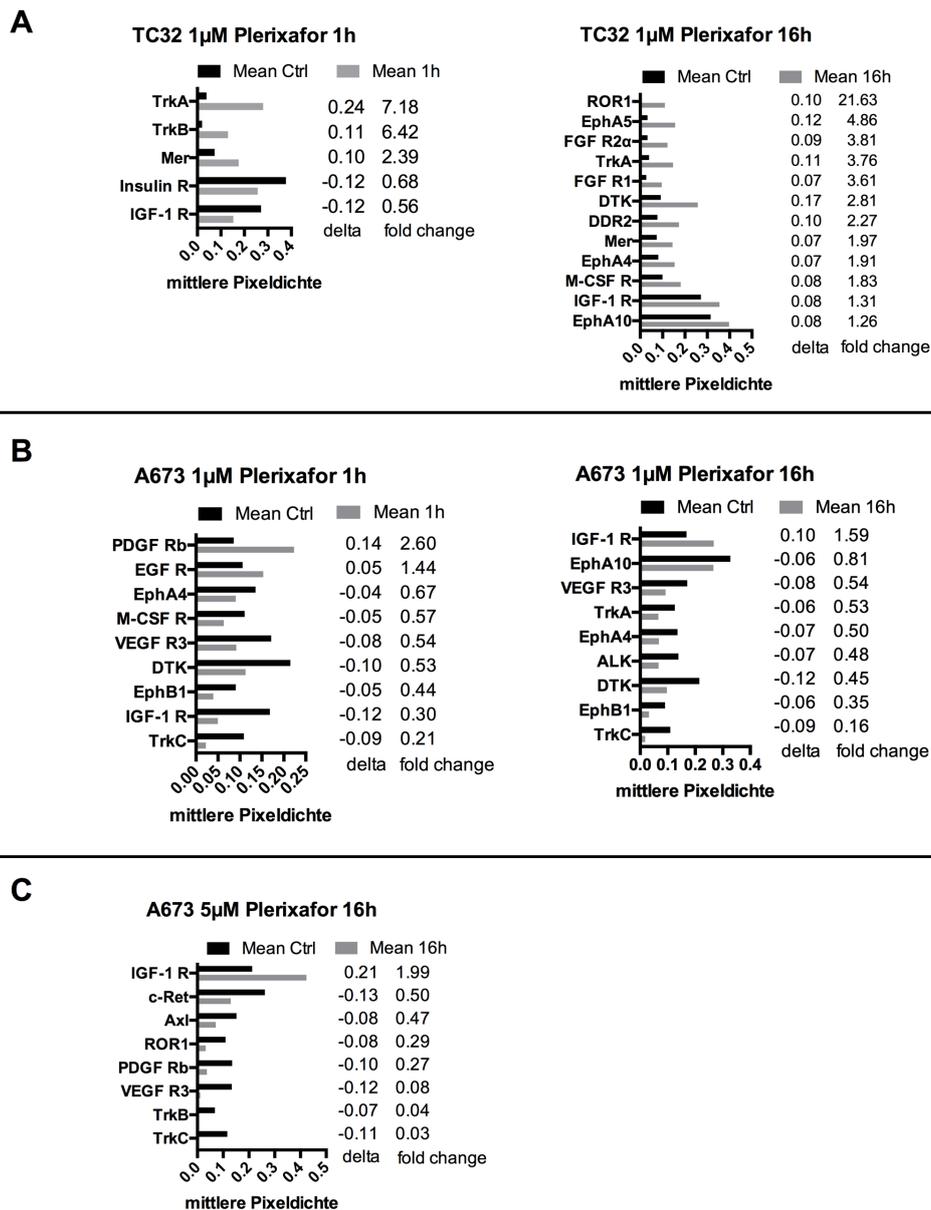
**Abbildung 15 Phosphorylierungsstatus von 49 RTKs in TC32 und A673 Zellen nach Behandlung mit Plerixafor**

Dargestellt sind die Ergebnisse des Human RTK Array Kit. 400µg Proteinlysate von TC32 **(A)** und A673 **(B)** Zellen nach Behandlung mit 1µM Plerixafor für 1h bzw. 16h. Zusätzlich für A673 Zellen erfolgte die Analyse nach 16h mit 5µM Plerixafor **(C)**. Markiert sind RTK mit signifikanter Änderung der Pixeldichte ( $p < 0,05$ ) als Membran (Mitte) und als nach bestimmter Pixeldichte abgestufte heatmap von hoher (hier: weiß) bis niedriger (hier: blau-schwarz) Pixeldichte der Membranen (rechts).



**Abbildung 16** Auswertung der RTK Aktivität nach Behandlung mit Plerixafor im phospho-RTK Array

Analyse des Human-phospho-RTK-Arrays nach Behandlung von TC32 (A) und A673 (B) Zellen mit 1µM Plerixafor mit Behandlungsdauer von 1h und 16h, sowie A673 (C) nach Behandlung mit 5µM Plerixafor. Jeweils dargestellt ist die DMSO Lösungsmittelkontrolle in äquivalenter Konzentration (DMSO Ctrl.). Dargestellt als Mittelwert  $\pm$ SD aus Bestimmung im Duplikat und gegen Array Kontrollfelder normalisierte Pixeldichten (normalized mean pixel density), sowie als relative Veränderung der Pixeldichte gegenüber der DMSO Kontrolle (fold change). \* $p < 0,05$  signifikant veränderte Pixeldichten behandelte Zellen gegenüber der jeweiligen DMSO Kontrolle.



**Abbildung 17 Übersicht der RTK mit signifikant veränderter Phosphorylierung durch Plerixafor**

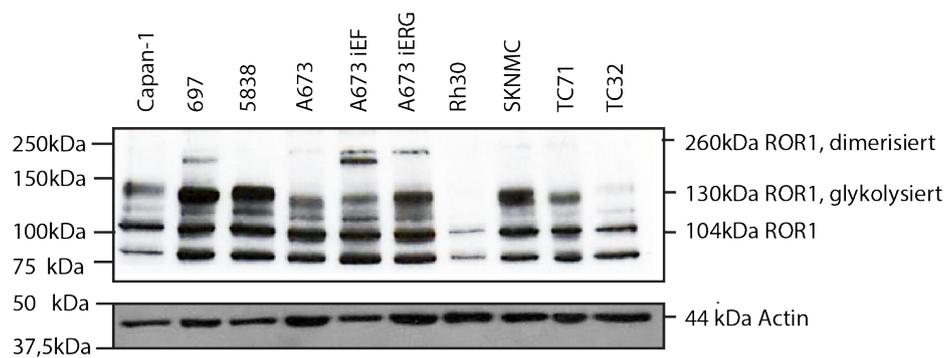
TC32 (A), A673 (B) und A673 (C) Zellen nach Behandlung mit Plerixafor wie angegeben. Dargestellt sind die mittlere Pixeldichte der jeweiligen Kontrolle (Mean Ctrl) und der Behandlung (Mean 1h/16h), die Differenz (delta) der absoluten Pixeldichte (Behandlung - Kontrolle) und die fold change als relative Veränderung (Behandlung vs. Kontrolle). Nur RTK mit signifikant veränderter Phosphorylierung im Kontrollvergleich sind abgebildet ( $p < 0,05$ ).

Die RTK ROR1 stach mit hoher Änderungsrate bei TC32 Zellen im phospho-RTK heraus, sodass wir im Folgenden, zur Aufdeckung eines möglichen Messartefakts, die ROR1 Proteinexpression untersuchten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Schnittmenge mit weiteren Projekten die Proteinexpression und Oberflächenproteinexpression von ROR1 in TC32 und weiteren Ewing Sarkom Zelllinien zum Vergleich bestimmt. Die folgenden Ergebnisse dieser Arbeit zu ROR1 sind auch in Publikationen unserer Arbeitsgruppe eingeflossen [87].

Wie in Abbildung 18 dargestellt, ist die ROR1 Expression auf Proteinebene in Ewing Sarkom Zellen mit mehreren Isoformen nachweisbar. Die Leukämie (ALL) Zelllinie 697 diente als Positivkontrolle für ROR1 [118]. Verschiedene und vorbeschriebene Protein-Isoformen konnten nachgewiesen werden: die ROR1 Bande mit 104kDa bildet das nicht glykolysierte Protein ab, die Bande bei 130 kDa das glykosylierte ROR1 Protein und die 260kDa mögliche ROR1 Dimere [119,120]. Die glykosylierte Isoform von ROR1 ist als aktive und an der Zelloberfläche lokalisierte Isoform beschrieben [119]. Diese aktive 130kDa Isoform konnte in der Kontrolllinie 697 und in den Zelllinien 5838, A673, A673 mit funktionellem Knockdown des EWS-FLI1 (iEF) und des EWS-ERG (iERG) Transkriptionsfaktors, SKNMC, TC71 deutlich nachgewiesen werden. In der Rhabdomyosarkomzelllinie RH30 blieb der Nachweis insbesondere der aktiven Isoform aus, in der TC32 Zelllinie zeigte sich diese nur leicht angedeutet.

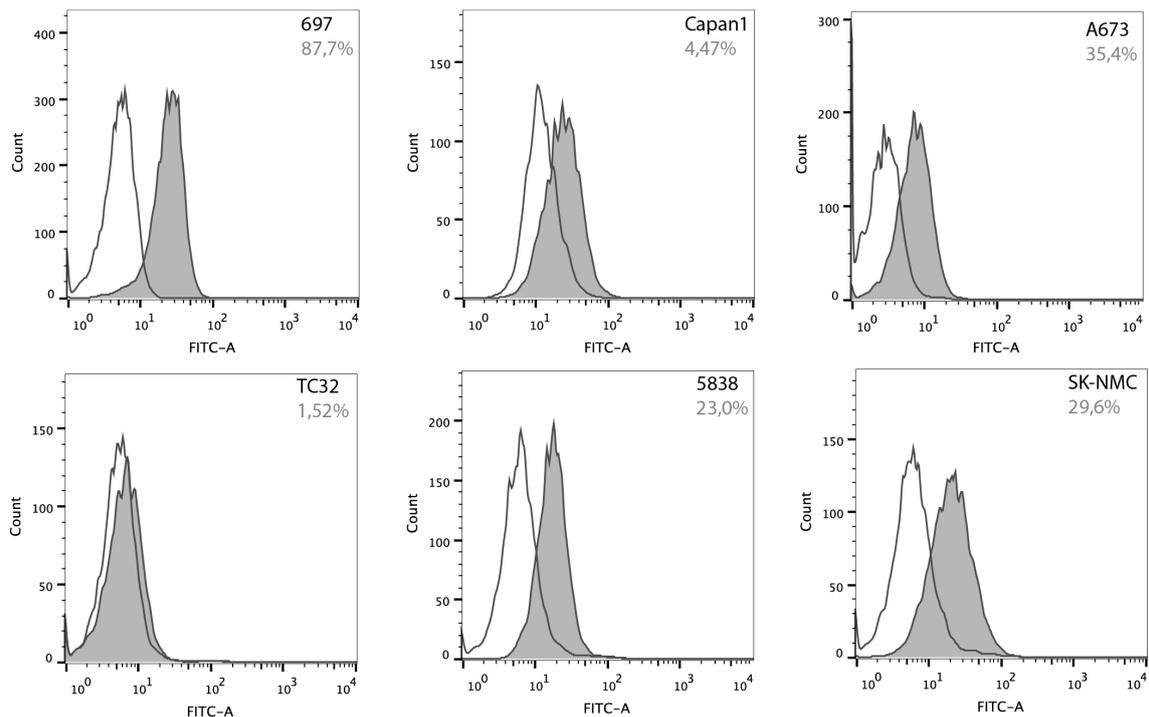
Die durchflusszytometrische Analyse zur ROR1 Oberflächenexpression ist in Abbildung 19 und Tabelle 3 gezeigt. Als Positivkontrolle für die Oberflächenexpression von ROR1 dient die Leukämiezelllinie 697, als Negativkontrolle die Pankreaskarzinomzelllinie Capan-1 [118,121]. ROR1 Expression an der Zelloberfläche konnte bei drei von sechs analysierten Zelllinien nachgewiesen werden; 5838, A673 und SK-NMC waren ROR1 positiv, TC32 war ROR1 negativ. Die nachgewiesene aktive 130kDa Isoform von ROR1 in den untersuchten Ewing Sarkom Zelllinien und der ALL-Zelllinie 697 korrelierte mit der an der Zelloberfläche nachweisbaren ROR1 Expression.

In der TC32 Zelllinie zeigt sich eine geringe ROR1 Gesamtproteinexpression und keine relevante Oberflächenexpression des aktiven ROR1. Insgesamt ist also, bei fehlendem Nachweis der aktiven ROR1 Isoform als Oberflächenprotein in TC32 Zellen und sehr geringen Pixeldichten in 3.7.2, von keiner relevanten Aktivierung von ROR1 durch Plerixafor auszugehen, sodass es sich hier um ein Messartefakt handelt.



**Abbildung 18 ROR1 Gesamt-Proteinexpression in Ewing Sarkom Zelllinien**

Western Blot Analyse der ROR1 Expression. Die Zelllinie A673 iEF mit funktionellem Knockdown des EWS-FLI1 Transkriptionsfaktors, A673 iERG mit Knockdown von EWS-ERG (Knockdown verifiziert, hier nicht dargestellt). Aktin diene als Ladekontrolle.



**Abbildung 19 ROR1 Proteinexpression an der Zelloberfläche**

Angegebene Zelllinien wurden mit einem fluorchrom-konjugierten, spezifischen Antikörper gegen ROR1 behandelt (gefüllter Graph). Der nichtgefüllte Graph entspricht der unspezifischen Isotyp-Antikörperkontrolle. Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil spezifisch gefärbter Zellen an den analysierten Zellen.

Zelllinie	RFI Zellen vs. Isotyp Kontrolle	ROR1
697	4,450	+++
Capan1	1,965	-
A673	2,648	+
TC32	1,132	-
5838	2,497	+
SK-NMC	2,868	++

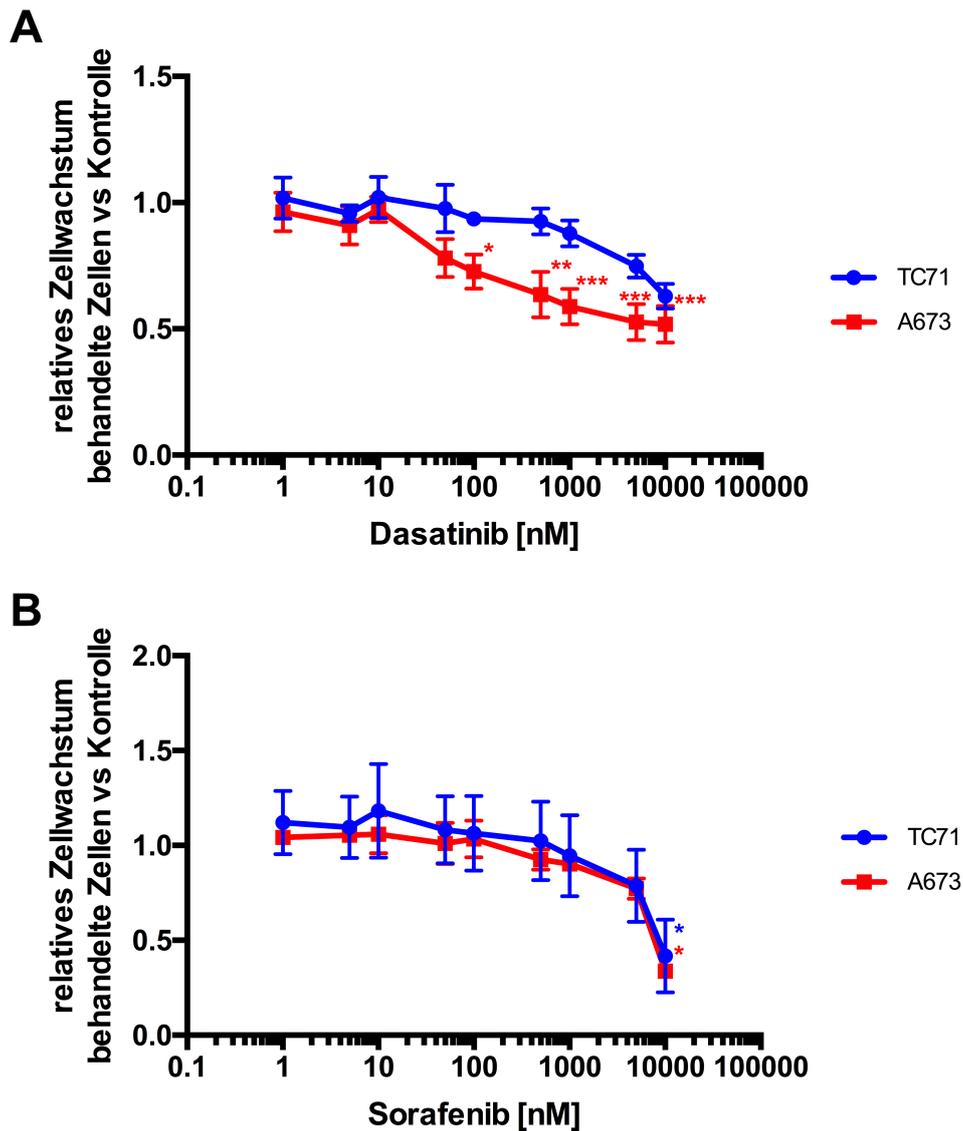
**Tabelle 3 Übersicht über die ROR1 Oberflächenexpression von Ewing Sarkom Zelllinien**

Einteilung der ROR1 Oberflächenexpression nach relativer Fluoreszenzintensität RFI als Verhältnis von spezifischer Antikörperbindung und Isotypkontrolle. 697 Zellen als Positivkontrolle, Capan-1 Zellen als Negativkontrolle. RFI < 2 keine Expression „-“, RFI 2-2,8 schwache Expression „+“, RFI 2,8-4 mittelstarke Expression „++“, RFI > 4 starke Expression „+++“. Dargestellt sind Werte aus einmaliger Bestimmung.

### **3.8. Dasatinib und Sorafenib hemmen das Zellwachstum**

Eine proliferationshemmende Wirkung der RTK Inhibitoren Dasatinib und Sorafenib auf verschiedene Ewing Sarkom Zelllinien wurde im WST-1 Assay bestimmt. A673 und TC71 Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Dasatinib und Sorafenib behandelt und die Zellvitalität, d.h. der Anteil stoffwechselaktiver und vitaler Zellen, nach 72h bestimmt. Abbildung 20 zeigt die dosisabhängige Hemmung des Zellwachstums durch die RTK Inhibitoren. Die jeweiligen  $IC_{50}$ -Werte, also die Konzentration, bei der eine halbmaximale proliferationsinhibierende Wirkung beobachtet wurde, wurden graphisch ermittelt. Die  $IC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 4 dargestellt.

Bei der Behandlung mit Dasatinib ergab sich für die Zelllinie TC71 ein signifikant höherer  $IC_{50}$ -Wert als für die Zelllinie A673. Die Konzentration für einen halbmaximalen Effekt lag für Dasatinib bei der Zelllinie TC71 etwa vierfach höher als bei der Zelllinie A673. Die Wirkungskurven für die Behandlung mit Sorafenib von A673 und TC71 verlaufen weitgehend parallel (Abbildung 20) und die  $IC_{50}$ -Werte unterscheiden sich nicht signifikant. Bei der Behandlung mit Dasatinib zeigt sich die Zelllinie TC71 resistenter als A673, für Sorafenib unterschied sich die Sensibilität beider Zelllinien nicht signifikant (Tabelle 4).



**Abbildung 20 Dasatinib und Sorafenib inhibieren das Zellwachstum von Ewing Sarkom Zelllinien**

TC71 und A673 Zellen wurden mit Dasatinib **(A)** oder Sorafenib **(B)** in Konzentrationen von 0,001 $\mu$ M – 10 $\mu$ M (logarithmisch skaliert) für 72h inkubiert. Alle Werte sind in Bezug zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Student's t-Test Behandlung vs. Kontrolle  $p < 0.05$  \*;  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.001$  \*\*\*.

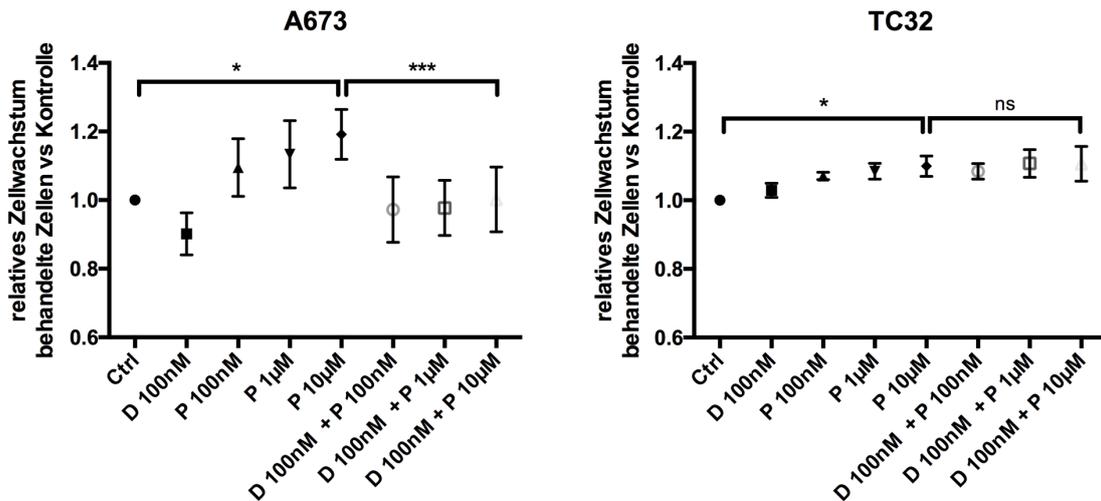
**Tabelle 4 IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M)-Werte von Dasatinib und Sorafenib**

Zelllinie	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) Dasatinib	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) Sorafenib
A673	6,06	7,82
TC71	25,25	8,71

### **3.9. Dasatinib hemmt Plerixafor vermitteltes Zellwachstum**

Dasatinib als TKI, der neben Src und ABL Kinasen auch inhibierende Wirkung auf RTK der PDGF Rezeptor Familie und der Ephrinrezeptor Familie (EphA, EphB) zeigt, wurde in Kombination mit Plerixafor für Zellviabilitätsassays eingesetzt [122]. Dies erfolgte ausgehend von den Ergebnissen des phospho-RTK Arrays (Abbildung 16) mit der transienten Aktivierung von Dasatinib Zielstrukturen wie PDGF Rb in A673 Zellen und der Eph RTK in TC32 Zellen nach Behandlung mit Plerixafor. Für die Untersuchungen wurde exemplarisch die CXCR4-low Zelllinie A673 und die CXCR4-high Zelllinie TC32 ausgewählt.

Es wurde mit 100nM eine niedrige Dasatinib Konzentration gewählt, die deutlich unter dem zuvor bestimmten  $IC_{50}$ -Wert von Dasatinib für A673 Zellen lag (Tabelle 4), um keine Beeinflussung der Zellvitalität allein durch Dasatinib zu bewirken. Dasatinib als alleiniger Wirkstoff zeigte hier keine signifikante Beeinflussung der Zellviabilität beider Zelllinien. Wie in Abbildung 21 dargestellt, zeigt sich dosisabhängig ein gesteigertes Zellwachstum, mehr in A673 als in TC32 Zellen, durch Behandlung mit Plerixafor bei einer verkürzten Behandlungszeit mit 24h. Die Behandlungszeit wurde so gewählt, um die eher kurzwirksamen RTK Aktivitätsänderungen abzubilden und mit Dasatinib zu beeinflussen. In A673 Zellen reproduziert sich nach Behandlung mit 10 $\mu$ M Plerixafor ein proliferationsinduzierender Effekt. Dasatinib hebt diese Wirkung auf, d.h. in Kombination zeigt sich keine Zellviabilitätszunahme durch Plerixafor (Abbildung 21). In TC32 Zellen konnte eine vergleichsweise geringere Zellvitalitätszunahme nach Behandlung mit Plerixafor festgestellt werden. Die Kombination von Dasatinib mit Plerixafors zeigte keine signifikante Änderung dieses Effekts, im direkten Vergleich. Es zeigte sich hier auch eine Zellviabilitätszunahme bei Zusatz von Dasatinib. Auffällig ist, dass Dasatinib die proliferative Wirkung von Plerixafor in A673 Zellen, also Zellen mit fehlendem CXCR4 Membrananteil, aufhebt, während sich in TC32 Zellen hier keine Änderung zeigt.



**Abbildung 21 Zellbehandlung von A673 und TC32 mit der Kombination von Plerixafor und des TKI Dasatinib**

Die Behandlung der Zellen erfolgte in dargestellten Inhibitor Konzentrationen im Zellmedium. Bei kombinierter Behandlung erfolgte die Dasatinib (D) Behandlung 2h vor Behandlung mit Plerixafor (P). Die Auswertung wurde nach 24h Inhibitor Inkubation mittels WST-1 Assay durchgeführt. Dargestellt als Mittelwerte +/-SD der relativen Werte in Bezug zur Kontrolle aus dreimaliger Bestimmung. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (t-Test).

#### 4. Diskussion

Zunächst sollen die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit zusammengefasst werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen wider Erwarten eine proliferative Wirkung des CXCR4-Inhibitors Plerixafor in 4/4 Ewing Sarkom Zelllinien und in 1/4 primären Ewing Sarkom Kulturlinie. G-CSF und der CXCR4-Agonist CXCL12 hingegen beeinflussten die Zellviabilität nicht. In der FACS Analyse zeigte sich ein breites Spektrum der CXCR4 Oberflächenexpression der Zelllinien. Für weitere Versuche wurden die Zelllinie TC32 mit hoher (CXCR4-high) und die Zelllinie A673 mit niedriger (CXCR4-low) CXCR4 Oberflächenexpression verwendet. Plerixafor beeinflusste die CXCR4 Proteinexpression, in den untersuchten TC32 CXCR4-high Zellen zeigte sich der CXCR4 Membrananteil nach Plerixafor signifikant vermindert. Auf Proteinebene zeigten die verwendeten Ewing Sarkom Zelllinien neben einer 43kDa CXCR4 Isoform eine im Kontrollvergleich zusätzliche 55kDa Isoform, die am CXCR4 Membrananteil beteiligt zu sein scheint.

Die Zellmigration wurde durch Plerixafor und CXCL12 stimuliert mit überwiegend pro-migratorischen Effekten von Plerixafor in CXCR4-low A673 Zellen und von CXCL12 in CXCR4-high TC32 Zellen. Des Weiteren zeigte Plerixafor eine Aktivierung von Signalproteinen nachgeschalteter Signalwege mit p-AKT und teilweise p-JNK, nicht aber p-MAPK. In den phospho-RTK Arrays zeigte sich die transiente Aktivierung der RTK PDGF Rb durch Plerixafor. Dasatinib in Kombinationsbehandlung mit Plerixafor inhibierte signifikant Plerixafor-vermitteltes Zellwachstum in CXCR4-low A673 Zellen. Dies weist insgesamt auf eine Beteiligung von RTK an einem nicht-CXCR4-vermittelten Effekt von Plerixafor hin.

Die folgende Diskussion soll zunächst die vorliegenden Ergebnisse in den Kontext anderer Studien einordnen, die CXCR4 und/oder die Wirkung von Plerixafor in vitro untersuchten. Anschließend werden molekulare Mechanismen und nicht-CXCR4-vermittelte Effekte von Plerixafor diskutiert. Zuletzt werden die

Einschränkungen der in vitro Ergebnisse und Bedeutung der Ergebnisse für weiterführende Untersuchungen, sowie für den klinischen Einsatz von Plerixafor diskutiert.

#### Einfluss von Plerixafor auf Zellviabilität und Zellmigration

Berghuis et al. [41] konnten keine Wirkung von Plerixafor auf die Zellproliferation nachweisen. In der Studie wurde mit u.a. CADO, EW3, SK-ES-1 und SK-N-MC ein anderes Spektrum an Ewing Sarkom Zellen verwendet, das CXCR4-high (CADO, EW3) und CXCR4-low (SK-ES-1, SK-N-MC) Zellen umfasste. Hingegen zeigten wir, im Gegensatz zu der Studie von Berghuis et al., eine proliferationsfördernde Wirkung von Plerixafor sowohl auf CXCR4-high (TC32, VH64) als auch auf CXCR4-low (A673, TC71) Ewing Sarkom Zelllinien, sowie einer primären Ewing Sarkom Kulturlinie. Einen Hauptunterschied sehen wir in dem zeitlichen Ablauf. Die Behandlungsdauer war bei Berghuis et al. mit 7 Tagen deutlich länger als in unserer Studie, bei insgesamt mit 1000ng/ml (entsprechend ca. 1,26µM) geringerer Plerixaforkonzentration. Eine signifikante Zunahme der Zellviabilität stellte sich in der vorliegenden Arbeit erst bei höheren Konzentrationen ein, die von Berghuis et al. nicht untersucht wurden. Der direkte Vergleich beider Studien ist aufgrund der Modalitätsunterschiede nicht gut möglich. Die vorliegende Arbeit bildet also, insgesamt mit kürzerer Behandlungsdauer, eher kurzfristige und eher direkte Effekt von Plerixafor ab. Bei einer längeren 7-tägigen Behandlung, wie in der Studie von Berghuis et al., sind weitere Effekte und unter anderem auch ein möglicher Wirkungsverlust von Plerixafor in Betracht zu ziehen. Ferner konnten Berghuis et al. eine gesteigerte Zellproliferation durch CXCL12 in CXCR4-positiven Zellen feststellen, die durch Vorbehandlung mit Plerixafor inhibiert werden konnte. In den von uns untersuchten CXCR4-low Zelllinien A673 und TC71, wie in Kapitel 3.2 dargestellt, zeigte sich erwartungsgemäß keine Änderung der Zellviabilität durch CXCL12, wie auch Berghuis und Kollegen für andere CXCR4-low Zelllinien unter ähnlichen Versuchsbedingungen zeigten. Eine autokrine bzw. parakrine Wachstumsstimulation über die CXCR4-CXCL12-Achse ist auch für andere Tumoren

beschrieben z.B beim Multiplen Myelom [123], bei Glioblastomzellen [124] und bei Ewing Sarkomen Zelllinien [41].

In der vorliegenden Arbeit wurde das Spektrum untersuchter Ewing Sarkom Zelllinien erweitert. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass eine proliferative Wirkung von Plerixafor auch auf CXCR4-low Zelllinien durch, nicht direkt-CXCR4-vermittelte, Mechanismen in der Wirkung von Plerixafor möglich erscheinen lassen.

Krook et al. [42] untersuchten in ihrer Studie die Zellmigration von CXCR4-positiven Ewing Sarkom Zellen entlang eines CXCL12-Gradienten, die sich in unseren Arbeiten bestätigte. Durch Vorbehandlung mit Plerixafor und funktionellen CXCR4-Knockdown konnten Krook et al. die chemotaktische Wirkung von CXCL12 auf CXCR4-positive Zellen inhibieren. Krook et al. verwendeten insgesamt gleiche Konzentrationen für CXCL12 und mit 2,5µg/ml (entsprechend ca. 3µM) für Plerixafor leicht höhere Konzentrationen, sodass sich hier in Bezug zur chemotaktischen Wirkung aufgrund des Versuchsaufbaus und gleicher Konzentrationen von CXCL12 Vergleichbarkeit ergibt. In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich die chemotaktische Wirkung von Plerixafor auf CXCR4-low A673-Zellen und CXCR4-high TC32 Zellen, die auch Krook et al. einsetzten, untersucht. Interessanterweise zeigte sich für Plerixafor eine pro-migratorische Wirkung mit signifikant gesteigerter Migration entlang eines Plerixafor-Gradienten für CXCR4-low A673 Zellen, nicht aber für CXCR4-high TC32 Zellen. In Zusammenschau mit der Studie von Krook et al., die eine deutliche Abhängigkeit des Migrationsverhaltens von einer CXCR4-CXCL12 Achse zeigt, ist im Hinblick auf die pro-migratorische Wirkung von Plerixafor auch auf CXCR4-low Zellen, von einer Beteiligung nicht-CXCR4-vermittelter Mechanismen auszugehen.

#### CXCR4 Expression und Beeinflussung durch Plerixafor

Um die CXCR4 Proteinexpression und die Wirkung von Plerixafor auf CXCR4 als molekulare Zielstruktur in Ewing Sarkom Zellen zu untersuchen, verwende-

ten wir FACS und Western Blot. Es wurde somit die Wirkung auf Proteinebene und damit direkt funktionell relevante Strukturen betrachtet. Die CXCR4 Oberflächenexpression war in den analysierten Zelllinien insgesamt heterogen, darunter CXCR4-high TC32 Zellen und CXCR4-low A673 Zellen. Unsere Ergebnisse erweitern das Spektrum untersuchter Zelllinien und decken sich teilweise mit den Ergebnissen von Berghuis et al. [41] und Krook et al. [42]. Die von Krook et al. beschriebene dynamische und von Kultivierungsbedingungen abhängige CXCR4 Oberflächenexpression, konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand gleicher untersuchter Zelllinien nicht reproduziert werden.

Krook et al. beschreiben in ihrer Studie insgesamt eine geringe Zunahme des Anteils CXCR4-positiver Zellen unter serum-freien Bedingungen. Die in dieser Arbeit betrachtete RFI bzw. mittlere Fluoreszenzintensität in Bezug zur Isotypkontrolle bildet eher die CXCR4 Oberflächenexpression der Zellpopulation ab und schließt auch Änderungen der Rezeptordichte einzelner Zellen mit ein. So dass nach Krook et al. durch Wachstumsfaktorentzug anteilig mehr Zellen CXCR4-positiv sind.

Nach den hier vorgelegten Ergebnissen ändert sich unter diesen Bedingungen, bei nicht signifikant veränderten RFI-Werten, der CXCR4 Membranproteingehalt nicht. Nach unseren Ergebnissen zeigten sich gleichgerichtete Effekte auf die CXCR4 Oberflächenexpression nach CXCL12 und deutlicher nach Plerixafor Behandlung, sodass von einer Wirkung beider Wirkstoffe auf CXCR4 mit Rezeptorinternalisierung ausgegangen werden kann. Kim et al. [125] zeigen ein Partialagonismus von Plerixafor in Myelomzellen in vitro, der auch hier eine Rezeptorinternalisierung erklären würde.

Die gezeigte 55kDa CXCR4 Isoform in Zelllysaten der in der vorliegenden Arbeit analysierten Zelllinien scheint mit der pro-proliferativen Wirkung von Plerixafor assoziiert zu sein. Eine direkte Korrelation mit der CXCR4 Oberflächenexpression zeigte sich hier nicht, auch FACS CXCR4-low Zellen zeigten deutlich die 55kDa Isoform. Hingegen beschreiben Carlisle et al. für Neuroblastom-

zellen [116] eine Assoziation dieser Isoform mit hoher CXCR4 Oberflächenexpression, die für die untersuchten Ewing Sarkom Zellen nicht zu gelten scheint. Gleichwohl zeigen unsere Ergebnisse eine Abnahme der CXCR4 Oberflächenexpression und der 55kDa-Isoform im Zelllysate durch Plerixafor in CXCR4-positiven Zelllinien, woraus geschlossen werden kann, dass diese Isoform auch am CXCR4 Membrananteil beteiligt ist.

Insgesamt beeinflusst Plerixafor, wie auch CXCL12, die CXCR4 Oberflächenexpression und teilweise die CXCR4 Proteinexpression, sodass ein Partialagonismus von Plerixafor möglich ist. Weitere Studien sind nötig, um dies nachzuweisen und die funktionelle Relevanz der CXCR4 Isoformen in Ewing Sarkom Zellen zu verstehen.

Plerixafor aktiviert den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg

Unsere Arbeiten zeigen eine Plerixafor-vermittelte Phosphorylierung der AKT bzw. Proteinkinase B an der aktivierenden Phosphorylierungsstelle (Ser473) [126]. Als Protein des onkogenen PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs ist AKT ein Signalprotein, das Zellwachstum und Proliferation vermittelt [127]. Die Expression von AKT in Ewing Sarkomen ist mit schlechter Prognose assoziiert [128].

Kim et al. zeigten für Myelomzellen und HCC Zelllinien eine Aktivierung von AKT durch Plerixafor. Pertussistoxin, ein potenter Inhibitor G-Protein gekoppelter Rezeptoren wie CXCR4, inhibierte die pro-proliferative Wirkung von Plerixafor, sodass Kim et al. von einem Partialagonismus von Plerixafor am Chemokinrezeptor CXCR4 mit AKT Aktivierung und Proliferationssteigerung ausgehen [125]. Nach unseren Ergebnissen hingegen kann eine Wirkung von Plerixafor auf die Phosphorylierung von AKT durch die gezeigte Plerixafor-vermittelte Aktivierung weiterer RTK erklärt werden. IGF-1R [93], EGF R [129], PDGF Rb [130] sind RTK, die eine Aktivitätszunahme nach Behandlung mit Plerixafor zeigen und deren Signaltransduktion den AKT Signalweg involvieren und somit Zellproliferation und Zellwachstum beeinflussen.

Eine CXCR4-Spezifität für Plerixafor ist beschrieben [60], dennoch zeigen unsere Daten auch in CXCR4-low A673 Zellen die Aktivierung von RTK durch Plerixafor, sodass auch nicht-CXCR-vermittelte Wirkungen von Plerixafor in Ewing Sarkom Zellen anzunehmen sind oder Plerixafor-unabhängig von der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche agiert. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Aktivierung des AKT-Signalwegs durch Plerixafor kann also die proliferative Wirkung von Plerixafor erklären. Weitere Experimente sind nötig, um den exakten molekularen Mechanismus aufzudecken.

#### Aktivierung von RTK durch Plerixafor

Ein wichtiges und bisher nicht beschriebenes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass Plerixafor direkt RTK in Ewing Sarkom Zelllinien aktiviert.

Die Zunahme der Phosphorylierung von ROR1 (Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1) durch Plerixafor in der Zelllinie TC32 ist als Messartefakt aufzufassen. Bei insgesamt, wie unseren Ergebnissen gezeigt, schwacher ROR1 Expression der relevant-aktiven 130kDa-Isoform [119,120] und im phospho RTK-Array sehr niedrigen Pixeldichtenwerte ergibt sich, trotz hoher Änderungsrate, keine relevante Aktivierung von ROR1. Am ehesten ist dies auf kleinere Messungenauigkeiten bei Bestimmung der Pixeldichte zurückzuführen. ROR1 zählt zu den RTK und ist eine in unserer Arbeitsgruppe bereits untersuchte RTK, die vermehrt in Tumorproben von Patienten mit metastasiertem Ewing Sarkom nachgewiesen werden konnte und an pro-migratorischen Prozessen beteiligt zu sein scheint [87]. Wir verweisen an dieser Stelle auf bereits von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichte Daten, zu denen Ergebnisse dieser Arbeit zur ROR1 Expression beigetragen haben [87].

Eine gleichbleibende Aktivierung der RTK EGF R und der verwandten RTK Erb B3 nach kurzer und langer, 16-stündiger, Behandlung mit Plerixafor in CXCR4-high und -low Zellen wurde in dieser Arbeit gezeigt. Diese Wirkung scheint somit nicht von der CXCR4 Expressionsdichte abhängig zu sein und, da auch bei kurzer Behandlungszeit bestehend, spezifisch zu sein. Über die funktionelle

Bedeutung von EGF R und Erb B3 in Ewing Sarkomen ist nur wenig bekannt. Beschrieben ist die Inhibition des Zellwachstums durch EGF R- Inhibitoren in Ewing Sarkom Zellen in vitro [131]. Die Expression und Aktivierung der RTK Erb B3 mit Wirkung auf die Zellproliferation ist hingegen in Klarzellsarkom Zellen beschrieben [132]. Da sich insgesamt nur teilweise eine signifikante Aktivitätszunahme von EGF R und Erb B3 ergab, untersuchten wir diese RTK im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter. Über die Rolle der RTK Familie Eph im Ewing Sarkom, die mit EphA4, EphA5 und EphA10 hier eine Aktivitätszunahme nach Plerixafor zeigten, ist ebenfalls wenig bekannt. Eph Rezeptoren scheinen regulatorisch beteiligt an Zelltransformation und Zellmigration in Tumoren zu sein [133].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivitätszunahme von PDGF Rb in A673 Zellen nach 1-stündiger Behandlung mit Plerixafor untersucht. Anzunehmen ist, aufgrund der kurzen Behandlungszeit, ein eher spezifischer und direkter Effekt von Plerixafor auf diese RTK. Da diese Zelllinie keinen CXCR4 Oberflächenbesatz zeigte, ist hier von einem nicht-CXCR4-vermittelten Effekt auszugehen. Uren et al. zeigten die Expression der RTK PDGF Rb in Ewing Sarkomen und Zelllinien mit funktioneller Wirkung von PDGF Rb auf Zellmigration sowie Zellwachstum durch Aktivierung nachgeschalteter Signalwege, wie dem proliferativen PI3K/AKT-Signalweg [134]. Weitere Studien zeigten ähnliche Ergebnisse und wiesen auch eine Aktivierung und damit funktionelle Relevanz von PDGF Rb in Ewing Sarkom Zellen nach [135,136]. Obwohl unsere Ergebnisse zur Wirkung von Plerixafor auf RTK neu sind, stimmen sie in Bezug auf die mechanistische Aktivierung des nachgeschalteten PI3K/AKT Signalwegs durch PDGF Rb überein [134,136]. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse eine nicht-CXCR4-vermittelte Wirkung von Plerixafor auf RTK mit konsekutiver Aktivitätszunahme mehrerer RTK. Diese Wirkung kann die beobachtete proliferative und teilweise die pro-migratorische Wirkung von Plerixafor erklären.

#### Kombination von Plerixafor mit Dasatinib zur RTK Inhibition

Dasatinib als Einzelsubstanz zeigte eine proliferationshemmende Wirkung im Rahmen dieser Arbeit. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte für Ewing Sarkom Zelllinien

entsprachen weitgehend den Ergebnissen von Timeus et al. [137]. Wir konnten hier das Spektrum bekannter  $IC_{50}$ -Werte für Dasatinib in Ewing Sarkom Zelllinien erweitern. Dasatinib, als potenter Inhibitor von PDGF Rb und auch Ephrinrezeptor Kinasen [110,138] konnte die pro-proliferative Wirkung von Plerixafor aufheben. Die verwendete Konzentration für Dasatinib lag hier mit 100nM deutlich niedriger als der  $IC_{50}$ -Wert, sodass keine wesentliche inhibitorische Wirkung allein durch Dasatinib anzunehmen ist. Es zeigt sich eine funktionelle Beteiligung der RTK PDGF Rb an nicht-CXCR4-vermittelten Effekten von Plerixafor. Die proliferationssteigernde Wirkung von Plerixafor in CXCR4-low Zellen können wir somit durch nicht-CXCR4-vermittelte Aktivierung von PDGF Rb erklären und durch Dasatinib in geringer Konzentration in vitro inhibieren.

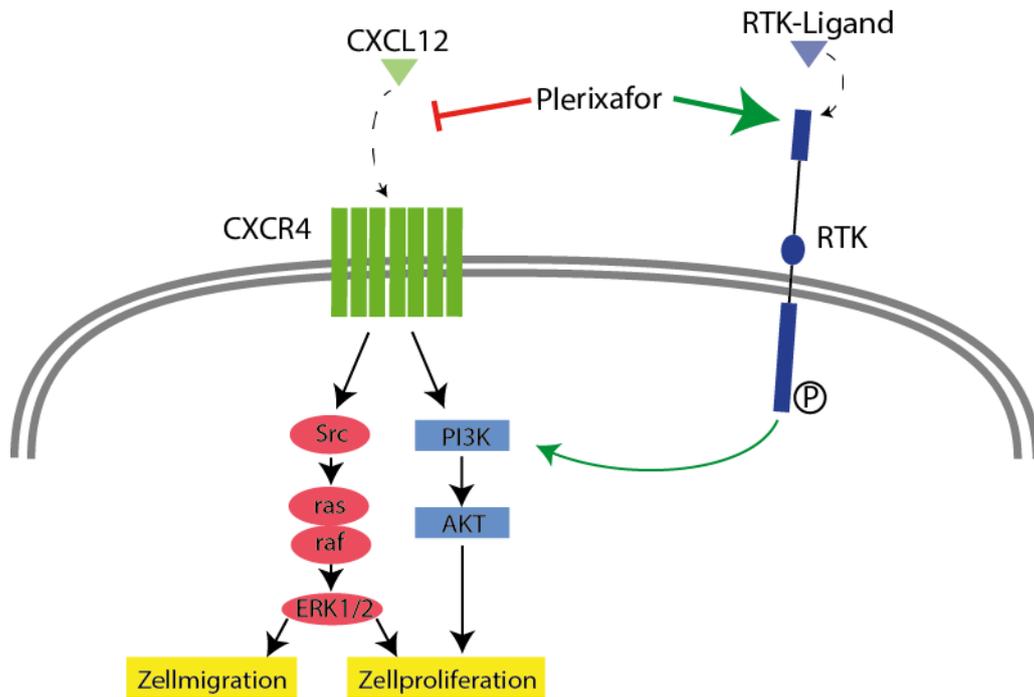
Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte neben Dasatinib auch für den TKI Sorafenib [108]. In einer Phase 2 Studie zeigten Patienten mit fortgeschrittenem Ewing Sarkom eher geringes Therapieansprechen [139]. Die bestimmten  $IC_{50}$ -Werte lagen mit ca.  $8\mu\text{M}$ , entsprechend etwa  $3,72\text{mg/l}$ , relativ hoch im Vergleich zur maximalen Plasmakonzentration von  $2,31\text{mg/l}$  –  $9,81\text{mg/l}$  in Studien an Patienten mit therapierefraktären soliden Tumoren [140]. Basierend auf unseren Ergebnissen ergab sich, aufgrund anderer beschriebener Zielstrukturen (1.3.1) keine weitere Verwendung für Sorafenib in dieser Arbeit.

#### Einschränkungen und Bedeutung dieser Arbeit

Wir präsentieren in dieser Arbeit Ergebnisse aus in vitro Versuchen zum Effekt von Plerixafor auf Ewing Sarkom Zellen. Eine Reproduktion des Umgebungsmilieus von Ewing Sarkom Zellen in vivo ist für in vitro Versuche nicht möglich, sodass möglicherweise eine eingeschränkte Übertragbarkeit auf entsprechende Tumorzellen in Patienten besteht. Aufgrund reduzierter Einflüsse, beispielsweise durch fehlende Immunzellen oder Zellinteraktion mit Tumorstroma, ergeben sich kontrollierte Bedingungen für in vitro Versuche, die die Untersuchung von Wirkstoffeffekten auf Rezeptoren ermöglichen. Dennoch ergeben sich für Versuche mit in vitro Zellen durch Zellkonfluenz, Mediumzusatz von 10% fötalem

Kälberserum und Passagenzahlen mögliche Einflüsse auf das Zellverhalten und damit die Ergebnisse. Kontrollen mit Zellen unter identischen Kultivierungsbedingungen und passender Wirkstoffbehandlung wurden in dieser Arbeit eingesetzt. Die durchgeführten in vitro Versuche sind insgesamt eine geeignete Methode, um den Effekt von Plerixafor auf Ewing Sarkom Zellen in vitro zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit zeigt einen pro-tumorigenen Effekt des CXCR4 Inhibitors Plerixafor auf Ewing Sarkom Zelllinien und Zellkulturen. Für Plerixafor konnte eine proliferationsfördernde und pro-migratorische Wirkung gezeigt werden. Plerixafor bewirkte eine direkte, CXCR4-vermittelte Wirkung auf RTK mit Aktivierung von PDGF Rb, EGF R, Ephrin RTK. Es zeigt sich nachgeschaltet eine Aktivierung von Signalproteinen des proliferationsfördernden PI3K/AKT Signalwegs. Abbildung 22 fasst diesen Effekt in der Übersicht zusammen. Dasatinib konnte den proliferationsfördernden Effekt von Plerixafor teilweise aufheben. Plerixafor findet neben GCSF Verwendung zur Stammzellmobilisierung. Die Stammzellmobilisation ist, wie eingangs beschrieben, Bestandteil von Therapieprotokollen bei Ewing Sarkom Patienten. Der gezeigte pro-tumorigene Effekt von Plerixafor gibt Anlass, die klinische Verwendung bei Ewing Sarkom Patienten zu überdenken. Weitere Untersuchungen der direkten bzw. indirekten Effekte von Plerixafor, besonders auch auf das RTK-Netzwerk, können wertvolle weitere Einblicke in die Tumorbilogie des Ewing Sarkoms geben.



**Abbildung 22 Zusammenfassung des Effekts von Plerixafor auf Ewing Sarkom Zelllinien**

Modifiziert nach Liao et al. [30] und Xu et al. [78]. Schwarze und grüne Pfeile bilden Phosphorylierung oder Aktivierung ab. Rote Pfeile stehen für Inhibition.

## 5. Literaturverzeichnis

- [1] Paulussen M, Ahrens S, Craft AW, Dörffel W and Dunsr J (1999) EICESS 92 ( European Intergroup Cooperative Ewing ' s Sarcoma Study ) - Erste Ergebnisse. *Klin. Pädiatr.*, 211: 276–283.
- [2] Kaatsch P (2010) Epidemiology of childhood cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 36: 277–85.
- [3] Stiller CA, Bielack SS, Jundt G and Steliarova-Foucher E (2006) Bone tumours in European children and adolescents, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur. J. Cancer*, 42: 2124–35.
- [4] Askin FB, Rosai J, Sibley RK, Dehner LP and McAlister WH (1979) Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer*, 43: 2438–51.
- [5] Llombart-Bosch A, Lacombe MJ, Contesso G and Peydro-Olaya A (1987) Small round blue cell sarcoma of bone mimicking atypical Ewing's sarcoma with neuroectodermal features. An analysis of five cases with immunohistochemical and electron microscopic support. *Cancer*, 60: 1570–82.
- [6] Doyle L a. (2014) Sarcoma classification: An update based on the 2013 World Health Organization Classification of Tumors of Soft Tissue and Bone. *Cancer*, 120: 1763–1774.
- [7] Hromas R and Klemsz M (1994) The ETS oncogene family in development, proliferation and neoplasia. *Int. J. Hematol.*, 59: 257–65.
- [8] Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, et al. (1994) A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat. Genet.*, 6: 146–51.
- [9] Kovar H, Dworzak M, Strehl S, Schnell E, et al. (1990) Overexpression of the pseudoautosomal gene MIC2 in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor. *Oncogene*, 5: 1067–70.
- [10] Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, et al. (1991) MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer*, 67: 1886–93.
- [11] Rossow KL and Janknecht R (2001) The Ewing's sarcoma gene product functions as a transcriptional activator. *Cancer Res.*, 61: 2690–5.
- [12] Ohno T, Ouchida M, Lee L, Gatalica Z, et al. (1994) The EWS gene, involved in Ewing family of tumors, malignant melanoma of soft parts and desmoplastic small round cell tumors, codes for an RNA binding protein with novel regulatory domains. *Oncogene*, 9: 3087–97.
- [13] Burd CG and Dreyfuss G (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, 265: 615–21.
- [14] Owen LA, Kowalewski AA and Lessnick SL (2008) EWS/FLI mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS One*, 3: e1965.
- [15] Prieur A, Tirode F, Cohen P and Delattre O (2004) EWS/FLI-1 silencing

- and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 7275–83.
- [16] Nakatani F, Tanaka K, Sakimura R, Matsumoto Y, et al. (2003) Identification of p21WAF1/CIP1 as a direct target of EWS-Flt1 oncogenic fusion protein. *J. Biol. Chem.*, 278: 15105–15.
- [17] Ladenstein R, Pötschger U, Le Deley MC, Whelan J, et al. (2010) Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *J. Clin. Oncol.*, 28: 3284–91.
- [18] Rud NP, Reiman HM, Pritchard DJ, Frassica FJ and Smithson WA (1989) Extrasosseous Ewing's sarcoma. A study of 42 cases. *Cancer*, 64: 1548–53.
- [19] Hawkins D, Bölling T, Dubois S, Hogendoorn P, et al. (2011) Ewing Sarcoma. In: Poplack, D. G. and Pizzo, P. A. (Hrsg.), Principles and Practice of Pediatric Oncology, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 6. Aufl., S. 987–1014.
- [20] Widhe B and Widhe T (2000) Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma. *J. Bone Joint Surg. Am.*, 82: 667–74.
- [21] U.S. National Library of Medicine. (2009) Study in Localized and Disseminated Ewing Sarcoma (EWING 2008). NCT00987636. Webseite: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00987636>. [Zugriff am: 07-Jun-2015].
- [22] Oberlin O, Deley MC, Bui BN, Gentet JC, et al. (2001) Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumours: the third study of the French Society of Paediatric Oncology (EW88 study). *Br. J. Cancer*, 85: 1646–54.
- [23] Le Deley M-C, Paulussen M, Lewis I, Brennan B, et al. (2014) Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 trial. *J. Clin. Oncol.*, 32: 2440–8.
- [24] Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, Craft A, et al. (1998) Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. *Ann. Oncol.*, 9: 275–81.
- [25] Stahl M, Ranft A, Paulussen M, Bölling T, et al. (2011) Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer*, 57: 549–53.
- [26] Rasper M, Jabar S, Ranft A, Jürgens H, et al. (2014) The value of high-dose chemotherapy in patients with first relapsed Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer*, 61: 1382–6.
- [27] Yuan Q-Y, Gu Y-P, Wang C-J, Zhang H and Wang X-P (2015) Identification of dysregulated pathways associated with pancreatic cancer by survival analysis. *Mol. Med. Rep.*, 11: 277–82.
- [28] Zhang J, Yang PL and Gray NS (2009) Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 9: 28–39.
- [29] Zirafi O, Kim K-A, Ständker L, Mohr KB, et al. (2015) Discovery and Characterization of an Endogenous CXCR4 Antagonist. *Cell Rep.*, 737–747.

- [30] Liao YX, Zhou CH, Zeng H, Zuo DQ, et al. (2013) The role of the CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in the progression and metastasis of bone sarcomas (Review). *Int. J. Mol. Med.*, 32: 1239–1246.
- [31] Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer*, 4: 540–550.
- [32] Guo S, Xiao D, Liu H, Zheng X, et al. (2014) Interfering with CXCR4 expression inhibits proliferation, adhesion and migration of breast cancer MDA-MB-231 cells. *Oncol. Lett.*, 1557–1562.
- [33] Anon (2003) Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine*, 21: 48–49.
- [34] Allen SJ, Crown SE and Handel TM (2007) Chemokine:Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu. Rev. Immunol.*, 25: 787–820.
- [35] Daub H, Weiss FU, Wallasch C and Ullrich a (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379: 557–560.
- [36] Cattaneo F, Guerra G, Parisi M, De Marinis M, et al. (2014) Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. *Int. J. Mol. Sci.*, 15: 19700–19728.
- [37] Ptasznik A and Gewirtz AM (2000) Crosstalk between G protein-coupled receptors and tyrosine kinase signaling: Src take centre stage. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*, 48: 27–30.
- [38] Fischer OM, Hart S, Gschwind A and Ullrich A (2003) EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.*, 31: 1203–8.
- [39] Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, et al. (2004) Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J.*, 18: 1240–2.
- [40] Bennani-Baiti IM, Cooper A, Lawlor ER, Kauer M, et al. (2010) Intercohort gene expression co-analysis reveals chemokine receptors as prognostic indicators in Ewing's sarcoma. *Clin. Cancer Res.*, 16: 3769–78.
- [41] Berghuis D, Schilham MW, Santos SJ, Savola S, et al. (2012) The CXCR4-CXCL12 axis in Ewing sarcoma: promotion of tumor growth rather than metastatic disease. *Clin. Sarcoma Res.*, 2: 24.
- [42] Krook M, Nicholls L and Scannell C (2014) Stress-Induced CXCR4 Promotes Migration and Invasion of Ewing Sarcoma. *Molecular cancer research*, 12: 953–964.
- [43] Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, et al. (1997) Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.*, 16: 6996–7007.
- [44] Vandercappellen J, Van Damme J and Struyf S (2008) The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett.*, 267: 226–44.
- [45] Spoo AC, Lübbert M, Wierda WG and Burger JA (2007) CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 109: 786–91.
- [46] Amara S, Chaar I, Khiari M, Ounissi D, et al. (2015) Stromal cell derived factor-1 and CXCR4 expression in colorectal cancer promote liver metastasis. *Cancer Biomark.*, 15: 869–79.
- [47] Zhang Z, Ni C, Chen W, Wu P, et al. (2014) Expression of CXCR4 and

- breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*, 14: 49.
- [48] Li Y-J, Dai Y-L, Zhang W-B, Li S-J and Tu C-Q (2015) Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma: a meta-analysis. *Clin. Exp. Med.*
- [49] Ahr B, Denizot M, Robert-Hebmann V, Brelot A and Biard-Piechaczyk M (2005) Identification of the cytoplasmic domains of CXCR4 involved in Jak2 and STAT3 phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 280: 6692–700.
- [50] Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, et al. (2003) Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *Int. J. Oncol.*, 22: 469–80.
- [51] Shen X, Artinyan A, Jackson D, Thomas RM, et al. (2010) Chemokine receptor CXCR4 enhances proliferation in pancreatic cancer cells through AKT and ERK dependent pathways. *Pancreas*, 39: 81–7.
- [52] Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzec J, et al. (2005) Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*, 23: 879–94.
- [53] Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, et al. (1996) The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 382: 829–833.
- [54] Yu L, Cecil J, Peng S-B, Schrementi J, et al. (2006) Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 374: 174–179.
- [55] Müller a, Homey B, Soto H, Ge N, et al. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410: 50–56.
- [56] Jujo K, li M, Sekiguchi H, Klyachko E, et al. (2013) CXC-chemokine receptor 4 antagonist AMD3100 promotes cardiac functional recovery after ischemia/reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Circulation*, 127: 63–73.
- [57] Burns JM (2006) A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J. Exp. Med.*, 203: 2201–2213.
- [58] Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, et al. (1996) Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382: 635–638.
- [59] Teicher B a. and Fricker SP (2010) CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.*, 16: 2927–2931.
- [60] Fricker SP (2013) Physiology and pharmacology of plerixafor. *Transfus. Med. Hemotherapy*, 40: 237–245.
- [61] Burger JA (2006) CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 107: 1761–1767.
- [62] Roberts AW (2005) G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*, 23: 33–41.
- [63] McKinstry WJ, Li CL, Rasko JE, Nicola NA, et al. (1997) Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 89: 65–71.
- [64] Hunter MG and Avalos BR (1998) Phosphatidylinositol 3'-kinase and

- SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) are recruited by distinct positive and negative growth-regulatory domains in the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J. Immunol.*, 160: 4979–87.
- [65] Ward AC, Hermans MH, Smith L, van Aesch YM, et al. (1999) Tyrosine-dependent and -independent mechanisms of STAT3 activation by the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor are differentially utilized depending on G-CSF concentration. *Blood*, 93: 113–24.
- [66] Morstyn G, Souza LM, Keech J, Sheridan W, et al. (1988) Effect of Granulocyte Colony Stimulating Factor on Neutropenia Induced By Cytotoxic Chemotherapy. *Lancet*, 331: 667–672.
- [67] Trillet-Lenoir V, Green J, Manegold C, Von Pawel J, et al. (1993) Recombinant granulocyte colony stimulating factor reduces the infectious complications of cytotoxic chemotherapy. *Eur. J. Cancer*, 29: 319–324.
- [68] Grigg a P, Roberts a W, Raunow H, Houghton S, et al. (1995) Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood*, 86: 4437–4445.
- [69] Bendall LJ and Bradstock KF (2014) G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 25: 355–67.
- [70] Sheridan WP, Fox RM, Begley CG, Maher D, et al. (1992) Effect of peripheral-blood progenitor cells mobilised by filgrastim (G-CSF) on platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Lancet*, 339: 640–644.
- [71] DiPersio JF, Micallef IN, Stiff PJ, Bolwell BJ, et al. (2009) Phase III prospective randomized double-blind placebo-controlled trial of plerixafor plus granulocyte colony-stimulating factor compared with placebo plus granulocyte colony-stimulating factor for autologous stem-cell mobilization and transplantation for . *J. Clin. Oncol.*, 27: 4767–73.
- [72] DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, Micallef INM, et al. (2009) Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood*, 113: 5720–6.
- [73] Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, et al. (2005) Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J. Exp. Med.*, 201: 1307–1318.
- [74] Hatse S, Princen K, Bridger G, De Clercq E and Schols D (2002) Chemokine receptor inhibition by AMD3100 is strictly confined to CXCR4. *FEBS Lett.*, 527: 255–62.
- [75] Fricker SP, Anastassov V, Cox J, Darkes MC, et al. (2006) Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochem. Pharmacol.*, 72: 588–96.
- [76] Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, et al. (2009) AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol. Pharmacol.*, 75: 1240–7.
- [77] Smith MCP, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, et al. (2004) CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer*

- Res., 64: 8604–12.
- [78] Xu C, Zhao H, Chen H and Yao Q (2015) CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Des. Devel. Ther.*, 9: 4953–64.
  - [79] Robinson DR, Wu YM and Lin SF (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19: 5548–5557.
  - [80] Hunter T (2014) The Genesis of Tyrosine Phosphorylation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 6: a020644.
  - [81] Lemmon M and Schlessinger J (2011) NIH Public Access. *Biochemistry*, 141: 1117–1134.
  - [82] Ullrich A and Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61: 203–212.
  - [83] Hubbard SR (1999) Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 71: 343–58.
  - [84] Haglund K, Rusten TE and Stenmark H (2007) Aberrant receptor signaling and trafficking as mechanisms in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncog.*, 13: 39–74.
  - [85] Nagano A, Ohno T, Shimizu K, Hara A, et al. (2010) EWS/Fli-1 chimeric fusion gene upregulates vascular endothelial growth factor-A. *Int. J. Cancer*, 126: NA-NA.
  - [86] Olmos D, Martins AS, Jones RL, Alam S, et al. (2011) Targeting the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor in Ewing's Sarcoma: Reality and Expectations. *Sarcoma*, 2011: 1–13.
  - [87] Potratz J, Tillmanns A, Berning P, Korsching E, et al. (2015) Receptor tyrosine kinase gene expression profiles of Ewing sarcomas reveal ROR1 as a potential therapeutic target in metastatic disease. *Mol. Oncol.*, 10: 677–692.
  - [88] Agelopoulos K, Richter GHS, Schmidt E, Dirksen U, et al. (2015) Deep sequencing in conjunction with expression and functional analyses reveals activation of FGFR1 in Ewing sarcoma. *Clin. Cancer Res.*, 21: 4935–4946.
  - [89] Savage DG and Antman KH (2002) Imatinib Mesylate — A New Oral Targeted Therapy. *N. Engl. J. Med.*, 346: 683–693.
  - [90] Sekyi-Otu A, Bell RS, Ohashi C, Pollak M and Andrulis IL (1995) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptors, IGF-1, and IGF-2 are expressed in primary human sarcomas. *Cancer Res.*, 55: 129–34.
  - [91] Olmos D, Tan DSW, Jones RL and Judson IR (2010) Biological Rationale and Current Clinical Experience With Anti-Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor Monoclonal Antibodies in Treating Sarcoma. *Cancer J.*, 16: 183–194.
  - [92] Benini S, Manara MC, Cerisano V, Perdichizzi S, et al. (2004) Contribution of MEK/MAPK and PI3-K signaling pathway to the malignant behavior of Ewing's sarcoma cells: therapeutic prospects. *Int. J. Cancer*, 108: 358–66.
  - [93] Kim SY, Toretsky J a, Scher D and Helman LJ (2009) The role of IGF-1R in pediatric malignancies. *Oncologist*, 14: 83–91.
  - [94] Scotlandi K, Avnet S, Benini S, Manara MC, et al. (2002) Expression of an IGF-I receptor dominant negative mutant induces apoptosis, inhibits

- tumorigenesis and enhances chemosensitivity in Ewing's sarcoma cells. *Int. J. Cancer*, 101: 11–6.
- [95] Scotlandi K, Benini S, Nanni P, Lollini PL, et al. (1998) Blockage of insulin-like growth factor-I receptor inhibits the growth of Ewing's sarcoma in athymic mice. *Cancer Res.*, 58: 4127–31.
- [96] Tap WD, Demetri G, Barnette P, Desai J, et al. (2012) Phase II study of ganitumab, a fully human anti-type-1 insulin-like growth factor receptor antibody, in patients with metastatic Ewing family tumors or desmoplastic small round cell tumors. *J. Clin. Oncol.*, 30: 1849–56.
- [97] Pappo AS, Patel SR, Crowley J, Reinke DK, et al. (2011) R1507, a Monoclonal Antibody to the Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor, in Patients With Recurrent or Refractory Ewing Sarcoma Family of Tumors: Results of a Phase II Sarcoma Alliance for Research Through Collaboration Study. *J. Clin. Oncol.*, 29: 4541–4547.
- [98] Juergens H, Daw NC, Geoerger B, Ferrari S, et al. (2011) Preliminary efficacy of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody figitumumab in patients with refractory Ewing sarcoma. *J. Clin. Oncol.*, 29: 4534–40.
- [99] Garofalo C, Manara MC, Nicoletti G, Marino MT, et al. (2011) Efficacy of and resistance to anti-IGF-1R therapies in Ewing's sarcoma is dependent on insulin receptor signaling. *Oncogene*, 30: 2730–40.
- [100] Potratz JC, Saunders DN, Wai DH, Ng TL, et al. (2010) Synthetic lethality screens reveal RPS6 and MST1R as modifiers of insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor activity in childhood sarcomas. *Cancer Res.*, 70: 8770–8781.
- [101] Apperley JF (2007) Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet. Oncol.*, 8: 1018–29.
- [102] Jänne P a, Gray N and Settleman J (2009) Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8: 709–723.
- [103] Kane RC, Farrell AT, Saber H, Tang S, et al. (2006) Sorafenib for the Treatment of Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 12: 7271–7278.
- [104] Kane RC, Farrell AT, Madabushi R, Booth B, et al. (2009) Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *Oncologist*, 14: 95–100.
- [105] Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, et al. (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol. Cancer Ther.*, 7: 3129–40.
- [106] Fernández-Medarde A and Santos E (2011) Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*, 2: 344–58.
- [107] Ahmed AA, Sherman AK and Pawel BR (2012) Expression of therapeutic targets in Ewing sarcoma family tumors. *Hum. Pathol.*, 43: 1077–83.
- [108] Murphy DA, Makonnen S, Lassoued W, Feldman MD, et al. (2006) Inhibition of tumor endothelial ERK activation, angiogenesis, and tumor growth by sorafenib (BAY43-9006). *Am. J. Pathol.*, 169: 1875–85.
- [109] DuBois SG, Marina N and Glade-Bender J (2010) Angiogenesis and

- vascular targeting in Ewing sarcoma: a review of preclinical and clinical data. *Cancer*, 116: 749–57.
- [110] Montero JC, Seoane S, Ocaña A and Pandiella A (2011) Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 17: 5546–52.
- [111] Irby RB and Yeatman TJ (2000) Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*, 19: 5636–42.
- [112] Shor AC, Keschman EA, Lee FY, Muro-Cacho C, et al. (2007) Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival. *Cancer Res.*, 67: 2800–8.
- [113] Alvarez RH, Kantarjian HM and Cortes JE (2006) The role of Src in solid and hematologic malignancies: development of new-generation Src inhibitors. *Cancer*, 107: 1918–29.
- [114] Yamaguchi T, Lu C, Ida L, Yanagisawa K, et al. (2015) ROR1 sustains caveolae and survival signalling as a scaffold of cavin-1 and caveolin-1. *Nat. Commun.*, 7: 1–13.
- [115] Smith R, Owen LA, Trem DJ, Wong JS, et al. (2006) Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell*, 9: 405–16.
- [116] Carlisle AJ, Lyttle C a, Carlisle RY and Maris JM (2009) CXCR4 expression heterogeneity in neuroblastoma cells due to ligand-independent regulation. *Mol. Cancer*, 8: 126.
- [117] Heckmann D, Maier P, Laufs S, Li L, et al. (2014) The disparate twins: A comparative study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1 $\alpha$ -induced gene expression, invasion and chemosensitivity of colon cancer. *Clin. Cancer Res.*, 20: 604–616.
- [118] Dave H, Anver MR, Butcher DO, Brown P, et al. (2012) Restricted cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia suggests targetability with therapeutic monoclonal antibodies. *PLoS One*, 7: e52655.
- [119] Hojjat-Farsangi M, Khan AS, Daneshmanesh AH, Moshfegh A, et al. (2013) The tyrosine kinase receptor ROR1 is constitutively phosphorylated in chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *PLoS One*, 8: e78339.
- [120] Baskar S, Kwong KY, Hofer T, Levy JM, et al. (2008) Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 14: 396–404.
- [121] Zhang S, Chen L, Wang-Rodriguez J, Zhang L, et al. (2012) The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers. *Am. J. Pathol.*, 181: 1903–1910.
- [122] Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, et al. (2008) A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.*, 26: 127–132.
- [123] Kortesisidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, et al. (2005) Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood*, 105: 3793–801.
- [124] Gatti M, Pattarozzi A, Bajetto A, Würth R, et al. (2013) Inhibition of

- CXCL12/CXCR4 autocrine/paracrine loop reduces viability of human glioblastoma stem-like cells affecting self-renewal activity. *Toxicology*, 314: 209–220.
- [125] Kim H-Y, Hwang J-Y, Kim S-W, Lee H-J, et al. (2010) The CXCR4 Antagonist AMD3100 Has Dual Effects on Survival and Proliferation of Myeloma Cells In Vitro. *Cancer Res. Treat.*, 42: 225–34.
- [126] Toker A (2000) Akt/Protein Kinase B Is Regulated by Autophosphorylation at the Hypothetical PDK-2 Site. *J. Biol. Chem.*, 275: 8271–8274.
- [127] Chandhanayingyong C, Kim Y, Staples JR, Hahn C and Lee FY (2012) MAPK/ERK Signaling in Osteosarcomas, Ewing Sarcomas and Chondrosarcomas: Therapeutic Implications and Future Directions. *Sarcoma*, 2012: 404810.
- [128] Ahmed AA, Abedalthagafi M, Anwar AE and Bui MM (2015) Akt and Hippo Pathways in Ewing's Sarcoma Tumors and Their Prognostic Significance. *J. Cancer*, 6: 1005–10.
- [129] Humtsoe JO and Kramer RH (2010) Differential epidermal growth factor receptor signaling regulates anchorage-independent growth by modulation of the PI3K/AKT pathway. *Oncogene*, 29: 1214–26.
- [130] Zhang H, Bajraszewski N, Wu E, Wang H, et al. (2007) PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J. Clin. Invest.*, 117: 730–8.
- [131] Andersson MK and Aman P (2008) Proliferation of Ewing sarcoma cell lines is suppressed by the receptor tyrosine kinase inhibitors gefitinib and vandetanib. *Cancer Cell Int.*, 8: 1.
- [132] Schaefer K-L, Brachwitz K, Braun Y, Diallo R, et al. (2006) Constitutive activation of neuregulin/ERBB3 signaling pathway in clear cell sarcoma of soft tissue. *Neoplasia*, 8: 613–22.
- [133] Pasquale EB, Aasheim HC, Munthe E, Funderud S, et al. (2008) Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*, 133: 38–52.
- [134] Uren A, Merchant MS, Sun CJ, Vitolo MI, et al. (2003) Beta-platelet-derived growth factor receptor mediates motility and growth of Ewing's sarcoma cells. *Oncogene*, 22: 2334–42.
- [135] Wang Y, Mandal D, Wang S, Kleinerman ES, et al. (2010) Platelet-derived growth factor receptor beta inhibition increases tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sensitivity: imatinib and TRAIL dual therapy. *Cancer*, 116: 3892–902.
- [136] Bozzi F, Tamborini E, Negri T, Pastore E, et al. (2007) Evidence for activation of KIT, PDGFRalpha, and PDGFRbeta receptors in the Ewing sarcoma family of tumors. *Cancer*, 109: 1638–45.
- [137] Timeus F, Crescenzo N, Fandi A, Doria A, et al. (2008) In vitro antiproliferative and antimigratory activity of dasatinib in neuroblastoma and Ewing sarcoma cell lines. *Oncol. Rep.*, 19: 353–9.
- [138] Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, Corbin AS, et al. (2006) Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res.*, 66: 473–481.
- [139] Maki RG, D'Adamo DR, Keohan ML, Saulle M, et al. (2009) Phase II

- study of sorafenib in patients with metastatic or recurrent sarcomas. *J. Clin. Oncol.*, 27: 3133–40.
- [140] Strumberg D, Clark JW, Awada A, Moore MJ, et al. (2007) Safety, pharmacokinetics, and preliminary antitumor activity of sorafenib: a review of four phase I trials in patients with advanced refractory solid tumors. *Oncologist*, 12: 426–37.

## **6. Danksagung**

Ich danke Frau Prof. Dr. Uta Dirksen herzlich für die Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe und die Überlassung des interessanten Themas, sowie die fachliche Beratung, zahlreichen Anregungen und Motivation.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Jenny Potratz für die freundliche und engagierte Betreuung und die vielen fachlichen Anregungen.

Ganz besonders danke ich auch Christiane Schäfer, Dagmar Clemens und Carolin Schleithoff für die vielen Ratschläge und die Unterstützung im Labor.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern und meiner Schwester für die uneingeschränkte Unterstützung und Motivation.

## **7. Lebenslauf**

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

## 8. Eigene Publikationen

Jenny Potratz, Amelie Tillmanns, **Philipp Berning**, Eberhard Korsching, Christiane Schaefer, Birgit Lechtape, Carolin Schleithoff, Rebekka Unland, Karl-Ludwig Schäfer, Carsten Müller-Tidow, Heribert Jürgens, Uta Dirksen. Receptor tyrosine kinase gene expression profiles of Ewing sarcomas reveal ROR1 as a potential therapeutic target in metastatic disease. *Mol. Oncol.*, pp. 1–16, 2015.

**Berning P.**, Tillmanns A., Korsching E., Lechtape B., Schaefer C., Schleithoff C., Schäfer K.-L., Dirksen U., Potratz J. Genexpressions-Analysen von Rezeptor Tyrosin Kinasen identifizieren ROR1 als potentielle therapeutische Zielstruktur in metastasierten Ewing Sarkomen. *Poster*, DGHO Jahrestagung Basel 2015.

Schaefer C., **Berning P.**, Mallela N., Seggewiß J., Schleithoff C., Korsching E., Dirksen U., Potratz, J. Gepooltes lentivirales shRNA Screening Verfahren zur Identifizierung EWS-FLI1 spezifischer therapeutischer Zielstrukturen in Ewing Sarkomen. *Poster*, DGHO Jahrestagung Basel 2015.

## 9. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
/	Pro
<	kleiner als
>	größer als
=	gleich
+/-	plus/minus
x	mal
AMD3100	Synonym zu Plerixafor
AKT	Proteinkinasen B
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AXL	AXL Rezeptor Tyrosinkinase
BCR-ABL	Fusionsgen aus dem ABL-Gen Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1) und dem BCR-Gen (breakpoint cluster region)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CLL	Chronisches lymphatische Leukämie
CT	Computertomographie
Ctrl	Kontrolle
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR1, DDR 2	Discoidin Domain Rezeptor Tyrosinkinase 1, 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimehtylsulfoxid
d.h.	Das heißt
EGF R	Epidermal growth factor receptor
EPH	Erythropoietin-producing human hepatocellular receptors, Ephrinrezeptor
Erb B3	V-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3
Et al.	Et alii
ETS	ETS Transkriptionsfaktor
EWS-ERG	Fusionsprotein aus EWS-Protein und ETS- Trankriptionsfaktor ERG
EWS-FLI1	Fusionsprotein aus EWS-Protein und ETS- Trankriptionsfaktor FLI1
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales bovines Serum
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
IGF-1	Insuline-like growth factor
IGF-1R	Insuline-like growth factor receptor

IGFBP3	Insuline-like growth factor binding protein 3
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilo Dalton
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mg	Milligramm
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mechanistic target of Rapamycin
n	Anzahl
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
NP40	Octoxinol 9
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF Ra	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
PDGF Rb	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PE-Cy7	Phycoerythrin-
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Ras	Rat sarcoma Kinase
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
ROR1	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
rpm	rotations per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
S6-RP	S6-ribosomales Protein
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline + Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trk A/B/C	Tropomyosin receptor kinase A/BC
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
vs	versus
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
WST-1	Water soluble tetrazolium
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Therapiealgorithmus nach dem EWING 2008 Studienprotokoll .....	5
Abbildung 2 Darstellung des Signalwegs der CXCL12-CXCR4-Achse.....	10
Abbildung 3 Plerixafor aktiviert das Zellwachstum von Ewing Sarkom Zellen ..	33
Abbildung 4 DMSO Lösungsmittelkontrolle beeinflusst das Zellwachstum nicht .....	34
Abbildung 5 Zellwachstum in A673 und TC71 Ewing Sarkom Zellen unbeeinflusst von CXCL12.....	35
Abbildung 6 Zellwachstum von Ewing Sarkom Zelllinien bleibt unbeeinflusst von Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) .....	36
Abbildung 7 CXCR4 Proteinexpression im Zelllysat .....	38
Abbildung 8 Expression von CXCR4 an der Zelloberfläche .....	39
Abbildung 9 CXCR4 Oberflächenexpression bei Kultivierung in serum-haltigen und serum-freien Medium .....	40
Abbildung 10 CXCR4 Oberflächenexpression von TC32 nach Behandlung mit Plerixafor und CXCL12 .....	42
Abbildung 11 CXCR4 Proteinexpression nach Behandlung mit Plerixafor .....	42
Abbildung 12 Woundhealing Assay Behandlung von A673 mit Plerixafor .....	44
Abbildung 13 Migration von A673 und TC32 abhängig von einer Behandlung mit CXCL12 (SDF-1a) oder Plerixafor im Transwell-Chamber-Assay .....	45
Abbildung 14 Einfluss des CXCR4 Inhibitors Plerixafor auf die Aktivierung von Signalkaskadenproteinen in Ewing Sarkom Zelllinien.....	46
Abbildung 15 Phosphorylierungsstatus von 49 RTKs in TC32 und A673 Zellen nach Behandlung mit Plerixafor .....	49
Abbildung 16 Auswertung der RTK Aktivität nach Behandlung mit Plerixafor im phospho-RTK Array .....	50
Abbildung 17 Übersicht der RTK mit signifikant veränderter Phosphorylierung durch Plerixafor .....	51
Abbildung 18 ROR1 Gesamt-Proteinexpression in Ewing Sarkom Zelllinien....	53
Abbildung 19 ROR1 Proteinexpression an der Zelloberfläche .....	54
Abbildung 20 Dasatinib und Sorafenib inhibieren das Zellwachstum von Ewing Sarkom Zelllinien.....	56
Abbildung 21 Zellbehandlung von A673 und TC32 mit der Kombination von Plerixafor und des TKI Dasatinib.....	58
Abbildung 22 Zusammenfassung des Effekts von Plerixafor auf Ewing Sarkom Zelllinien .....	68

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammensetzung des Polyacrylamidgels zur SDS-PAGE.....	27
Tabelle 2 Übersicht über die CXCR4 Oberflächenexpression von Ewing Sarkom Zelllinien .....	39
Tabelle 3 Übersicht über die ROR1 Oberflächenexpression von Ewing Sarkom Zelllinien .....	54
Tabelle 4 IC <sub>50</sub> (µM)-Werte von Dasatinib und Sorafenib .....	56