

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

Expression und Funktion der CXCR4/CXCR7/CXCL12-
Achse in Schilddrüsenkarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christina Maria Forster
2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Verena Keitel-Anselmino

Dr. med. Thomas Artur Werner gewidmet.

„Der Tod ist gewissermaßen eine Unmöglichkeit, die plötzlich zur Wirklichkeit wird.“
(Johann Wolfgang von Goethe)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Werner, T. A., Forster, C. M., *et al.* (2017), CXCR4/CXCR7/CXCL12 axis promotes an invasive phenotype in medullary thyroid carcinoma. *British Journal of Cancer*, (117) p. 1837-1845. doi: 10.1038/bjc.2017.364

Werner, T. A., Forster, C. M., *et al.* (2018), CXCR4/CXCR7/CXCL12-Axis in Follicular Thyroid Carcinoma. *Journal of Cancer*, (9) p. 929-940. doi: 10.7150/jca.23042

Zusammenfassung

Patienten mit metastasiertem Schilddrüsenkarzinom weisen durch limitierte Therapieoptionen und eingeschränktes Ansprechen auf aktuelle Chemotherapeutika auch heute noch ein schlechtes *Outcome* auf. Für diese Kohorte ist eine Identifikation neuer Biomarker zur ansatzorientierten medikamentösen Behandlung unerlässlich. Ein solcher Marker wäre zum Beispiel die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse, die in den letzten Jahren in der Tumorforschung zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Daher untersucht die vorliegende Arbeit die Expression der CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) in Schilddrüsenkarzinomen und deren biologische und prognostische Bedeutung im Metastasierungsprozess. Ferner wurde evaluiert, ob durch Inhibition bzw. Stimulation der Rezeptoren Veränderungen der Zellzyklusaktivität und der Zellmigration *in vitro* erfolgen. Für die Expressionsanalyse wurden zunächst *Tissue Microarrays* mit Gewebeproben von 86 medullären und 44 follikulären Schilddrüsenkarzinomen sowie korrespondierendem Normalgewebe und Metastasen, falls verfügbar, immunhistochemisch für CXCR4 und CXCR7 gefärbt. Die Expressionslevel wurden anhand des Immunreaktiven *Scores* nach Remmele quantifiziert, mit klinisch-pathologischen Variablen korreliert und anschließend mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben verglichen. Nach dem strukturellen Nachweis der Rezeptoren mittels *Western Blot* und Immunzytochemie wurden in Zellkulturversuchen zur Untersuchung der funktionellen Auswirkung verschiedene Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien mit dem aktivierenden Liganden CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12) und den CXCR4-Antagonisten AMD3100 und WZ811 behandelt. Unterschiede der Tumorzellinvasion wurden mit Hilfe von *Matrigel Invasion Chambers* untersucht, während Modifikationen der Zellzyklusaktivität mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurden. Abschließend wurde die Veränderung der mRNA-Expression spezifischer Gene der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) durch qPCR überprüft. Es zeigte sich eine im Gegensatz zum Normalgewebe verstärkte Expression der Rezeptoren in den Primärtumoren sowie eine zunehmende Expression in den Metastasen. Im follikulären Schilddrüsenkarzinom war eine hohe CXCR4- und CXCR7-Expression mit größeren Tumoren und fortgeschrittenem UICC-Stadium assoziiert. Beim medullären Schilddrüsenkarzinom zeigte eine hohe CXCR4-Expression eine signifikante Assoziation mit größeren Tumoren und metastatischem Phänotyp. Beide Tumorarten wiesen bei hoher CXCR4-Expression ein verkürztes Gesamt- sowie Rezidiv-freies Überleben der Patienten auf. *In vitro* reduzierten CXCR4-Antagonisten signifikant die Zellinvasivität, während sich nach Stimulation mit CXCL12 eine signifikante Zunahme des invasiven Wachstums und Zellzyklusaktivierung darstellt. Zudem führte die Stimulation der Zellen mit CXCL12 zu einer signifikanten Zunahme der Expression EMT-spezifischer Gene wie BST2, FGF9 und Vimentin, während es zur typischen Abnahme des Adhäsionsproteins E-Cadherin kam. Zusammenfassend erbringt diese Arbeit den Nachweis der biologischen und prognostischen Bedeutung der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Schilddrüsenkarzinomen und deren Metastasierungsprozess. Die Ergebnisse unterstreichen das Potenzial der Achse als neue Zielstruktur medikamentöser Therapieansätze und bieten weitere Einsicht in die molekularen Mechanismen metastasierender Schilddrüsenkarzinome.

Abstract

Patients with metastasized thyroid carcinoma continue to demonstrate poor outcome due to limited therapeutic options and restricted response to current chemotherapeutics. For this cohort of patients, the identification of new biological markers is essential for a novel adjuvant therapeutic regime. Such a marker could be, for example, the CXCR4/CXCR7/CXCL12-axis, which gained importance in tumour research over the last few years. Hence, the aim of this study was to investigate the expression of C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) and 7 (CXCR7) in thyroid carcinomas and their biological and prognostic relevance in metastatic process. Furthermore, the changes in cell cycle activity and cell migration after inhibition or stimulation of these receptors were evaluated *in vitro*. For expression analysis, Tissue Microarrays with samples from 86 medullary and 44 follicular thyroid carcinomas as well as corresponding normal tissues and metastases, if available, were immunohistochemically stained for CXCR4 and CXCR7. Expression levels have been quantified by the *Immunoreactivity Score* according to Remmele and correlated with clinicopathological variables. Subsequently, they were compared with overall- and recurrence-free survival. After the structural demonstration of the receptors via western blot and immunocytochemistry, various thyroid carcinoma cell lines have been treated in cell culture experiments with the activating ligand C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) and the CXCR4-antagonists AMD3100 and WZ811 to investigate their functional effects. Differences in tumour cell invasion were explored with the aid of *Matrigel Invasion Chambers*, whereas modifications of cell cycle activity were determined via flow cytometry. Finally, alterations of mRNA expression of specific genes associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) were examined by qPCR. In contrast to normal tissues, increased expression levels of the receptors could be demonstrated in primary tumours as well as in the metastases. In follicular thyroid carcinoma, a high CXCR4- and CXCR7-expression was associated with an increased tumour size and advanced UICC stage. In medullary thyroid carcinoma, a high CXCR4-expression demonstrated a significant correlation with bigger tumours and metastatic phenotype. Both tumour entities showed at high CXCR4 expression a reduced overall- as well as recurrence-free survival of the patients. *In vitro*, CXCR4-antagonists significantly reduced cell invasiveness whereas stimulation with CXCL12 significantly increased invasive growth and cell cycle activation. Moreover, the stimulation of the cells with CXCL12 induced a significant increase of EMT-specific genes like BST2, FGF9 and Vimentin while it came to the typical decrease of the focal adhesion protein E-Cadherin. In summary, this study provides first evidence of the biologic and prognostic relevance of the CXCR4/CXCR7/CXCL12-axis in thyroid carcinoma and their metastatic process. The results underline the potential of this axis as a target structure for novel therapeutic approaches and offer new insights in the molecular mechanism of metastatic thyroid carcinoma.

Abkürzungsverzeichnis

AIC	<i>Akaike information criterion</i>
AKT	Proteinkinase B
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
ATC	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
ATCC	<i>American Type Culture Company</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BST2	<i>Bone marrow stromal cell antigen 2</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CI	Konfidenzintervall
CLS	<i>Cell Lines Service</i>
cm²	Quadratzentimeter
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Cycle of threshold</i>
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCR7	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FGF9	<i>Fibroblast growth factor 9</i>
FM	Fernmetastase
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
FTC	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
g	Gramm

g	Relative Zentrifugalbeschleunigung [m/s ²]
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HIF-1α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HR	<i>Hazard ratio</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICC	Immunzytochemie
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver <i>Score</i>
kDa	Kilodalton
LA	Lymphadenektomie
LKD	Lymphknotendissektion
LKM	Lymphknotenmetastase
M	Molar
m	Meter
MEN 2A	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2A
MEN 2B	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2B
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm²	Quadratmillimeter
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MTC	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
MW	Mittelwert
n	Stichprobengröße
NaCl	Natriumchlorid
ND	<i>Neck dissection</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NG	Normalgewebe
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar

nm	Nanometer
<i>p</i>	<i>Probability</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PerCP-A	<i>Peridinin-chlorophyll-protein A Complex</i>
PET	Polyethylenterephthalat
pg	Picogramm
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTC	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAI	Radioaktives Jod
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
REMARK	<i>REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies</i>
rh-SDF1α	<i>Recombinant human stromal cell-derived factor 1α</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDF1α	<i>Stromal cell-derived factor 1α</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNAI1	<i>Snail family transcriptional repressor 1</i>
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i>
STR	<i>Short-Tandem-Repeat</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline + Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
Twist	<i>Twist homolog 1</i>

UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
V	Volt [W/A]
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vs.	<i>versus</i>
y	Jahr
Δ	<i>Delta</i>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Humane Schilddrüsenkarzinome	1
1.1.1 Überblick	1
1.1.2 Differenzierte Schilddrüsenkarzinome	4
1.1.2.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom	4
1.1.2.2 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	5
1.1.2.3 Medulläres Schilddrüsenkarzinom	6
1.1.3 Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom	7
1.2 Die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse	8
1.2.1 Überblick	8
1.2.1.1 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 und 7	9
1.2.1.2 CXC-Motiv-Chemokin 12	10
1.2.2 Bedeutung im Metastasierungsprozess	11
1.2.3 Die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse als therapeutisches Ziel	14
1.3 Ziele der Arbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Laborgeräte	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Chemikalien	18
2.1.4 Molekularbiologische Kits	20
2.1.5 Puffer und Lösungen	21
2.1.6 Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	22
2.1.7 Hybridierungssonden	22

2.1.8 Antikörper.....	23
2.1.8.1 Primärantikörper.....	23
2.1.8.2 Sekundärantikörper.....	23
2.1.8.3 Antikörper zur Isotyp-Kontrolle.....	23
2.1.9 <i>Software</i>	24
2.1.9.1 Datenerhebung.....	24
2.1.9.2 Statistische Auswertung und graphische Darstellung.....	24
2.1.10 Zelllinien.....	24
2.1.11 Gewebeproben.....	25
2.1.12 Patientenauswahl und klinisch-pathologisches Datenmaterial.....	25
2.1.13 Ethikvotum und gute klinische Praxis.....	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Zellkultivierung.....	27
2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	27
2.2.3 Behandlung der Zellen.....	28
2.2.4 <i>Invasionsassay</i>	29
2.2.5 Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalyse.....	30
2.2.6 RNA-Isolation.....	32
2.2.7 cDNA-Synthese.....	33
2.2.8 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	34
2.2.9 Proteinisolation und Proteinmengenbestimmung.....	36
2.2.10 <i>Western Blot</i>	37
2.2.11 <i>Tissue Microarray</i> und Immunhistochemie.....	40
2.2.12 Immunzytochemie.....	43
2.2.13 Statistische Analyse.....	45
3 Ergebnisse.....	46
3.1 CXCR4 und CXCR7 in Schilddrüsenkarzinomen.....	46
3.1.1 CXCR4 und CXCR7 im follikulären Schilddrüsenkarzinom.....	46

3.1.1.1 Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	48
3.1.1.2 Assoziation mit klinisch-pathologischen Variablen	49
3.1.1.3 Assoziation mit dem Gesamtüberleben	52
3.1.2 CXCR4 und CXCR7 im medullären Schilddrüsenkarzinom	56
3.1.2.1 Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	58
3.1.2.2 Assoziation mit klinisch-pathologischen Variablen	59
3.1.2.3 Assoziation mit dem Gesamtüberleben	63
3.2 Struktureller Nachweis von CXCR4 und CXCR7 in Schilddrüsenkarzinom- Zelllinien.....	66
3.2.1 Proteinexpression	66
3.2.2 Rezeptorvisualisierung	66
3.3 Funktionelle Auswirkung der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Schilddrüsen- karzinomen <i>in vitro</i>	69
3.3.1 Veränderungen der Zellinvasivität	69
3.3.2 Zellzyklusveränderungen.....	71
3.3.3 Wirkung von CXCL12 auf die Expression EMT-spezifischer Gene	73
4 Diskussion.....	75
4.1 Die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Schilddrüsenkarzinomen.....	76
4.1.1 Assoziation der Expressionsstärke mit klinisch-pathologischen Variablen.....	76
4.1.2 Bedeutung für das Patienten- <i>Outcome</i>	78
4.2 Effekt der Rezeptor-Modulatoren auf die Tumorprogression	80
4.2.1 Einfluss auf Zellinvasivität und Zellzyklusaktivierung.....	80
4.2.2 CXCL12-induzierte epithelial-mesenchymale Transition.....	82
4.3 Rezeptor-Inhibitoren als Ansatzpunkte einer zielgerichteten Therapie.....	84
4.4 Schlussfolgerung.....	87
5 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	88
6 Abbildungsverzeichnis	102
7 Tabellenverzeichnis	104

1 Einleitung

1.1 Humane Schilddrüsenkarzinome

1.1.1 Überblick

Unter den humanen Malignomen macht das Schilddrüsenkarzinom mit circa 6100 Neuerkrankungen pro Jahr 1,3 % aller bösartigen Karzinomerkrankungen in Deutschland aus. Nach Schätzungen des Robert Koch-Instituts sind im Jahre 2014 Frauen mit insgesamt 4280 Neuerkrankungen und einer Inzidenz von 10,4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner mehr als doppelt so häufig betroffen wie Männer. Die Erkrankungsrate der Männer ist mit 1840 aufgetretenen Fällen und einer Inzidenz von 4,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner deutlich geringer (siehe Abbildung 1). Das mittlere Erkrankungsalter der Frauen liegt im Median bei 51 Jahren, während Männer durchschnittlich mit 55 Jahren erkranken. Insgesamt ist die Inzidenz von malignen Schilddrüsenerkrankungen in den letzten zwanzig Jahren angestiegen, was sich am ehesten mit verbesserten Untersuchungsmethoden und der Zunahme an bildgebender Diagnostik begründen lässt, sodass Schilddrüsenmalignome meistens bereits in einem frühen Stadium (T1) entdeckt werden (63 % bei Frauen, 52 % bei Männern). Die Mortalität ist bei beiden Geschlechtern mit 0,9 Sterbefällen je 100.000 Personen gleich niedrig, mit einer insgesamt leicht fallenden Tendenz über die Jahre hinweg. Zu den Hauptdeterminanten der Prognose von Schilddrüsenkarzinomen gehört neben der histologischen Entität das Vorliegen von Fernmetastasen. Auch das Alter bei Erstdiagnose und die Jod-Speicherfähigkeit des Tumors bestimmen den Verlauf der Krankheit. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 94 % bei Frauen und 97 % bei Männern stehen die Heilungschancen im Allgemeinen gut, vor allem bei frühzeitig erkannten Malignomen. Eine Ausnahme bilden undifferenzierte, anaplastische Karzinome mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 10 % [1].

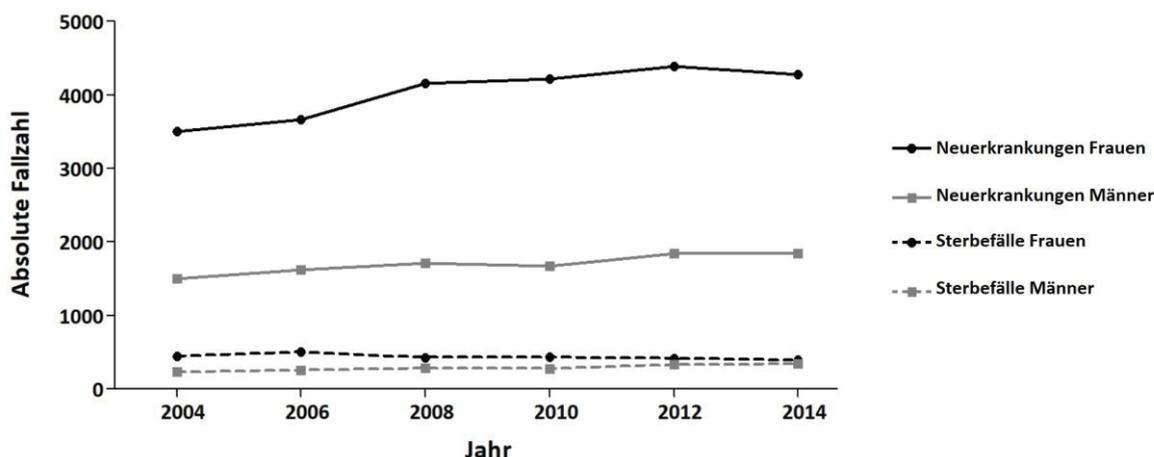


Abb. 1: Entwicklung der Neuerkrankungs- und Sterbefälle. Die Abbildung zeigt die absoluten Fallzahlen von neu aufgetretenen Schilddrüsenkarzinomen und assoziierten Sterbefällen in Deutschland von 2004 bis 2014, getrennt nach Geschlechtern. Die Daten entstammen dem Robert-Koch-Institut [1].

Schilddrüsenkarzinome lassen sich anhand ihres histologischen Ursprungsgewebes in verschiedene Entitäten einordnen. In den meisten Fällen geht das Malignom von den Hormon-produzierenden Follikelzellen der Schilddrüse aus. Über 90 % weisen eine Differenzierung auf und lassen sich in papilläre oder follikuläre Karzinome einteilen [2]. Kommt es zu einem Verlust der Differenzierung, was bei circa 5 % der Patienten der Fall ist, spricht man von einem anaplastischen Karzinom. Ebenfalls selten sind die Tumore der parafollikulären, Calcitonin-sezernierenden C-Zellen, auch medulläre Karzinome genannt. Sie zeigen histologisch eine Differenzierung und machen ungefähr 5 % der thyroidalen Malignome aus [3]. Es existieren zudem noch Mischformen, die Eigenschaften beider Zellreihen aufweisen können. Obwohl sich diese heterogene Gruppe in ihrer Biologie, den Therapieoptionen und der Prognose sehr unterscheidet, ist bei allen jedoch eine Invasivität und Metastasierung charakteristisch. Darüber hinaus können sich in der Schilddrüse noch andere Karzinomformen bilden, welche nicht vom Schilddrüsengewebe ausgehen, wie zum Beispiel maligne Lymphome, Sarkome oder Metastasen anderer Primärtumore. Diese sind jedoch äußerst selten und machen weit unter 1 % der Entartungen aus [4].

Die Ätiologie des Schilddrüsenkarzinoms wird von vielen unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Als gesicherte Risikofaktoren gelten ionisierende Strahlung, etwa iatrogen im Zuge einer Strahlentherapie, und Aufnahme von radioaktivem Jod, zum Beispiel durch radioaktiven Niederschlag (*Fallout*) nach Reaktorunfällen [5, 6]. Dabei ist bei Exposition im Kindes- und Jugendalter die Auftretenswahrscheinlichkeit eines Schilddrüsenkarzinoms im Langzeitverlauf besonders erhöht [7]. Des Weiteren gilt eine genetische Prädisposition,

vor allem im Rahmen des MEN-Syndroms, als erwiesener Risikofaktor [8]. Als weitere Faktoren für die Entstehung eines thyroidalen Karzinoms werden ein dysregulierter Jodhaushalt, Struma und weitere gutartigen Veränderungen der Schilddrüse sowie Übergewicht diskutiert [9-11].

Da das Schilddrüsenkarzinom im Anfangsstadium zumeist keine klinische Symptomatik zeigt, wird es häufig als Zufallsbefund entdeckt. Es verursacht erst im fortgeschrittenen Stadium durch lokal-destruierendes Wachstum Krankheitszeichen wie Druckgefühl im Halsbereich mit Hustenreiz, Heiserkeit bis hin zur Luftnot, Dysphagie, eine obere Einflusstauung oder das Horner-Syndrom [12, 13]. Beim medullären Karzinom kommt es durch exzessive Calcitonin-Sekretion häufig zu Durchfällen und einer *Flush*-Symptomatik [14].

Die körperliche Untersuchung ist in der Regel unauffällig. Erst im Verlauf zeigen sich neben vergrößerten, schmerzlosen zervikalen Lymphknoten oft tastbare, derbe Knoten in der Schilddrüse. Somit ist die Sonographie maßgeblich für eine frühzeitige Diagnose. Sie dient zur Detektion und ersten Beurteilung einer Raumforderung. Dabei gelten unregelmäßig begrenzte, echoarme Schilddrüsenherde mit einem Durchmesser größer 1 cm und intranodulärer Vaskularisation als suspekt [13]. Für eine weiterführende Befundung erfolgt nach Sonographie meist die Szintigraphie, bei der sich radioaktiv markierte Teilchen, welche dem Patienten injiziert wurden, in funktionell verschiedenen Arealen unterschiedlich stark anreichern und somit das Interpretieren der Stoffwechsellage ermöglichen. Typisch für das Schilddrüsenkarzinom ist der sogenannte „kalte Knoten“, der auf wenig aktives Schilddrüsengewebe durch verminderte Aufnahme des Radionuklids hindeutet. Zur Sicherung der Diagnose dient eine Feinnadelpunktion mit anschließender Aspirationszytologie. Beim Nachweis von suspekten Zellen ist schließlich die operative Resektion mit histopathologischer Untersuchung des Gewebes indiziert [4].

Die einzige kurative Therapieoption von Schilddrüsenkarzinomen besteht weiterhin in einer R0-Resektion durch eine totale Thyreoidektomie. Lediglich bei einem nicht-metastasierten, papillären Mikrokarzinom (≤ 10 mm) ist eine Hemithyreoidektomie ausreichend. Bei einem nachgewiesenen Lymphknotenbefall ist eine zervikale Kompartimentresektion erforderlich, um mögliche Metastasen noch zu entfernen und somit ein Fortschreiten der Krankheit zu verhindern [4]. Weitere Behandlungsmöglichkeiten richten sich nach der Jod-Aufnahme der Malignome. Circa einen Monat nach der operativen Tumorsektion erfolgt bei papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen

in der Regel eine ablative Radiojodtherapie mit hochdosiertem, radioaktivem ^{131}Jod (RAI) in mehreren Fraktionen [13]. Malignes, Jod-speicherndes Restgewebe kann somit durch Beta-Strahlung destruiert werden. Diese Methode ist jedoch nicht sinnvoll bei Tumorformen, die kein Jod speichern, wie etwa undifferenzierte oder medulläre Karzinome [15]. Ein Problem stellen auch Jod-refraktäre Malignome dar. Circa ein Drittel aller Patienten mit einem papillären oder follikulären Schilddrüsenkarzinom weisen einen mangelnden RAI-*Uptake* auf, während weiterhin ehemals RAI-positive Tumore im Verlauf der Therapie RAI-refraktär werden können. Somit verschlechtert sich der Therapieerfolg (*Outcome*) der Patienten signifikant [16]. Bei undifferenzierten und weit fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinomen, die nicht vollständig operativ reseziert werden konnten, besteht zudem die Option einer Strahlentherapie [4]. Hierbei ist zu beachten, dass medulläre C-Zell-Karzinome nicht strahlensensibel sind [13]. Des Weiteren stellt die Fernmetastasierung einen wesentlichen, prognostisch ungünstigen Faktor dar. Eine Chemotherapie kommt nur selten in Frage und wird zumeist im Rahmen eines palliativen Therapiekonzeptes bei inoperablen, metastasierten und radiojodrefraktären Tumoren durchgeführt [13]. Besonderes Augenmerk liegt aktuell auf einer medikamentösen Therapie, welche durch neue Erkenntnisse über die Karzinogenese und deren Signalwege eine Redifferenzierung der Tumorzellen anstrebt, wie zum Beispiel Modulatoren des Tyrosinkinasesweges und der Angiogenese [17, 18]. Aktuell sind vier Multikinase-Inhibitoren zur Therapie des Schilddrüsenkarzinoms zugelassen: Sorafenib und Lenvatinib für metastasierte, papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome sowie Vandetanib und Cabozantinib für das medulläre Schilddrüsenkarzinom [13, 19]. Die Langzeitergebnisse erwiesen sich allerdings weniger vielversprechend als erhofft, da keine der zugelassenen Substanzen ein verlängertes Gesamtüberleben oder gar eine Komplettremission erwirkte und es durch zahlreiche Nebenwirkungen zum Therapieabbruch seitens der Patienten gekommen ist [17, 20, 21]. Es erfordert also neue und effizientere Ansatzpunkte einer medikamentösen Behandlung.

1.1.2 Differenzierte Schilddrüsenkarzinome

1.1.2.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom

Mit einem Anteil von über 60 % ist das papilläre Karzinom (PTC) der häufigste Tumor der Schilddrüse [13]. Es tritt zumeist sporadisch auf und zeigt nur selten eine familiäre Häufung [22]. Der Erkrankungsgipfel liegt um das 25. und 50. Lebensjahr. Frauen

erkranken zudem häufiger als Männer [13]. Die Tumorentwicklung hat ihren Ursprung häufig in einer somatischen Mutation des BRAF-Gens [12, 23], welches für das B-Raf-Protein kodiert. Als Komponente des Ras/Raf-Signalweges steuert BRAF das Zellwachstum. Eine Mutation kann zur Überaktivität dieser Signalkaskade und damit zu unkontrolliertem Wachstum und Onkogenese führen [24]. Auch eine Mutation des *REarranged during Transfection* (RET)-Protoonkogens, welches auf Chromosom 10q11.2 lokalisiert ist, führt zur Tumorbildung [12, 23, 25]. Es kodiert für eine Rezeptor-Tyrosinkinase, welche Zelltod und -differenzierung sowie Migration und Zellzyklusprogression beeinflusst [26, 27]. Das PTC geht von den follikulären Thyreozyten aus und gehört zur Gruppe der differenzierten Schilddrüsenkarzinome. Es wächst langsam und beschränkt sich zunächst auf die Schilddrüse, wo ein multifokales Auftreten charakteristisch ist [28]. Die Metastasierung erfolgt hauptsächlich lymphogen. Die Lymphknotenmetastasen werden klinisch meistens früher apparent als ihr Primärtumor [10]. Der Tumor ist häufig durch eine Kapsel begrenzt, kann jedoch auch diffus wachsen. Er zeigt mikroskopisch papilläre Strukturen, was zu seiner Namensgebung geführt hat [22]. Die papillären Karzinomzellen produzieren in der Regel weiterhin Thyreoglobulin. Damit eignet sich das Protein gut zur Verlaufskontrolle nach einer Thyreoidektomie, da es nach Entfernung der Schilddrüse im Körper nicht mehr nachweisbar sein sollte und so gegebenenfalls auf ein Rezidiv oder eine Metastase aufmerksam macht [29]. Das papilläre Schilddrüsenkarzinom nimmt auch weiterhin am Jod-Stoffwechsel teil, speichert davon jedoch weniger als gesundes Gewebe, was szintigraphisch nachweisbar als „kalter“ Knoten imponiert. Durch die Jod-Aufnahme sind PTC einer Radiojodtherapie grundsätzlich zugänglich, was sich in der guten Prognose spiegelt [4]. Patienten haben im Allgemeinen sehr gute Heilungschancen bei einem 10-Jahres-Überleben von über 90 % [13].

1.1.2.2 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom

Der zweithäufigste maligne Tumor der Schilddrüse ist mit circa 30 % das follikuläre Karzinom (FTC) [13], welches vor allem bei Patienten um das 50. Lebensjahr herum auftritt [4]. Eine erhöhte Inzidenz zeigt sich zudem in Jodmangelgebieten. Die Knotenstruma gilt als Prädispositionsfaktor [22]. Wie beim PTC sind auch beim FTC Frauen öfter betroffen als Männer [4]. Die Tumorgenese entspringt häufig in einer Punktmutation des RAS-Protoonkogens, welches ebenfalls Teil des Ras/Raf-Signalweges

ist. Ähnlich der BRAF-Mutation führt eine Mutation dieses Gens zu einer ständigen Stimulation des Zellwachstums und der Zellteilung, was schließlich in einer Karzinogenese mündet [12, 30]. Ebenso lässt sich beim FTC eine Chromosomen-Translokation des Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor- γ -Gens nachweisen, was zur Bildung eines Fusionsproteins (Pax-8-PPAR- γ -Fusionsprotein) führt, welches als Onkoprotein fungiert [12, 31]. Charakteristisch für den follikulären Tumor, welcher ebenfalls von den Follikelzellen ausgeht und eine gute Differenzierung aufweist, sind ein invasives, unifokales Wachstum und eine frühe hämatogene Metastasierung, vor allem in Lunge und Knochen. Entsprechend seiner Infiltrationstiefe und der Gefäßinvasion unterscheidet man das Wachstum des FTC zwischen minimal- oder grob-invasiv. Multiple Gefäßeinbrüche oder Kapseldurchbrüche sprechen dabei für ein grob-invasives Wachstum [32]. Mikroskopisch weist der Tumor differenzierte Schilddrüsenfollikel ohne Papillenbildung auf [22]. Auch hier eignet sich Thyreoglobulin als Tumormarker zur Verlaufskontrolle [13]. Durch seine Differenzierung zeigt das follikuläre Karzinom ebenfalls einen Jod-Metabolismus, weshalb sich auch hier ein Einsatz der postoperativen Radiojodtherapie eignet [15]. Diesem Umstand ist es verdankt, dass das *Outcome* der Patienten bei lokal begrenztem FTC mit einem 10-Jahres-Überleben von über 70 % generell gut ist [33]. Sobald der Tumor jedoch gestreut hat oder nicht mehr auf eine Radiojodtherapie anspricht sind die therapeutischen Optionen begrenzt und die Prognose verschlechtert sich deutlich auf nur 19 % im 5-Jahres-Überleben [34].

1.1.2.3 Medulläres Schilddrüsenkarzinom

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC) leitet sich von den Calcitonin-sezernierenden, parafollikulären C-Zellen ab. Es zählt zu den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen und ist mit einem Anteil von 5 % ein eher seltener endokrinologischer Tumor [35]. Eine Geschlechterspezifität liegt hierbei nicht vor. Das MTC tritt in ungefähr 75 % der Fälle sporadisch bei einem Durchschnittsalter von 50 Jahren auf [13]. Die Karzinogenese begründet sich in der Mehrzahl der Fälle auf einer somatischen, aktivierenden (*gain of function*) Punktmutation des RET-Protoonkogens [19, 36]. Alternativ findet sich bei einem Großteil der RET-negativen Karzinome eine Mutation des RAS-Gens [37]. Bei einem Viertel der Patienten ist jedoch eine genetische Komponente im Rahmen eines MEN-Syndroms durch eine autosomal-dominante RET-Keimbahnmutation nachweisbar [26]. Der Tumor tritt dann häufig schon im Kindes- und

jugen Erwachsenenalter auf und wächst im Gegensatz zum sporadischen MTC eher bilateral. Es lassen sich drei klinische Syndrome unterscheiden: Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2A (70 %), Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2B (10 %) und Non-MEN (20 %), auch familiärer MTC genannt [13]. Obwohl MEN 2A und B unterschiedliche extrathyroidale endokrine Manifestationen aufweisen, ist bei beiden das medulläre Schilddrüsenkarzinom als dominantes klinisches Zeichen gemeinsam [38]. MTC metastasieren frühzeitig in die Lymphknoten des Halses. Zudem erfolgt eine hämatogene Metastasierung bevorzugt in Leber, Lunge und Knochen [3]. Die Heilungschancen liegen bei früh erkannten Karzinomen bei über 90 %. Hat der Tumor jedoch bereits gestreut, fällt das 10-Jahres-Überleben auf 21 %, da sich medulläre Malignome durch eine hohe Strahlenresistenz und einem äußerst eingeschränkten Ansprechen gegenüber einer konventionellen Chemotherapie auszeichnen [39]. Durch ihre fehlende Teilnahme am Jod-Metabolismus ist eine Radiojodtherapie keine Therapieoption [13]. Ein genetisches Screening der MTC-Patienten sowie deren Familienangehörige ist obligat, da bei positiver Testung eine prophylaktische Thyreoidektomie im Vorschulalter als auch postoperativ regelmäßige Kontrollen auf einen primären Hyperparathyreoidismus und ein Phäochromozytom erfolgen sollten. Zur Diagnostik und Verlaufskontrolle sowie als Rezidiv-Indikator dient Calcitonin [40].

1.1.3 Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom

Das undifferenzierte oder anaplastische Schilddrüsenkarzinom (ATC) ist ein seltenes Malignom der Follikelzellen (circa 5 % der Schilddrüsenkarzinome) [4]. Es tritt vor allem bei älteren Patienten nach dem 60. Lebensjahr auf [41], wobei Männer und Frauen gleich häufig betroffen sind [13]. Seine Genese ist spontan, auf dem Boden einer langjährig bestehenden Struma oder eines Prozesses fortschreitender Entdifferenzierung eines PTC oder FTC [42]. Bei spontanem Auftreten des Tumors lässt sich vor allem eine Mutation im p53-Tumorsuppressorgen nachweisen. Der Funktionsverlust des Proteins führt zu einer mangelhaften Regulation des Zellwachstums und zur Inhibierung der Apoptose. Dadurch können sich geschädigte Zellen unkontrolliert vermehren und entarten [12, 43, 44]. Das ATC zeichnet sich vor allem durch seine hohe Malignität aus. Durch schnelles, lokal-destruierendes Wachstum kommt es schon früh zu Komplikationen wie Dysphagie und Dyspnoe [45]. Durch massive Infiltration metastasiert das ATC schnell lymphogen und hämatogen, vor allem in Lunge, Knochen und Gehirn [46]. Da das undifferenzierte

Schilddrüsenkarzinom außerdem nicht am Jod-Umsatz teilnimmt, ist es einer Radiojodtherapie nicht zugänglich. Somit hat das ATC eine mittlere Überlebenszeit von circa sechs Monaten und damit die schlechteste Prognose aller thyroidalen Karzinome [13].

1.2 Die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse

1.2.1 Überblick

Da das Auftreten von Fernmetastasen die Hauptdeterminante für die Prognose von Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen darstellt, ist ein fundiertes Verständnis der molekularen Mechanismen von Tumorzell dissemination zwingend notwendig [34, 39]. Obwohl bereits verschiedene Signalwege, wie die Aktivierung des RET-Protoonkogens, mit Metastasierung assoziiert wurden, sind die spezifischen zellulären Faktoren, welche Tumorzellinvasion und Migration bestimmen, bis heute unbekannt [47]. Die Bildung von Metastasen ist ein gut koordiniertes Prozedere, welches Ähnlichkeiten mit der von Chemokinen gesteuerten Leukozytendiapedese aufweist [48, 49]. In den letzten Jahren wurde dahingehend verstärkt geforscht, wobei man festgestellt hat, dass Chemokine und ihre Rezeptoren eine Schlüsselrolle in der Tumorprogression und Metastasierung spielen [50].

Chemokine (**Chemotaktische Zytokine**) sind niedermolekulare Signalproteine und gehören zur Familie der Zytokine. Man unterteilt sie anhand ihrer Cysteinreste am Amino-Terminus in vier verschiedene Gruppen: CXC, CC, C und CX3C. Sie werden von unterschiedlichen Immun- und Gewebezellen produziert und wirken durch Interaktion mit spezifischen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren [51]. Die Rezeptoren haben oft mehr als einen Liganden. Ebenso können Chemokine an mehrere, spezifische Rezeptoren binden [52].

Sie sind als Botenstoffe vor allem verantwortlich für zelluläre Chemotaxis, der zielgerichteten Wanderung von Zellen des Immunsystems. Dabei bewegen sich die Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. Physiologisch steuern homöostatische Chemokine, welche permanent exprimiert werden, die Zellen des Immunsystems. So leiten sie zum Beispiel Lymphozyten zu Lymphknoten. Bei Entzündungen oder Verletzungen wird am Ort der Gewebeschädigung die Ausschüttung von inflammatorischen Chemokinen induziert. Sie werden den

zirkulierenden Leukozyten durch endotheliale Zellen über Glykosaminoglykane präsentiert, wo sie einen Leukozyten-Stopp bewirken und eine Extravasation ins Gewebe fördern. Sie regulieren so die körpereigene Immunabwehr [50]. Zusätzlich sind Chemokine an der Embryogenese und der Organentwicklung beteiligt und fördern die Angiogenese [53, 54].

Auch Malignome können *de novo* bestimmte Chemokine und Chemokinrezeptoren produzieren, die essentiell für einen Zelltransfer in und aus der Tumorumgebung heraus sind [55]. Dabei ist der Chemokinrezeptor verantwortlich für die Chemotaxis der Tumorzellen in Richtung höherer Konzentrationen des aktivierenden Liganden. Vor allem die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse mit den CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 und 7 sowie ihrem Liganden, dem CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12), hat in den letzten Jahren Aufmerksamkeit erregt und wurde als bedeutende Instanz im Metastasierungsprozess in einer Vielzahl von Tumoren nachgewiesen [56, 57].

1.2.1.1 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 und 7

Die CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) sind Rezeptorproteine aus der Familie der Chemokinrezeptoren. Als G-Protein-gekoppelte Transmembranrezeptoren weisen sie eine typische heptahelikale Struktur auf [58, 59].

CXCR4 wird vor allem während der Embryogenese von verschiedenen Geweben exprimiert, wie zum Beispiel Zellen des Immunsystems (Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten), des blutbildenden Systems im Knochenmark (vor allem CD34+ Vorläuferzellen) und des Nervensystems [60-62]. Physiologisch ist eine CXCR4-Expression in adulten Geweben kaum vorhanden, außer im Kolonepithel, Endothelzellen und bei Zellen des Immun- und hämatopoetischen Systems [55, 63, 64]. Jedoch wurde eine Überexpression des Rezeptors während der malignen Progression von verschiedenen Tumoren nachgewiesen [65, 66]. In seiner Funktion ist CXCR4 wesentlich an der Angiogenese und Entwicklung von embryonalen Organen beteiligt [67, 68]. Bei Erwachsenen steuert der Rezeptor den Immunzellenverkehr und die Mobilisation und Regulation von hämatopoetischen Stammzellen [61, 68]. Die wichtige Rolle von CXCR4 während der Embryogenese zeigt sich auch darin, dass eine *Loss-of-Function*-Mutation im kodierenden Gen den Tod des Embryos verursacht [69]. Pathophysiologisch fungiert CXCR4 unter anderem als Co-Rezeptor beim Eindringen der HI-Viren in die T-Lymphozyten und partizipiert bei der Neoangiogenese maligner Prozesse [66, 70]. Sein

einzig aktivierender Ligand ist das CXC-Motiv-Chemokin 12, welches selektiv an ihn bindet [71].

Ähnlich dem CXC-Rezeptor 4 ist der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7 kaum in somatischen, adulten Geweben exprimiert. Er weist jedoch eine starke Expression in diversen Zellen des Knochenmarks, Hepatozyten und Plazentazellen während des embryonalen Wachstums auf [58, 72-74]. Beim Erwachsenen findet sich ein vermehrtes Vorhandensein von CXCR7 vor allem auf Zellen des blutbildenden Systems und in Tumoren [73, 75, 76]. Physiologisch beteiligt sich der Rezeptor an der embryonalen Organogenese [77]. Die pathophysiologische Rolle von CXCR7 im Organismus wird jedoch kontrovers diskutiert. Einerseits wird wegen einer fehlenden, klassischen G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion nach Andocken seiner aktivierenden Liganden CXCL11 und CXCL12 eine Funktion als *Decoy*-Rezeptor und Chemokinfänger angenommen [58, 73, 78, 79]. Andererseits wird CXCR7 als Signal-übermittelnder Rezeptor erachtet, der nach Bindung von CXCL12 eine Aktivierung über den β -Arrestin-Weg vermittelt und zu Tumorwachstum und Metastasierung führt [80-83]. Dies führte zu der Annahme, dass CXCR7 als Co-Rezeptor für CXCR4 dient, welcher CXCL12-vermittelte Signale verstärkt [84]. Wie CXCR4 dient CXCR7 außerdem als Co-Rezeptor für das Eindringen von HI-Viren in Zellen [85].

1.2.1.2 CXC-Motiv-Chemokin 12

Das CXC-Motiv-Chemokin 12, auch unter dem Namen *Stromal cell-derived factor 1* bekannt, ist ein homöostatisches Chemokin der CXC-Familie, welches zusätzlich auch eine inflammatorische Funktionen innehat. Es gibt sechs verschiedene Isoformen, deren Hauptvertreter die α - und β -Form sind [86]. CXCL12 wird ubiquitär sowohl in embryonalen als auch adulten Geweben exprimiert und findet sich physiologisch vor allem in Lymphknoten, Lungen, Leber und Knochenmark [87, 88]. Eine erhöhte Expression des Chemokins zeigt sich zudem unter pathologischen Bedingungen bei Entzündung, Ischämie und Tumorbildung [80, 89]. Im embryonalen Stadium ist CXCL12 bei der Proliferation und Differenzierung von Stammzellen und der Entwicklung von Geweben involviert [89]. Im adulten Organismus spielt das Chemokin eine Schlüsselrolle in verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen. Es hält die Homöostase von Geweben aufrecht und induziert in inflammatorischen Gebieten die Anlockung von zirkulierenden Stammzellen, was die Reparatur des geschädigten Areals verstärkt [90]. Außerdem

reguliert und kontrolliert CXCL12 unter anderem den Zellverkehr der Immunzellen durch *Homing*, dem Zurückkehren von Stammzellen ins Knochenmark, als auch deren Mobilisation [91, 92]. Als potenter Ligand und Lockstoff von CXCR4- und CXCR7-exprimierenden Zellen hat CXCL12 eine große Bedeutung in Metastasierungsprozess maligner Tumore [50, 58, 71].

1.2.2 Bedeutung im Metastasierungsprozess

Dem Chemokin CXCL12 und seinen Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 wird in einer Vielzahl von Malignomen eine zentrale Rolle bei Tumorwachstum und Metastasierung zugesprochen [93-95]. Primärtumore exprimieren verstärkt CXCR4 und CXCR7. Die Expression wird über verschiedene Mechanismen in den malignen Zellen induziert und hochreguliert. Im Karzinom führt regionale Hypoxie durch exzessives Tumorwachstum zur Ausschüttung des Hypoxie-induzierten Faktors 1α (HIF- 1α), der über den NF- κ B-Signalweg eine Neubildung sowie eine Erhöhung des CXCR4-Rezeptors auf der Zelloberfläche bewirkt [55, 96, 97]. Zusätzlich generiert HIF- 1α die Produktion des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF), einem Wachstumsfaktor, der ebenfalls die Erhöhung der CXCR4-Expression und die Neoangiogenese induziert [98, 99]. Hypoxie ist auch eine Ursache für eine erhöhte CXCR7-Expression. Sie initiiert die Sekretion des Interleukin 8 von Tumorzellen in die Umgebung, was zu einem Rezeptor-Anstieg von CXCR7 auf den Tumorzellen führt [100, 101]. Wenn CXCR4 und CXCR7 koexprimiert werden, können sie Homo- und Heterodimere bilden und steuern eine CXCL12-vermittelte Chemotaxis [84]. CXCL12 wird unter anderem sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von den Stromazellen des Tumors in die Umgebung sezerniert (daher sein Name *Stromal cell-derived factor 1*). Nach der Ligandenbindung von CXCL12 an CXCR4 oder CXCR7 werden durch die Rezeptoren verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert [55, 76].

Bei der Bindung von CXCL12 vermittelt CXCR4 als G-Protein-gekoppelter Rezeptor über die Freisetzung von Calcium Migration und Chemotaxis [61, 102]. Außerdem reguliert er über die PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade den Zellzyklus und triggert so durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Tumorzellproliferation und das Zellüberleben durch Hemmung der Apoptose [103, 104]. Eine weitere Signaltransduktion des G-Protein-gekoppelten Rezeptors erfolgt über den Ras/Raf/ERK-Pfad, welcher ebenfalls für Proliferation und Chemotaxis verantwortlich ist [61, 105, 106]. Die

Interaktion zwischen CXCL12 und dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR7 vermittelt seine zelluläre Antwort nicht über die klassische, Inositoltrisphosphat-vermittelte Calcium-Mobilisation, sondern aktiviert den β -Arrestin-Weg. Das führt zu einer geminderten Aktivierung sowie Endozytose des Rezeptors [84, 107]. Gleichzeitig aktiviert er aber über die Phospholipase C den ERK- und AKT-Signalweg, was zu Zellüberleben und Tumorwachstum führt [61, 101, 108, 109]. Zusätzlich konnte eine CXCR7-induzierte Migration und Kolonien-Formation durch Erhöhung fokaler Adhäsionseigenschaften von Tumorzellen nachgewiesen werden [58, 73, 82]. CXCR7 wird überdies noch eine wichtige Rolle bei der Neoangiogenese durch CXCR7-vermittelte Expression von Interleukin 8 und VEGF zugesprochen, was das Tumorwachstum erleichtert [109].

Einige Signalkaskaden, darunter der PI3K/AKT/mTOR-Pfad für CXCR4 und der ERK-Weg für CXCR7, sind mit der Initiation der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) assoziiert [110, 111]. EMT ist ein Begriff aus der Embryologie und bezeichnet den Vorgang, bei dem sich Epithelzellen in Mesenchymzellen dedifferenzieren. Sie verlieren ihre Zellpolarität und ihre epithelialen Eigenschaften, indem sie ihre Zellkontakte auflösen. Dadurch können die Zellen die Basalmembran passieren und migrieren. Dieses Verfahren ist essentiell für eine normale Organentwicklung und Gewebedifferenzierung in Embryonen [112, 113]. Die EMT spielt jedoch auch eine Rolle bei der Progression von Karzinomen. Das Schlüsselereignis ist dabei die Verlust von E-Cadherin durch Umwandlung in N-Cadherin [111, 114]. Es bewirkt die Lösung der Tumorzellen aus dem Zellverband durch Verlust der Zelladhäsivität und fördert so das invasive Wachstum des Karzinoms. Außerdem ermöglicht EMT die Intravasation der malignen Zellen in Blutgefäße und führt so zu Fernmetastasierung [115]. Die gelösten, Chemokinrezeptor-exprimierenden Zellen folgen daraufhin dem Zytokingradienten hämatogen zu Orten mit hoher CXCL12-Sekretion, wie etwa Lymphknoten, Knochenmark, Lunge und Leber (siehe Abbildung 2) [55]. Die Tumorzellen invadieren nach Extravasation in diese Gewebe und bilden Metastasen mit Hilfe der mesenchymal-epithelialen Transition, dem umgekehrten Prozess der EMT, bei der die Zellen redifferenzieren [116]. Da die Mehrheit aller Tumore CXCR4 und CXCR7 auf ihrer Oberfläche aufweisen, vermittelt CXCL12 als *Homing*-Substanz eine chemotaktische Wirkung auf die meisten Tumorzellen und begünstigt die Induktion von Fernmetastasierung.

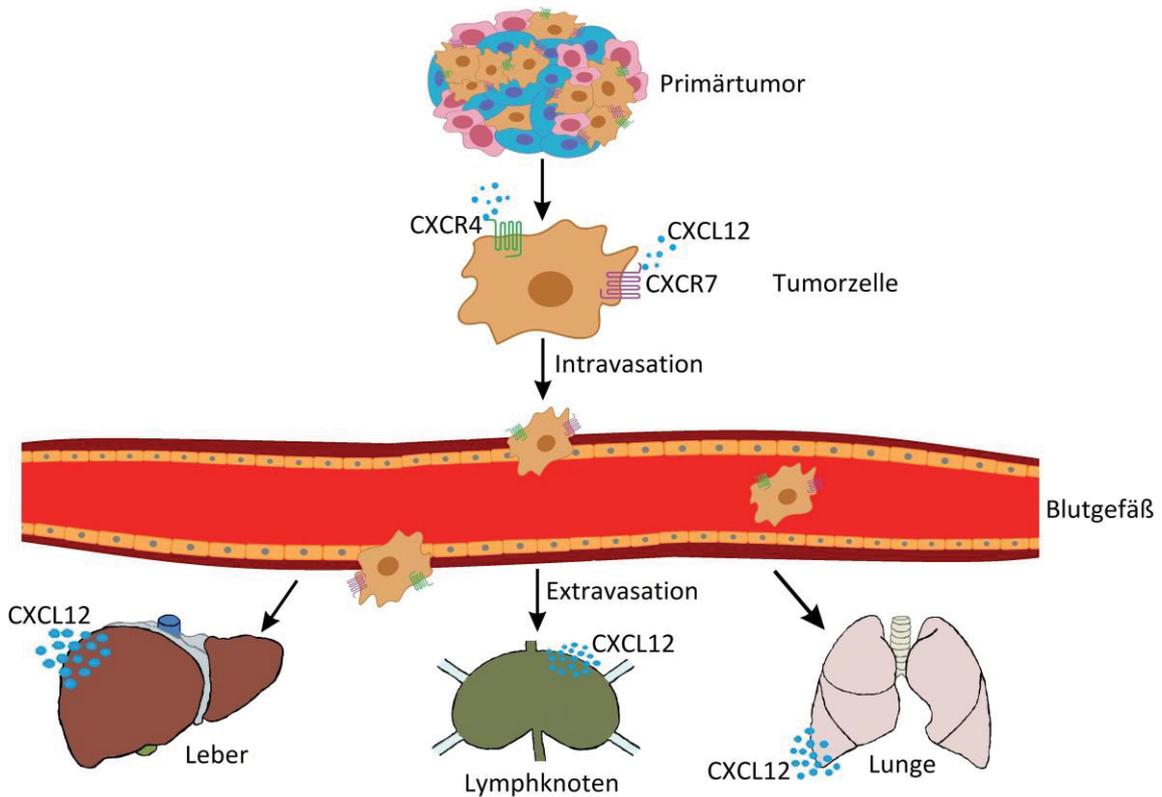


Abb. 2: Tumorzellinvasion und -dissemination. G-Protein-gekoppelte CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren vom Typ 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) werden von Zellen des Primärtumors exprimiert. Nach Bindung ihres aktivierenden Liganden, dem CXC-Motiv-Chemokin 12 (CXCL12), disseminieren und invadieren die Tumorzellen durch Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition hämatogen in CXCL12-exprimierende Gewebe (z.B. Leber, Lymphknoten und Lunge) und bilden dort Metastasen.

Trotz zahlreicher Nachweise der elementaren Rolle bei der Regulation von Tumorzellinvasivität und Metastasenbildung in verschiedenen Karzinomen ist die Bedeutung der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Schilddrüsenkarzinomen noch unbekannt. Eine Hemmung der Interaktion von CXCL12 mit seinen Rezeptoren konnte bereits den Metastasierungsprozess in anderen Malignomen *in vitro* und *in vivo* inhibieren [82, 104].

1.2.3 Die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse als therapeutisches Ziel

Aus diesem Grund ist die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse eine potenzielle Zielstruktur für eine neue medikamentöse Therapie von Schilddrüsenkarzinomen. Es konnten bereits einige chemische Substanzen hergestellt werden, welche die CXCR4- und CXCR7-Rezeptoren funktionell antagonisieren können und somit therapeutisch nutzbar wären [56, 117, 118].

Noch bevor man CXCR4 selbst identifiziert und charakterisiert hatte, wurde 1994 auf der Suche nach einem Medikament für Patienten mit Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) der erste selektive CXCR4-Antagonist AMD3100 (Plerixafor) entwickelt [119]. Dem Wirkstoff aus der Gruppe der Bizyklame wurde nachträglich noch die Eigenschaft als allosterischer Agonist von CXCR7 zugesprochen [120]. Per Zufall wurde entdeckt, dass AMD3100 hämatopoetische Stammzellen vom Knochenmark in die periphere Blutbahn mobilisiert, was zu seiner Zulassung für Zellrekrutierung vor autologen Stammzelltransplantationen bei Patienten mit Multiplem Myelom oder Non-Hodgkin-Lymphomen geführt hat [121, 122]. Ein weiterer vielversprechender, hochpotenter CXCR4-Rezeptorantagonist ist WZ811, ein Bipyridin-Derivat [123]. Es zeigte durch Inhibition von CXCR4 eine signifikante Reduktion der Zellmigration und Metastasierung sowie starke antitumorgene Eigenschaften durch Verminderung des Tumorwachstums bei hämatogenen Malignomen in Zellexperimenten und im Mausmodell [124].

Obwohl viele der Rezeptor-Inhibitoren *in vitro* und in ersten *in vivo* Studien gute Ergebnisse zeigen, ist bisher nur der CXCR4-Antagonist AMD3100 für die Karzinomtherapie eines Multiplen Myeloms oder Non-Hodgkin-Lymphoms zugelassen [125-127].

1.3 Ziele der Arbeit

Die Prognose der Patienten, welche an einem Schilddrüsenkarzinom erkrankt sind, ist hauptsächlich abhängig vom Metastasierungsstatus. Die Patienten versterben zumeist nicht an den Folgen des Primärtumors, sondern an denen der Fernmetastasierung, welche den prognoselimitierenden Faktor darstellt. Ein fundiertes Verständnis der molekularen Mechanismen des Invasions- und Metastasierungsverhaltens von Karzinomen ist somit essentiell für das *Outcome* der Patienten. Da bei zahlreichen Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Fernmetastasen vorliegen, ist eine radikale Thyreoidektomie mit Lymphknotendissektion als kurative Therapieoption nicht mehr ausreichend. Dementsprechend ist es von großer Bedeutung, neue molekulare Zielstrukturen als potenzielle Angriffspunkte einer zielgerichteten Therapie zu identifizieren. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Rolle der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse, welcher seit einigen Jahren eine zunehmende Bedeutung im Metastasierungsprozess von Tumoren zugesprochen wird, in humanen Schilddrüsenkarzinomen zu beleuchten und sie hinsichtlich ihres Potenzials als mögliche therapeutische Zielstruktur für metastasierte Schilddrüsenkarzinome zu evaluieren.

Dazu wurde zunächst mittels Immunhistochemie die Expression der CXCR4- und CXCR7-Rezeptoren in Schilddrüsenkarzinomen, beispielhaft anhand vom FTC und MTC, erforscht und mit klinisch-pathologischen Daten sowie dem Überleben korreliert. Anschließend wurde der strukturelle Nachweis von CXCR4 und CXCR7 in Schilddrüsenkarzinomzellen anhand von *Western Blot* und Immunzytochemie exploriert. Abschließend wurde der Frage nach der funktionellen Auswirkung der Achse in thyroidalen Karzinomen nachgegangen. Veränderungen der Zellinvasivität und des Zellzyklus wurden durch *Invasionsassays* und Durchflusszytometrie untersucht. Die Wirkung von CXCL12 auf die Expression EMT-spezifischer Gene zur Evaluation einer fraglichen Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR überprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller, Firmensitz
Accu-Jet pro Pipettierhelfer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim/DEU
Analog Vortex Mixer	VWR International, Radnor/USA
Axioplan 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena/DEU
BD FACSCanto II	BD Biosciences, Franklin Lakes/USA
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg/DEU
Biosafe MD	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen/DEU
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Chromo 4 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Comfort Kühlschranks	Liebherr, Bulle/CHE
Criterion Blotter	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
DM IL LED Mikroskop	Leica Camera AG, Wetzlar/DEU
Forma -86 °C ULT Freezer	Thermo Electron Corporation, Waltham/USA
Forma 405	Thermo Electron Corporation, Waltham/USA
Galaxy Mini-Zentrifuge	VWR International, Radnor/USA
HERAcell Inkubator	Heraeus Group, Meerbusch/DEU
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
HERAsafe KS Sterilbank	Heraeus Group, Meerbusch/DEU
HI-208 ph-Meter	Hanna Instruments, Vöhringen/DEU
Infinite M200	Tecan Group AG, Männedorf/CHE
KS 250 basic Schüttler	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Manual Tissue Arrayer MTA-1	Beecher Instruments, Sun Prairie/USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
MW 80 SL Mikrowelle	Bauknecht, Stuttgart/DEU
neoBlock II	neoLab, Heidelberg/DEU
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim/DEU
PlateFuge Microcentrifuge	Benchmark Scientific, Sayreville/USA
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA

Premium No Frost -20	Liebherr, Bulle/CHE
Quick-Pak Microcentrifuge	Labnet International, Inc., Edison/USA
RCT Basic Heizplatte	IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau/DEU
Research Plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg/DEU
RM5 Rollenmischer	Hecht-Assistant, Bernhausen/DEU
Sparkfree Laboratory Freezer	Thermo Electron Corporation, Waltham/USA
SU1400 Rollenmischer	Sunlab Instruments, Mannheim/DEU
Thermostatic Waterbath-WBS	Fried Electric, Haifa/ISR
Universal 30 RF Zentrifuge	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen/DEU
Universalwärmeschrank Modell 400	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach/DEU
VersaDoc MP 4000	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Wilovert A Mikroskop	Helmut Hund GmbH, Wetzlar/DEU

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller, Firmensitz
BioCoat Control Inserts	Corning, Inc., Corning/USA
BioCoat Matrigel Invasion Chambers	Corning, Inc., Corning/USA
Costar Stripetten (2-25 ml)	Corning, Inc., Corning/USA
Einmalskalpell	Feather, Osaka/JPN
Küvetten (2x Optisch)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht/DEU
Liquid Blocker Super Pap Pen	MBT Brand, Gießen/DEU
MaiMed-Tip Wattestäbchen	MaiMed GmbH, Neuenkirchen/DEU
MinElute Spin Columns	Qiagen, Hilden/DEU
Objektträger und Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde/DEU
Omnifix Einmalspritzen (1 ml; 5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen/DEU
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim/DEU
Round-Bottom Tube (5 ml)	BD Falcon, Franklin Lakes/USA
Safe-Lock Tubes (0,5 ml; 1,5 ml; 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg/DEU
Standard-Einbettkassetten	Engelbrecht GmbH, Edermünde/DEU
Sterican Standardkanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen/DEU
TipOne Pipettenspitzen (1-1000 µl)	StarLab Group, Hamburg/DEU
Trans-Blot Transfer Nitrocellulose	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Whatman-Filterpapier	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA

Zellkulturflaschen (25 cm²; 75 cm²)	Greiner Bio-One, Kremsmünster/AUT
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96- Well)	Corning, Inc., Corning/USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml; 50 ml)	BD Falcon, Franklin Lakes/USA

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Firmensitz
AB-Serum (20 %)	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Acrylamide/Bis Solution (30 %)	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
AMD3100 (Plerixafor)	Selleck Chemicals, Houston/USA
Ammonium persulfate (10 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Antibody Diluent	Zytomed Systems GmbH, Bargteheide/DEU
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Clarity Western ECL substrate, Luminol solution Peroxide solution	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche Molecular Diagnostics, Basel/CHE
Corbit-Balsam	I.Hecht GmbH, Kiel/DEU
Dimethyl sulfoxide HYBRI-MAX	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Distilled Water (DNase/RNase-free)	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Entellan	Merck Millipore, Burlington/USA
Ethanol absolute	VWR International, Radnor/USA
F-12K Nutrient Mix Medium	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Fetal Bovine Serum	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Hydrochlorid	Merck Millipore, Burlington/USA
Laemli Sample Buffer (6x)	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Mayers Hämalaunlösung	Merck Millipore, Burlington/USA
Methanol absolute	VWR International, Radnor/USA
Milchpulver	Nestlé Deutschland AG, Frankfurt(Main)/DEU
Nuclease-free Water	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Oligonukleotide (Primer) für qPCR	Eurofins Genomics, Ebersberg/DEU

Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin/DEU
Phosphate-buffered saline	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
PerfeCta FastMix II	Quanta Biosciences, Gaithersburg/USA
Precision Plus Protein Western C Standard	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Propidium Iodide	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Protector RNase Inhibitor	Roche Molecular Diagnostics, Basel/CHE
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
qPCR human reference total RNA	Agilent Technologies, Santa Clara/USA
rh-SDF1α	PeproTech GmbH, Rocky Hill/USA
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
RNase A (DNase/Protease-free)	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
RPMI 1640 Medium	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Sodium dodecyl sulfate	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Universal ProbeLibrary Set, Human	Roche Molecular Diagnostics, Basel/CHE
Target Retrieval Solution	Dako, Glostrup/DNK
TEMED	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
TRIS Base	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Tris-Borate-EDTA buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Triton X-100	MP Biomedicals, Santa Ana/USA
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Life Technologies/GIBCO, Carlsbad/USA
Tween 20 viscous liquid	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame/USA
Wasserstoffperoxid (3 %)	Merck Millipore, Burlington/USA
WZ811	Selleck Chemicals, Houston/USA
Xylol	VWR International, Radnor/USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
4',6-Diamidine-2'-phenylindole	Roche Molecular Diagnostics, Basel/CHE

2.1.4 Molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
DAB Substrate Kit High Contrast (DAB500plus)	Zytomed Systems GmbH,
DAB Chromogen (liquid DAB concentrate)	Bargteheide/DEU
DAB Substrate Buffer High Contrast	
qScript cDNA Synthesis Kit	Quanta Biosciences,
qScript Reaction Mix (5x)	Gaithersburg/USA
qScript Reverse Transcriptase (20x concentration)	
Nuklease-free water	
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden/DEU
RNeasy Mini Spin Columns (pink)	
Collection Tubes (1.5 ml)	
Collection Tubes (2 ml)	
Buffer RLT	
Buffer RW1	
Buffer RPE (concentrate)	
RNase-free water	
Quick-Start Protocol	
ZytoChem-Plus HRP Kit (HRP008DAB)	Zytomed Systems GmbH,
Peroxide Block	Bargteheide/DEU
Blocking Solution	
Biotinylated Secondary Antibody, polyvalent	
Streptavidin-HRP-Conjugate	
DAB Substrate Buffer	
DAB Concentrate (Chromogen)	

2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1,0 M Tris pH 6,8	1,0 M (121,14 g) Tris <i>ad</i> 800 ml <i>Aqua destillata</i> (<i>Aqua dest.</i>) mit Chlorwasserstoff (HCl) auf pH 6,8 einstellen
1,5 M Tris pH 8,8	1,5 M (181,71 g) Tris <i>ad</i> 800 ml <i>Aqua dest.</i> mit HCl auf pH 8,8 einstellen
20x SSC-Puffer	3,0 M (175,32 g) Natriumchlorid (NaCl) 300 mM (77,421 g) Tri-Natriumcitrat mit HCl auf pH 7,0 einstellen
10x SDS-Laufpuffer	250 mM (30,29 g) Tris 1,9 M (142,63 g) Glycin 35 mM (10,0 g) Sodiumdodecylsulfat (SDS) <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
10x TBS-Waschpuffer	1,5 M (87,66 g) NaCl 100 mM (12,1 g) Tris <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
10x TBS-T-Puffer	1,5 M (87,66 g) NaCl 100 mM (12,11 g) Tris 0,1 % <i>Tween 20</i> <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
10x Transferpuffer	250 mM (30,29 g) Tris 1,9 M (142,63 g) Glycin <i>ad</i> 1000 ml <i>Aqua dest.</i>
Färbelösung für <i>Invasionsassay</i>	0,5 % Kristallviolett 20 % Methanol 79,5 % Wasser

2.1.6 Oligonukleotide (*Primer*)

Primer-Sequenzen für die quantitative Echtzeit-PCR

<i>Primer</i>	Richtung	Sequenz (5' > 3')
BST2	<i>forward</i>	CCACCTGCAACCACACTG
	<i>revers</i>	CCTGAAGCTTATGGTTTAATGTAGTG
E-Cadherin	<i>forward</i>	TGGAGGAATTCTTGCTTTGC
	<i>revers</i>	CGCTCTCCTCCGAAGAAAC
FGF9	<i>forward</i>	GGACTCTACCTCGGGATGAA
	<i>revers</i>	TCTCTGAATACACACTCTTGGGTTA
GAPDH	<i>forward</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC
	<i>revers</i>	GCCCAATACGACCAAATCC
SNAI1	<i>forward</i>	GCTGCAGGACTCTAATCCAGA
	<i>revers</i>	ATCTCCGGAGGTGGGATG
Twist	<i>forward</i>	GGGCCGGAGACCTAGATG
	<i>revers</i>	TTTCCAAGAAAATCTTTGGCATA
Vimentin	<i>forward</i>	TACAGGAAGCTGCTGGAAGG
	<i>revers</i>	ACCAGAGGGAGTGAATCCAG

2.1.7 Hybridierungs sonden

Hybridierungs sonden für die quantitative Echtzeit-PCR

<i>Primer</i>	<i>Universal ProbeLibrary Set Number</i>
BST2	Probe # 39
E-Cadherin	Probe # 84
FGF9	Probe # 24
GAPDH	Probe # 60

SNAI1	Probe # 11
Twist	Probe # 50
Vimentin	Probe # 34

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Anti-CXCR4 antibody (ab58176)	Abcam, Cambridge/GBR
Anti-CXCR4 antibody (ab189048)	Abcam, Cambridge/GBR
Anti-CXCR7 antibody (GTX100027)	GeneTex, Inc., Irvine/USA
Anti-GAPDH antibody (ab8245)	Abcam, Cambridge/GBR

2.1.8.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Anti-Mouse IgG (goat)-Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Anti-Mouse IgG (goat)-Peroxidase Antibody	Sigma-Aldrich, St. Louis/USA
Anti-Rabbit IgG (goat)-Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham/USA
Anti-Rabbit IgG (goat)-HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers/USA

2.1.8.3 Antikörper zur Isotyp-Kontrolle

Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Mouse IgG1k (MOPC-21)	Abcam, Cambridge/GBR
Rabbit Immunoglobulin Fraction (X0903)	Dako, Glostrup/DNK

2.1.9 Software

2.1.9.1 Datenerhebung

Bezeichnung	Anbieter, Firmensitz
BD FACSDiva Version 8.01	BD Biosciences, Franklin Lakes/USA
i-control Microplate Reader Version 1.9	Tecan Trading AG, Männedorf/CHE
Opticon Monitor Software Version 3.1	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA
Quantity One Basic Analysis Version 4.6	Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA

2.1.9.2 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Bezeichnung	Anbieter, Firmensitz
GraphPad Prism 5.0a	GraphPad Software, Inc., La Jolla/USA
Statistical Software R Version 3.1.0	The R Development Core Team/AUT

2.1.10 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	B-CPAP	TT2609-C02(TTfoll)	TT (TTmed)	HTh7	SW-1736	NIH/3T3
Gewebe	PTC	FTC	MTC	ATC		Fibroblast
Differenzierung	differenziert			undifferenziert		
Spezies	<i>Homo sapiens</i>					<i>Mus musculus</i>
Geschlecht	weiblich	männlich	weiblich	weiblich	weiblich	männlich
Ethnizität	kaukasisch					-
Alter	76	57	77	74	77	Embryo
Morphologie	spindelförmig	kleinzellig	epithelial	epithelial	epithelial	fibroblastisch
Wachstum	<i>Monolayer</i> , adhären wachsend					
Besonderheit			hereditär (MEN 2A)			spontan immortalisiert
Medium	RPMI	RPMI	F-12K	RPMI	RPMI	DMEM
Anbieter	DSMZ	DSMZ	ATCC	UK Essen	CLS	ATCC
Referenz-Nr.	ACC-273	ACC-510	CRL-1803	-	300453	CRL-1658

Abkürzungen: PTC = Papilläres Schilddrüsenkarzinom; FTC = Follikuläres Schilddrüsenkarzinom; MTC = Medulläres Schilddrüsenkarzinom; ATC = Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom; MEN 2A= Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2A; RPMI = RPMI 1640 Medium; F-12K = F-12K Nutrient Mix Medium; DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium; DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; ATCC = *American Type Culture Company*; CLS = *Cell Lines Service*

Tabelle 1 zeigt die in der Arbeit verwendeten Zelllinien und deren Charakteristika. Die Zellen der anaplastischen Linie HTh7 wurden freundlicherweise vom Forschungslabor Endokrinologie des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt. Die Identitätsverifizierung der Zelllinien erfolgte mittels *Short-Tandem-Repeat* (STR)-Analyse.

2.1.11 Gewebeproben

Das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf stellte für die Anfertigung der *Tissue Microarrays* (TMA) für immunhistochemische Färbungen Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeblöcke bereit. Zur Herstellung des TMA wurden die Gewebeproben von 44 Patienten mit histologisch gesichertem follikulären Schilddrüsenkarzinom, korrespondierendem thyroidalen Normalgewebe sowie zehn Fernmetastasen und 18 follikulären Adenomen verwendet.

Zur immunhistochemischen Untersuchung von medullären Schilddrüsenkarzinomen konnte auf einen bereits vorhandenen TMA mit Gewebeproben von 86 Patienten mit histologisch gesichertem MTC zurückgegriffen werden [128].

2.1.12 Patientenauswahl und klinisch-pathologisches Datenmaterial

Für die Herstellung des *Tissue Microarrays* mit Gewebeproben von follikulären Schilddrüsenkarzinomen wurden drei Patientenkollektive evaluiert. Die jeweiligen Proben wurden vor Beginn der Studie histologisch überprüft und bewertet. In die Studie aufgenommen wurden einerseits Patienten mit histologisch bestätigtem FTC, welche am Universitätsklinikum Düsseldorf zwischen 1992 und 2014 kurativ chirurgisch versorgt wurden (n = 44). Des Weiteren wurden Gewebeproben von zehn Patienten mit operativer Resektion einer Fernmetastase des FTC, sowie Material von 18 follikulären Schilddrüsenadenomen miteinbezogen. Der bereits vorhandene medulläre TMA berücksichtigt alle Patienten (n = 86) mit histologisch validiertem MTC mit kurativer Versorgung am Universitätsklinikum Düsseldorf zwischen 1986 und 2003 [128]. Sämtliche in die Studie aufgenommenen Tumorproben wurden nach den Richtlinien der achten Ausgabe der *Union internationale contre le cancer* (UICC) klassifiziert [129].

In der Studie nicht berücksichtigt wurden Gewebeproben, welche eine unzureichende pathologische Befundung, lückenhafte oder fehlende klinische Dokumentation, unvollständige Resektionsränder oder nicht genügend Tumormaterial für weitere Analysen

aufwiesen. Zudem wurden Patienten, die innerhalb der ersten 30 Tage nach der Operation wegen postoperativen Komplikationen verstorben sind, nicht in die Überlebensanalyse miteinbezogen.

Für die Erhebung der klinisch-pathologischen Angaben sowie der *Follow-Up*-Daten wurde auf eine hausintern angelegte Datenbank zurückgegriffen. Das Datenmaterial berücksichtigt das Alter bei Erstdiagnose, das Geschlecht, das Datum und die Art der Operation, den betroffenen Lappen, das initiale Tumorstadium inklusive des TNM-Status sowie Gesamt- und Rezidiv-freies Überleben. Das Gesamtüberleben wurde definiert als Zeit in Monaten vom Datum der Operation an bis zum Tod jedweder Ursache oder bei Abbruch des *Follow-Ups*. Die Studienabbrecher wurden daraufhin zensiert. Bei medullären Schilddrüsenkarzinomen wurden als zusätzliche klinisch-pathologische Kriterien der präoperative Serum-Calcitonin-Spiegel, die Familienanamnese sowie das genetische Profil der sporadischen oder hereditären Karzinome mit eingeschlossen.

2.1.13 Ethikvotum und gute klinische Praxis

Es liegt ein positives Ethikvotum der Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verwendung der Gewebeproben von Patienten zu Forschungszwecken vor (Studennummer 3821). Die Forschung an dieser Arbeit wurde nach den Richtlinien der guten klinischen Praxis, der Deklaration von Helsinki sowie landes- und bundesrechtlichen Bestimmungen durchgeführt [130, 131].

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien sowie deren zugehörige Nährmedien können Tabelle 1 entnommen werden. Die Medien wurden vor dem Gebrauch mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt.

Vor der Verwendung wurden die Nährmedien für circa 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Die kultivierten Zellen wurden bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens von circa 80 % der Wachstumsfläche passagiert. Nach Überprüfung auf Kontamination und anschließender Waschung mit phosphatgepufferter Salzlösung wurden die Zellen mittels Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) nach dreiminütiger Inkubation bei 37 °C aus dem adhärenen *Monolayer* herausgelöst. Daraufhin wurden die Zellen mit ihrem jeweiligen Medium in Suspension gebracht und nach einer 1:6-Verdünnung in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche überführt. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage mit Ausnahme der MTC-Zelllinie TT, welche aufgrund ihrer langsameren Verdopplungszeit nur alle vier bis fünf Tage gesplittet werden musste. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂).

2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde lichtmikroskopisch nach Färbung der Zellen mit Trypanblau die Zahl der Lebendzellen bestimmt. Das Zählgitter der Neubauer Zählkammer besteht aus vier Eckquadraten, welche jeweils eine Fläche von 1 mm² und ein Volumen von 0,1 µl bei einer Höhe von 0,1 mm aufweisen [132]. Der Farbstoff Trypanblau wird von lebenden Zellen, deren Membran noch intakt ist, nicht aufgenommen und eignet sich damit zur Bestimmung der Zellviabilität, da perforierte oder abgestorbene Zellen mit defekter Membran den Farbstoff aufnehmen und sich dunkelblau färben [133].

Nachdem die adhärenen Zellen gelöst und zentrifugiert wurden, wurde das *Zell-Pellet* in 10 ml Medium resuspendiert. Daraufhin wurden 10 µl der Suspension mit 10 µl Trypanblau gefärbt und in die Zählkammer gefüllt. Es erfolgte die mäanderförmige Auszählung vitaler Zellen in den vier Eckquadraten zur Zelldichtebestimmung. Die Zellzahl pro µl berechnete sich nach der folgenden Formel:

$$\begin{aligned} \text{Zelldichte (Zellen/}\mu\text{l)} &= \left(\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \right) \times 10 \times 2 \\ &= \left(\frac{n1 + n2 + n3 + n4}{4} \right) \times 10 \times 2 \end{aligned}$$

Die Gesamtzellzahl ist die Summe der vorhandenen Zellzahl je Quadrat. Der Faktor 2 erklärt sich durch die mit Trypanblau verdünnte 2:1-Suspension.

2.2.3 Behandlung der Zellen

Nach Aussaat einer jeweils definierten Zellzahl und Kultivierung bei 37 °C für 24 Stunden (h) wurden die Zellen mit chemischen *Compounds* behandelt. Beim Wechsel des Nährmediums wurde dabei das frische, FCS-freie Zellkulturmedium mit dem jeweiligen *Compound* auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt und zu den Zellen hinzugegeben. Für die Beurteilung der größtmöglichen Wirksamkeit der Substanzen inkubierten die Zellen im *Compound*-versetzten Medium 24 bis 48 h, je nach anschließendem Versuchsaufbau. Als *Compound* wurden die für CXCR4 spezifischen Antagonisten AMD3100 (Plerixafor) und WZ811 sowie CXCL12 (*Recombinant human stromal cell-derived factor 1 α* , rh-SDF1 α) als Ligand von CXCR4 und CXCR7 verwendet [73].

Invasionsassay und Durchflusszytometrie

Für den *Invasionsassay* und die Durchflusszytometrie wurden in 6-Well Platten jeweils 300.000 Zellen/*Well* ausgesät und für 24 h kultiviert. Danach wurden die Zellen mit dem jeweiligen chemischen *Compound* im FCS-freien Medium für 24 h inkubiert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Konzentrationen der *Compounds* für *Invasionsassay* und Durchflusszytometrie

<i>Compound</i>	Konzentration	Lösungsmittel
AMD3100	100 nM, 1 μ M	<i>Aqua dest.</i>
WZ811	100 nM, 1 μ M	Dimethylsulfoxid
rh-SDF1 α	10 ng/ml, 100 ng/ml	<i>Aqua dest.</i>

Abkürzungen: Aqua dest. = *Aqua destillata*; rh-SDF1 α = *Recombinant human stromal cell-derived factor 1 α*

Protein- und RNA-Isolation

Für die Protein- und RNA-Isolation wurden jeweils 700.000 Zellen in 25 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei wurden pro Zelllinie eine Flasche mit Nährmedium ohne FCS und zwei Flaschen mit Nährmedium mit FCS für 24 h kultiviert. Beim Beimpfen der Flaschen mit dem verwendeten *Compound* rh-SDF1 α in der Konzentration 1 μ g/ml ergaben sich damit die Kombinationen „-FCS/+rh-SDF1 α “, „+FCS/+rh-SDF1 α “ und „+FCS/-rh-SDF1 α “. Die Inkubationszeit mit dem Substrat betrug 48 h.

2.2.4 Invasionsassay

Mit Hilfe der *BioCoat Matrigel Invasion Chambers* der Firma Corning, Inc. wurden Veränderungen der Zellinvasivität untersucht. Aufbau und Wirkungsweise der *Invasion Chambers* zeigt Abbildung 3.

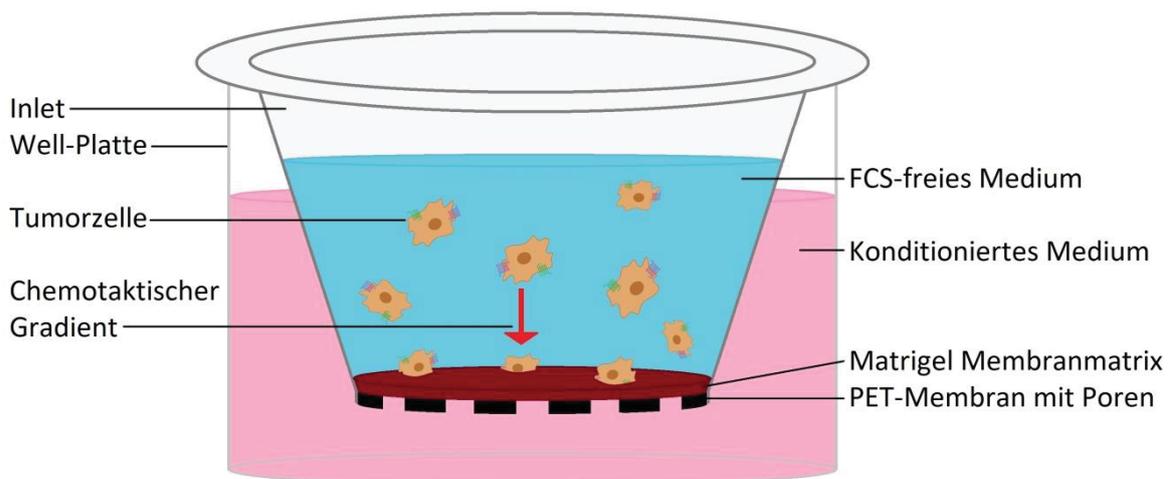


Abb. 3: Aufbau und Wirkungsweise der *Invasion Chambers*. Die *Invasion Chambers* bestehen aus zwei Kammern [134]. Die obere Kammer wird mit Tumorzellen beimpft und als *Inlet* in die mit einem chemotaktischen Lockstoff befüllte untere Kammer gehängt. Die Zellen invadieren im fetalen Kälberserum (FCS)-freien Medium entlang dem chemotaktischen Gradienten nach unten und landen in einer Matrigel-Basalmembran, welche einer Polyethylenterephthalat (PET)-Membran mit 8 μ m großen Poren aufliegt. Die Matrigel-Matrix verschließt die Poren der PET-Membran und hindert nicht-invasive Zellen daran, durch die Membran zu migrieren. Im Gegensatz dazu können sich invasive Zellen von der Membran lösen und in die Matrigel-Membran eindringen, was die quantitative Auswertung invadierender Zellen mittels Lichtmikroskopie ermöglicht.

Zunächst wurden die Zellen mit einer Dichte von 300.000 Zellen pro *Well* ausgesät und über Nacht kultiviert. 24 Stunden vor Beginn des *Invasionsassays* wurde das FCS-haltige Medium abgenommen und durch das jeweilige Medium ohne FCS, dafür aber mit verschiedenen Konzentrationen von rh-SDF1 α , AMD3100 und WZ811 ersetzt (siehe Tabelle 2). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und auf eine Dichte von 50.000 Zellen/ml in FCS-freiem Medium eingestellt. Die obere Kammer des *Assays (Inlet)* wurde mit 500 μ l der Zellsuspension, also 25.000 Zellen, befüllt. Zusätzlich wurde 0,25 % Rinderserumalbumin (BSA) sowie die jeweiligen Konzentrationen der *Compounds* und Kontrollen in äquimolaren Konzentrationen hinzugefügt (siehe Tabelle 2). Für die Befüllung der unteren Kammer wurde konditioniertes *Dulbecco's Modified Eagle Medium* von CXCL12-sezernierenden NIH/3T3-Zellen verwendet. Zur Konditionierung des Mediums waren die NIH/3T3-Zellen zwei Tage in diesem Medium kultiviert worden. Anschließend wurde das konditionierte Medium abgenommen und gefiltert. Konsekutiv wurde die obere Kammer mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig in die untere Kammer gehängt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden die Überreste abgegossen. Das *Inlet* mit den invadierten Zellen wurde in 100 % Methanol für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert und danach vorsichtig mit einem Wattestäbchen gesäubert. Die Membran des *Inlets* wurde schließlich mit 4',6-diamidin-2-phenylindol (1:1000 in 4x *Saline-sodium citrate* verdünnt) gefärbt. Abschließend wurde die Membran mit einem Skalpell vorsichtig aus der Invasionskammer ausgeschnitten, auf einen Objektträger gelegt und mit *Vectashield Mounting Medium* eingedeckelt. Die Zellzählung der invadierten Zellen erfolgte in fünf verschiedenen Gesichtsfeldern von drei unterschiedlichen Membranen unter einem Fluoreszenzmikroskop in 200-facher Vergrößerung. Die Objektträger wurden nach Gebrauch lichtgeschützt aufbewahrt.

2.2.5 Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalyse

Um die Auswirkungen der *Compounds* auf die Proliferation der Tumorzellen zu untersuchen, wurden Zellzyklusanalysen mittels Propidiumiodid (PI)-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt.

Das Prinzip eines Durchflusszytometers beruht auf der Analyse von optischen Signalen, die die Zelle nach Anregung durch einen Laserstrahl emittiert [135]. Die zu untersuchenden Zellen werden angesaugt und treten dabei in einen Mikrokanal ein, der

jede Zelle einzeln durch den Messbereich eines Laserstrahls lenkt. Die Zelle wird angeregt und sendet ein Streulicht sowie gegebenenfalls bei entsprechender Färbung ein Fluoreszenzsignal aus, welches von einem Detektor aufgenommen und elektronisch ausgewertet wird. Durch das detektierte Vorwärtsstreulicht (*Forward scatter*) der Zelle aus Richtung des Laserstrahls lassen sich Rückschlüsse über das Volumen der Zelle ziehen, da es sich proportional zur Zellgröße verhält. Das emittierte Licht im rechten Winkel zum Laser, welches Seitwärtsstreulicht (*Side scatter*) genannt wird, kann nach Detektion zur Beurteilung der Zellgranularität sowie der Charakterisierung des Zellkerns verwendet werden. Bei zusätzlicher Fluoreszenzfärbung der Zellen besteht außerdem die Möglichkeit, diese nach bestimmten, zuvor festgelegten Kriterien zu analysieren. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid färbt unspezifisch DNA-enthaltenden Zellbestandteile durch Interkalation zwischen den Basen [136]. Es sendet proportional zur Menge der vorhandenen DNA ein rotes Fluoreszenzsignal aus, was eine quantitative Messung des DNA-Gehaltes von Zellen ermöglicht. Die Zellzyklusphasen können so anhand der vorhandenen DNA-Menge unterschieden werden, da sich teilende Zellen einen diploiden Chromosomensatz besitzen, welcher ein stärkeres Fluoreszenzsignal aussendet als ruhende Zellen mit haploidem Chromosomensatz. Eine rote Fluoreszenz zeigt sich daher in der G₂/M-Phase fast doppelt so ausgeprägt wie in der G₁-Phase (siehe Abbildung 4).

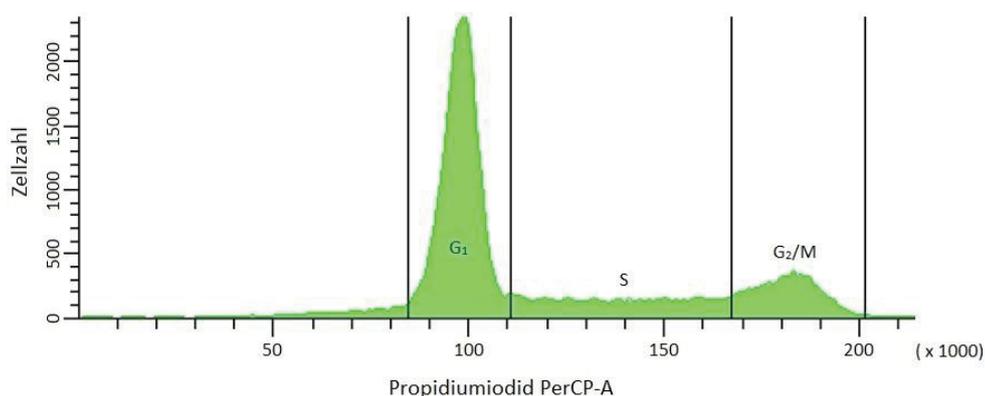


Abb. 4: Beispielhaftes Ergebnis einer FACS-Analyse. Auf der X-Achse ist die Intensität der Propidiumiodid-Färbung aufgetragen, welche der vorhandenen DNA-Menge entspricht. Die Y-Achse zeigt die gemessene Zellzahl. Entsprechend dem Zellzyklus befinden sich die meisten Zellen in Ruhe (G₁-Gipfel). Sie besitzen einen haploiden Chromosomensatz. In der S-Phase des Zyklus synthetisieren die Zellen DNA, so dass in der G₂/M-Phase ein diploider Chromosomensatz vorliegt, welcher ein stärkeres Fluoreszenzsignal sendet.

Die Tumorzellen wurden in aufsteigenden Konzentrationen mit rh-SDF1 α , AMD3100, WZ811 oder den jeweiligen Kontrollen in äquimolaren Konzentrationen behandelt (siehe Tabelle 2) und für 24 Stunden im Medium ohne FCS bei 37 °C inkubiert. Nach Ernte und Waschung in kaltem PBS wurden die Zellen bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen wurden mit einem kleinen verbliebenen Rest PBS im FACS-Röhrchen resuspendiert. Unter permanentem Vortexen wurde jeweils 1 ml 80 % Ethanol tropfenweise hinzugefügt. Nach zwei Stunden Kühlung bei 4 °C wurden die Zellen für fünf Minuten bei 380 x g zentrifugiert. Es erfolgte die Resuspension des *Pellets* in 3 ml PBS und eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Das *Zell-Pellet* wurde nun in PBS, versetzt mit 1 % FCS, RNase A (100 μ g/ml) und PI (25 μ g/ml), resuspendiert. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten wurden 150 μ l PBS hinzugefügt. Direkt im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen lichtgeschützt mittels *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) mit dem Durchflusszytometer *BD FACSCanto II* ausgewertet.

2.2.6 RNA-Isolation

Nach *Compound*-Behandlung der Zellen mit rh-SDF1 α in der Konzentration 1 μ g/ml wurde zur Isolierung von RNA aus den Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien das *RNeasy Mini Kit* von Qiagen verwendet. Nach Trypsinierung und Waschung mit PBS wurden die Zellen zehn Minuten bei 110 x g zentrifugiert. Entsprechend der Größe des *Pellets* wurde 350 bis 600 μ l RLT-Puffer zur Zellyse hinzugefügt. Nach Homogenisierung mit Hilfe einer Kanüle erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens von 70 %-igem Ethanol auf die Zellsuspension. Anschließend wurden davon maximal 700 μ l auf eine RNeasy Mini Säule geladen, welche über Silica-Membranen verfügt, die die später freiwerdende RNA binden. Es folgte die Zentrifugation der Säule samt Inhalt bei 8000 x g für 15 Sekunden. Zum DNase-Verdau auf der Membran wurde 350 μ l RW1 Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Nach dem Auftragen von 10 μ l DNase I *Stock Solution* und 70 μ l RDD Puffer wurde die Säule 15 Minuten inkubiert und danach mit 350 μ l RW1 Puffer gewaschen. Es erfolgte die erneute Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 x g. Daraufhin wurde die Säule zweimal mit 500 μ l RPE Puffer gewaschen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Zwischen den beiden Waschschrritten wurde bei 8000 x g zuerst für 15 Sekunden, dann für zwei Minuten zentrifugiert. Schließlich wurde die Säule eine Minute bei maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugiert, in ein 1,5 ml-

Reaktionsgefäß gestellt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser befüllt. Abschließend wurde erneut eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Das erhaltene RNA-Extrakt wurde mit Hilfe des Tecan *Infinite M200* auf die Reinheit überprüft.

2.2.7 cDNA-Synthese

Für die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion wurde vorab mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“(RT) die aus den Zellen isolierte RNA in ihre komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben.

Dafür wurde je nach Konzentration 1 µg RNA mit nuklease-freiem Wasser verdünnt und auf ein Volumen von 15 µl gebracht. Es erfolgte die Zugabe von 4 µl *qScript Reaction Mix* (5x) und 1 µl *qScript RT* (1x) aus dem *qScript cDNA Synthesis Kit* der Firma Quanta Biosciences. Die Lösung wurde vorsichtig mittels Vortex durchmischt und anschließend 10 Sekunden zentrifugiert. Im *C1000 Thermal Cycler* von Bio-Rad Laboratories durchlief der Ansatz ein zuvor definiertes Protokoll (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Ablauf der cDNA-Syntheseschritte im *Thermal Cycler*

Schritt	Temperatur	Dauer
Inkubation	22 °C	5 Minuten
Umschreibung in cDNA	42 °C	30 Minuten
Inaktivierung der RT	85 °C	5 Minuten
Halten	4 °C	unbegrenzt

Abkürzungen: cDNA = komplementäre Desoxyribonukleinsäure; RT = Reverse Transkriptase

Die finale cDNA-Konzentration wurde auf 1 ng/µl eingestellt. Die anschließende Probenlagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.8 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist eine gezielte *in vitro*-Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche mit Hilfe einer DNA-Polymerase und genspezifischen Oligonukleotiden (*Primer*). Sie ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der Expression verschiedener Gene auf RNA-Ebene in Echtzeit durch Fluoreszenz-Messungen nach jedem PCR-Zyklus [137].

Nach Denaturierung der Nukleinsäuren zu Einzelstrang-DNA binden genspezifische *Primer* an das 3'-Ende der Gensequenz (*Annealing*). Die *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase, eine thermostabile DNA-Polymerase, synthetisiert in der Elongationsphase vom *Primer* aus komplementäre Nukleinsäuresequenzen entlang dem Strang in 5'-3'-Richtung. Dadurch entsteht ein neuer Doppelstrang. Die Repetition dieses Vorgangs ist beliebig oft möglich und führt damit zum exponentiellen Anstieg der DNA-Amplifikate [138]. Bei der qPCR werden zusätzlich Hybridierungs sonden (*Probes*) hinzugegeben, welche als kurze DNA-Abschnitte komplementär zur gesuchten Gensequenz sind. Sie sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff, dem sogenannten *Reporter*, und einem Fluoreszenzlöcher (*Quencher*) markiert [139]. Eine Lichtemission wird jedoch zunächst durch eine Wechselwirkung zwischen *Reporter* und *Quencher*, dem sogenannten *Förster resonance energy transfer* (FRET), unterdrückt [140]. Nach Anlagerung an den spezifischen Gen-Abschnitt während der qPCR wird die Gensonde durch die Taq-Polymerase abgebaut. Die Unterdrückung der Lichtemission durch den *Quencher* wird aufgehoben und der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt (siehe Abbildung 5). Das nach Anregung der Sonde mit Licht entstehende Fluoreszenzsignal wird am Ende jedes PCR-Zyklus gemessen und nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

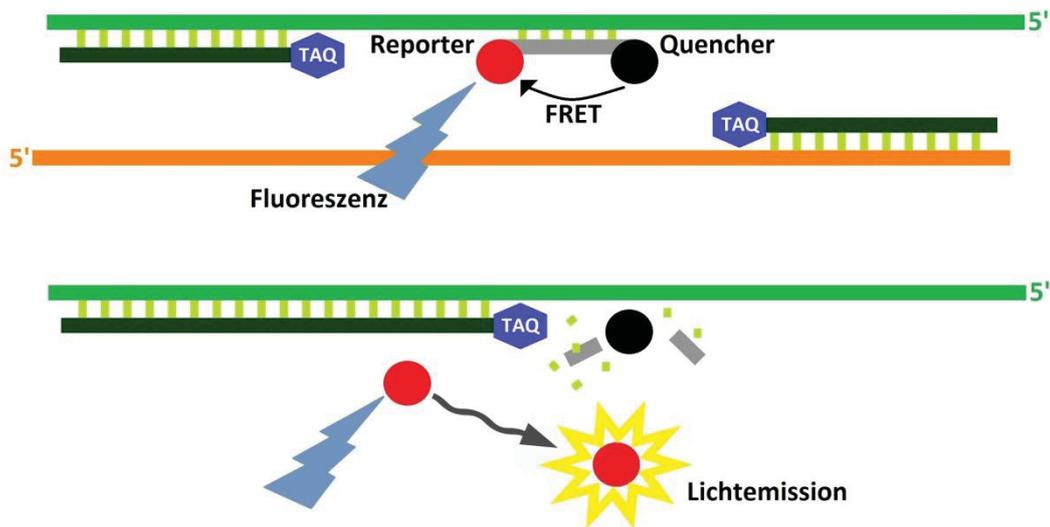


Abb. 5: Prinzip der Hybridisierungssonden. Nach Anlagerung der Gensonde an die gesuchte Gensequenz und dem darauffolgenden Abbau durch die *Thermus aquaticus* (Taq)-Polymerase, entfällt die Unterdrückung der Lichtemission durch den *Quencher*. Der *Reporter* wird freigesetzt und emittiert nach Anregung durch Fluoreszenz ein Lichtsignal, welches am Ende jedes PCR-Zyklus gemessen wird.

Die Tumorzelllinien wurden zu Beginn mit rh-SDF1 α in der Konzentration 1 μ g/ml behandelt. Nach RNA-Isolation folgte die cDNA-Synthese, um anschließend die qPCR durchführen zu können. Zum Ausschluss einer Kontamination wurde in der PCR-Reaktion eine *No-Template*-Kontrolle (Ansatz ohne RNA) sowie eine *No-Amplification*-Kontrolle (Ansatz ohne Reverse Transkriptase) zum Ausschluss eventueller, unspezifischer Lichtemissionen im Hintergrund mitgeführt.

Es wurde das Expressionslevel von Genen begutachtet, die bei der epithelial-mesenchymalen Transition eine Rolle spielen [141-143]. Des Weiteren wurde die fragliche Abnahme des Adhäsionsproteins E-Cadherin untersucht. Alle verwendeten *Primer* sowie deren zugehörige Sonden können unter II.1.6 und II.1.7 eingesehen werden.

Folgender Ansatz wurde auf Eis in jedes *Well* pipettiert:

- 2,0 μ l cDNA
- 0,2 μ l Sonde
- 0,2 μ l *Forward Primer*
- 0,2 μ l *Reverse Primer*
- 7,4 μ l *Aqua dest.*
- 10 μ l *PerfeCta Fast Mix II*

Jeder qPCR-Ansatz erfolgte in dreifacher Ausführung auf einer 96-Well Platte. GAPDH fungierte dabei als Referenzgen, während cDNA aus einer universellen humanen Referenz-RNA als Kontrollprobe diente. Die PCR-Läufe wurden mit dem *Chromo 4 Thermal Cycler* von BioRad entsprechend einem vorher definierten Protokoll durchgeführt: Nach zweiminütiger Inkubation bei 95 °C erfolgten 40 Zyklen mit jeweils Denaturierung bei 95 °C für 10 Sekunden, *Primer-Annealing* und Extension bei 60 °C für 30 Sekunden und abschließendem Auslesen der Platte.

Die Genexpression wurde gemäß der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode quantifiziert [144]. Zur Ermittlung der *Fold Change*, dem relativen Expressionsunterschied des Zielgens in der unbehandelten und der mit dem *Compound* behandelten Tumorprobe, wurde entsprechend der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode folgende Formel verwendet:

$$\Delta Ct_{\text{Referenzgen}} = MW_{\text{Referenzgen behandelt}} - MW_{\text{Referenzgen unbehandelt}}$$

$$\Delta Ct_{\text{Zielgen}} = MW_{\text{Zielgen behandelt}} - MW_{\text{Zielgen unbehandelt}}$$

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

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \textit{Fold Change}$$

(Ct = *Cycle of threshold*; MW = Mittelwert)

Die relative Expression des Zielgens wurde dabei in Relation zu einer Referenzprobe (GAPDH) berechnet. Der Ct-Wert (*Cycle of threshold*) wurde in der qPCR ermittelt und entspricht der Zykluswiederholung, in dem sich die gemessene Fluoreszenz zum ersten Mal exponentiell über den Hintergrundwert anhebt. Je höher die Expression des Zielgens in den Proben ist, desto niedriger ist der Ct-Wert.

2.2.9 Proteinisolation und Proteinmengenbestimmung

Nach Stimulation der Zellen mit dem *Compound* rh-SDF1 α in der Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$ wurde eine Proteinisolation durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde das *Zell-Pellet* nach Verwerfen des Überstandes in 250 μl RIPA-Lysepuffer und 10 μl Protease-Inhibitor resuspendiert. Das Lysat wurde 15 Minuten auf Eis gelagert und unterdessen alle fünf Minuten mit Hilfe des Vortex Mixers durchmischt. Nach einer halbstündlichen Zentrifugation bei 15000 x g und 4 °C wurde der Überstand mit dem Proteinlysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das *Zell-Pellet* wurde verworfen.

Die quantitative Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Biophotometers der Firma Eppendorf nach der Methode von Bradford bestimmt [145]. Dazu wurde *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* der Firma Bio-Rad im Verhältnis 1:5 mit *Aqua dest.* gemischt. Davon wurden 998 µl mit 2 µl Proteinlysat in einer Küvette zusammengeführt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der im Reagenz enthaltene Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G-250* bildet nach Bindung an die im Lysat vorhandenen Proteine Komplexe und erhöht das Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Das Maß der Farbreaktion wurde photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentration anhand einer zuvor durch bekannte Mengen BSA erstellten Eichkurve ermittelt.

2.2.10 Western Blot

Zur Beurteilung des Rezeptor-Status der Zelllinien wurde eine *Western Blot*-Analyse durchgeführt. Mittels *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) wurden die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen CXCR4 und CXCR7 wurden die Proteine anschließend mit Hilfe einer Fluoreszenzlösung detektiert und analysiert.

Dazu wurden nach Proteinisolation der einzelnen Zelllinien jeweils 20 µg Protein mit *Aqua dest.* und einem Tris-Glycin-Puffer (Laemmli-Puffer, pH 8,3) im Verhältnis 1:6 auf 18 µl Gesamtvolumen gebracht. Für die Denaturierung der Proteine folgte eine fünfminütige Inkubation bei 95 °C mit anschließender Lagerung auf Eis. Währenddessen wurde ein Trenngel gegossen, welches nach Zugabe von Ammoniumpersulfat und Tetramethylethyldiamin (TEMED) in der Gussform des *Mini-PROTEAN Tetra Cell* der Firma Bio-Rad polymerisierte. Nach Aushärtung wurde ein Sammelgel hergestellt und auf dieses gegossen. Die einzelnen Komponenten der Gele können Tabelle 4 und Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenngels (12 %)

Chemikalie	Volumen (ml)
<i>Aqua dest.</i>	3,3
30 % <i>Acrylamide/Bis Solution</i>	4
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10 % SDS	0,1
10 % Ammoniumpersulfat	0,1
TEMED	0,004
Gesamtvolumen	~10

Abkürzungen: *Aqua dest.* = *Aqua destillata*; SDS = Natriumdodecylsulfat; TEMED = Tetramethylethyldiamin

Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels (12 %)

Chemikalie	Volumen (ml)
<i>Aqua dest.</i>	1,4
30 % <i>Acrylamide/Bis Solution</i>	0,33
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,25
10 % SDS	0,02
10 % Ammoniumpersulfat	0,02
TEMED	0,002
Gesamtvolumen	~2

Abkürzungen: *Aqua dest.* = *Aqua destillata*; SDS = Natriumdodecylsulfat; TEMED = Tetramethylethyldiamin

Die Gussform wurde im Anschluss in eine vollständig mit 1x SDS-Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer gestellt und mit den aufbereiteten Proteinproben beladen. Als Laufmarker-Kontrolle der Proteinbanden dienten 5 µl *Precision Plus Protein Western C Standards*. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 4 °C mit einer angelegten Spannung von 90 Volt (V). Nach einer halben Stunde Laufzeit wurde die Spannung für weitere 45 Minuten auf 115 V erhöht. Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe der *Wet blot*-Technik von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Eine Haltekassette wurde dazu mit dem Acrylamidgel und der Nitrocellulose-Membran bestückt, eingebettet zwischen Whatman-Filterpapieren und Schwämmen. Der schematische Aufbau einer *Blotting*-Kassette kann Abbildung 6 entnommen werden.

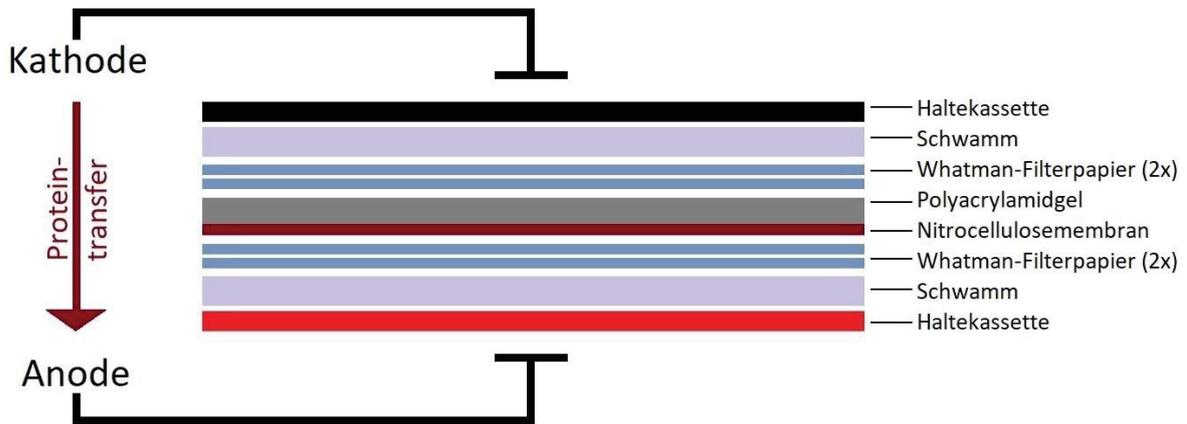


Abb. 6: Schematischer Aufbau einer *Blotting*-Kassette. Der Proteintransfer vom Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulose-Membran erfolgt entlang der angelegten Spannung von der Kathode zur Anode.

Im Anschluss wurde die Kassette in eine mit 1x Transferpuffer befüllte *Blotting*-Kammer gegeben. Der Transfer der Proteine, die durch elektrische Spannung angeregt in Richtung Anode auf die Nitrocellulose-Membran wandern, erfolgte bei 100 V über 45 Minuten bei 4 °C. Mittels anschließender *Ponceau S*-Färbung der Membran wurde der Transfererfolg kontrolliert. Es folgte ein Abspülen des Farbstoffes durch *Aqua dest.* sowie eine zehnmünütige Waschung mit 1x *Tris-buffered saline + Tween 20* (TBS-T). Für den Antikörper-Nachweis wurde die Membran anschließend in ein 50 ml-Gefäß überführt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde diese zunächst mit 5 ml 5 % Milch in 1x TBS-T (Blockierlösung) für eine Stunde auf einem Roller bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper-Markierung erfolgte über Nacht. Zu 3 ml der Blockierlösung wurde dafür jeweils der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung hinzugefügt, in das Gefäß mit der Membran gegeben und bei 4 °C auf dem Roller inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 1x TBS-T für fünf Minuten wurde am folgenden Tag anschließend der jeweilige Sekundärantikörper in 3 ml Blockierlösung verdünnt und mit 1,3 µl *Precision Protein Streptactin HRP Konjugat* versetzt. Die Membran inkubierte in der Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Roller. Nachdem die Membran erneut zweimal mit TBS-T gewaschen wurde, konnte diese nach Zugabe von 1 ml Detektionsmix, bestehend aus einer Luminol- sowie einer Peroxidlösung im Verhältnis 1:1, mit dem *VersaDoc MP 4000* der Firma BioRad Laboratories ausgewertet werden. Das *housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente zur anschließenden Ladungskontrolle und wurde ebenfalls dem oben genannten Prozedere

entsprechend bearbeitet. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über alle verwendeten Antikörper sowie deren Nutzungsbedingungen.

Tabelle 6: Übersicht der für den *Western Blot* verwendeten Antikörper

Primärantikörper	Molekulargewicht (kDa)	Verdünnung	Sekundärantikörper
<i>Anti-CXCR4 antibody</i> (ab58176)	40	1:250	<i>Anti-Mouse IgG-Peroxidase</i>
<i>Anti-CXCR7 antibody</i> (GTX100027)	41	1:1000	<i>Anti-Rabbit IgG-HRP-linked</i>
<i>Anti-GAPDH antibody</i> (ab8245)	36	1:10000	<i>Anti-Mouse IgG-Peroxidase</i>

Abkürzungen: kDa = Kilodalton; CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; IgG = Immunglobulin G; CXCR7 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7; HRP = *Horse radish peroxidase*; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

2.2.11 *Tissue Microarray* und Immunhistochemie

Zur Untersuchung der Rezeptorexpression von CXCR4 und CXCR7 in folliculären und medullären Schilddrüsenkarzinomen wurden die Schnitte des *Tissue Microarrays* immunhistochemisch für CXCR4 und CXCR7 gefärbt. Bei der Herstellung des folliculären TMA wurden aus den Paraffinblöcken verschiedener Gewebeproben Zylinder ausgestanzt und auf einen einzigen Paraffinblock übertragen. Das zu untersuchende Areal eines Gewebeblocks (Geberblock) wurde zuvor mittels mikroskopischer Begutachtung festgelegt. Zylinder von 1,0 mm Durchmesser wurden aus diesen histologisch definierten Bereichen entnommen und im Abstand von 0,5 mm in einen leeren Paraffinblock (Empfängerblock) eingefügt. Die hergestellten Empfängerblöcke beinhalten jeweils zwei repräsentative Gewebeproben der primären thyroidalen Neoplasie, eine Gewebeprobe vom Normalgewebe des jeweiligen Patienten und, falls vorhanden, Fern- und Lymphknotenmetastasen sowie Adenome. Diese und der bereits vorhandene medulläre TMA wurden anschließend in 4 µm dicke Scheiben geschnitten, welche auf Objektträgern fixiert wurden.

Die Immunhistochemie (IHC) dient dem Ziel des qualitativen Nachweises von zellulären Antigenen in Gewebeproben durch Visualisierung einer vorhandenen, antigenen Determinante (Epitop) [146]. Das Prinzip beruht auf der hochselektiven Affinität von Antikörpern gegenüber diesen Epitopen, was eine spezifische Anfärbung molekularer Strukturen ermöglicht. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein im Präparat nach Bindung an sein Epitop sichtbar macht und damit die gesuchte Struktur nachweist (siehe Abbildung 7).

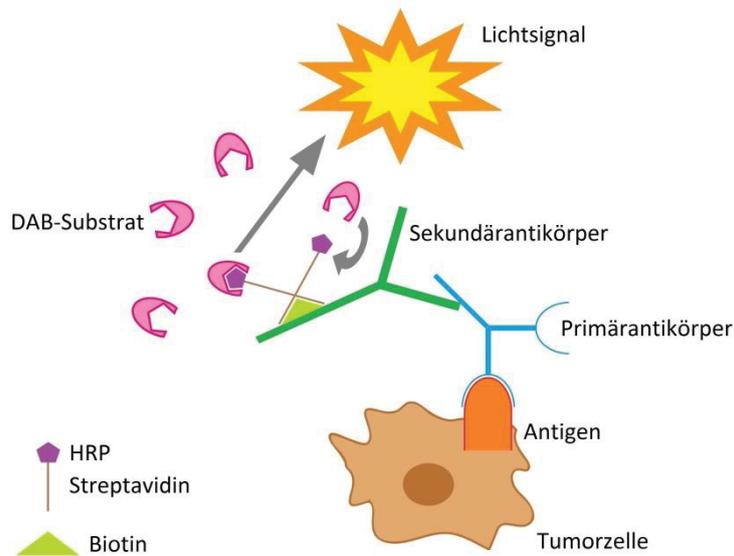


Abb. 7: Prinzip der immunhistochemischen Färbung. Karzinomzellen exprimieren das gesuchte Antigen auf der Zelloberfläche. Ein spezifischer Primärantikörper bindet in einer Antigen-Antikörper-Reaktion an die Epitope des Antigens. Zum indirekten Nachweis der Zielantigene bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Nach Zugabe eines Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP)-Streptavidin-Enzymkomplexes gehen die Moleküle eine starke kovalente Bindung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper ein. Das Hinzufügen von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Substrat als fargebende Komponente löst eine enzymatische Reaktion mit der Meerrettichperoxidase aus (Enzym-Substrat-Reaktion), welche am Ort der Bindung an den Primärantikörper einen dunkelbraunen Farbniederschlag bildet. Durch diese Visualisierung ist nun eine lichtmikroskopische Auswertung der Gewebeproben möglich.

Die Färbung wurde mit dem *ZytoChem-Plus HRP Kit* (HRP008DAB) der Firma Zytomed Systems GmbH durchgeführt. Nach Entparaffinisierung der Gewebeschnitte in Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe wurden die Präparate zur Demaskierung der Epitope eine halbe Stunde in 3 % Natrium-Citrat Puffer (pH 6,0) bei 95 °C gekocht. Nach Abkühlung der Schnitte bei Raumtemperatur wurden sie in einer Lösung aus 1x phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) + 0,1 % *Tween 20* gewaschen. Um die endogene Peroxidase zu inhibieren, welche später zu unerwünschten Hintergrundfärbungen führen könnte, wurden die Präparate zehn Minuten mit 150 µl 3 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung in PBS bei einem pH von 7,4 inkubiert. Die Proben wurden anschließend für zehn Minuten in der Blockierlösung (Reagenz 1) inkubiert, um unspezifische Protein-Bindungsstellen zu blockieren und somit die Gefahr einer unpräzisen Hintergrundfärbung weiter zu minimieren. Nach erneuter Waschung mit 1x PBS + 0,1 % *Tween 20* wurden 150 µl des Primärantikörpers (siehe Tabelle 7), jeweils verdünnt mit *AntibodyDiluent*, auf den

Objektträger gegeben und eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschgang folgte eine 15-minütige Einwirkzeit der Schnitte mit einem biotinylierten, polyvalenten Sekundärantikörper (Reagenz 2) sowie die Zugabe von zwei Tropfen Streptavidin-*Horseradish peroxidase* (HRP)-Konjugat (Reagenz 3) mit 30-minütiger Inkubation. Anschließend wurden zur Visualisierung der Epitope auf jeden Schnitt drei Tropfen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Substrat aufgetragen und für fünf Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach einer weiteren Waschung mit *Aqua dest.* folgte die Kernfärbung in Mayers-Hämalaun. Abschließend wurden die Schnitte zur Dehydrierung in eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylol gelegt und luftblasenfrei mit Entellan eingedeckelt. Zur Überprüfung der korrekten Probenverarbeitung diente als Positivkontrolle für CXCR4-exprimierende Gewebe ein Tonsillenpräparat und für CXCR7 ein Adenokarzinom der Bauchspeicheldrüse. Als Negativkontrollen dienten die jeweiligen Isotypkontrollen, die sich in der Färbung negativ zeigten, sodass man eine unspezifische Färbung ausschließen konnte. Als Isotypkontrolle diente für das Maus-Immunglobulin G (IgG) der Antikörper *Mouse IgG1k* (MOPC-21) von Abcam in einer 1:50-Verdünnung und für das Kaninchen-IgG *Rabbit Immunoglobulin Fraction* (Code X0903) in einer 1:1000-Verdünnung von Dako.

Tabelle 7: Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper

Epitop (Antikörper)	Spezies	Verdünnung
CXCR4 (ab58176)	Maus	1:100
CXCR7 (GTX100027)	Kaninchen	1:200

Abkürzungen: CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; CXCR7 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7

Für die Analyse der *Tissue Microarrays* wurde der Expressionsgrad von CXCR4 und CXCR7 in den gefärbten Gewebeproben von zwei unabhängigen Untersuchern lichtmikroskopisch mittels einer modifizierten Form des Immunreaktiven *Scores* (IRS) nach Remmele verblindet erhoben [147]. Die Prozentzahl der in der Probe angefärbten Zellen wurde wie folgt quantifiziert: $\leq 5\%$ (0), 6-25% (1), 26-50% (2), 51-75% (3) und $> 75\%$ (4). Die Intensität der Färbung, was dem Grad der Rezeptorexpression entspricht, wurde nach den Stufen „abwesend (0)“, „schwach (1)“, „mäßig (2)“ und „stark (3)“ bewertet. Das Produkt beider Werte entspricht einem IRS-Level von 0 bis 12 (siehe Tabelle 8).

Die prognostische Aussagekraft von CXCR4 und CXCR7 wurde in Übereinstimmung mit den *REcommendations for tumour MARKer prognostic studies* (REMARK) ausgewertet [148].

Tabelle 8: Immunreaktiver Score zur Auswertung der Immunhistochemie

		Farbintensität			
		Abwesend (0)	Schwach (1)	Mäßig (2)	Stark (3)
Prozent der gefärbten Zellen	≤ 5 % (0)	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
	6-25 % (1)	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
	26-50 % (2)	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
	51-75 % (3)	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
	> 75 % (4)	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Abkürzungen: IRS = Immunreaktiver Score

2.2.12 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie (ICC) dient der Darstellung bestimmter Proteine oder Antigene in zytologischem Material und lässt somit Rückschlüsse zu, ob Zellen oder Gewebe das fragliche Antigen exprimieren [149]. Die Visualisierung erfolgt durch Bindung eines spezifischen Primärantikörpers, der im Verlauf einen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper bindet. Diese Methode entspricht somit dem Prinzip der bereits erwähnten Immunhistochemie. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass bei der ICC einzelne Zellen gefärbt werden, welche aus ihrer physiologischen, extrazellulären Matrix isoliert oder kultiviert wurden. Im Gegensatz dazu werden bei der Immunhistochemie paraffinierte Schnitte von biologischem Gewebe getestet, wo jede Zelle von einer anatomischen, intakten Gewebestruktur umgeben ist.

Die Zelllinien wurden in 6-Well Kammerobjektträgern á 25.000 Zellen pro Kammer auf 500 µl ausgesät und über Nacht im jeweiligen Medium bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaliger Waschung mit PBS wurden die Zellen fünf Minuten in eiskaltem Methanol fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde für fünf Minuten 0,5 % Triton in die Kammern gegeben. Anschließend wurden die Zellen 20 Minuten in 20 % AB-Serum, gelöst in PBS, inkubiert, um unspezifische Epitope zu blocken. Es folgte die Markierung der Primärantikörper sowie der Antikörper zur Isotypkontrolle in der jeweiligen Verdünnung in 10 % AB-Serum in PBS. Alle verwendeten Antikörper und deren Verdünnung können Tabelle 9 entnommen werden. Nach einstündiger Inkubation wurde ein fluoreszierender Sekundärantikörper in der Konzentration 10 µg/ml PBS für 30 Minuten auf die Zellen gegeben (siehe Tabelle 9). Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten jeweils drei Waschgänge á drei Minuten mit PBS. Zur Kernfärbung wurde abschließend für zehn Minuten 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), 1:1000-fach verdünnt in PBS, in die Kammern hinzugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Kammeraufsätze vorsichtig vom Objektträger gelöst. Dieser wurde mit Entellan eingedeckelt und direkt im Anschluss unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung untersucht.

Tabelle 9: Übersicht über die in der Immunzytochemie verwendeten Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper
<i>Anti-CXCR4 antibody</i> (ab189048)	1:25	<i>Anti-Mouse IgG (goat)- Alexa Fluor 488</i>
<i>Mouse IgG1k</i> (MOPC-21)	2 µg/ml	
<i>Anti-CXCR7 antibody</i> (GTX100027)	1:100	<i>Anti-Rabbit IgG (goat)- Alexa Fluor 488</i>
<i>Rabbit Immunoglobulin Fraction (X0903)</i>	2 µg/ml	

Abkürzungen: CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; IgG = Immunglobulin G; CXCR7 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7

2.2.13 Statistische Analyse

Zur Evaluation eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Rezeptorexpressionslevel von CXCR4 und CXCR7 mit verschiedenen klinisch-pathologischen Variablen wurde für numerische Daten der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test verwendet. Für die Beurteilung und Validierung der kategorischen Daten wurden die Proben anhand ihres IRS jeweils in hohe ($IRS \geq \text{Median}$) und niedrige Rezeptorexpression ($IRS < \text{Median}$) eingeteilt und anhand des *Fisher's Exact Test* analysiert. Nach Erstellung von Kaplan-Meier-Kurven wurde die univariate Überlebensanalyse mit dem *Log-rank* Test ausgewertet, während für die multivariate Überlebensanalyse die Cox-Regression zur Abschätzung des Risikoquotienten (*Hazard Ratio*, HR) mit einem 95 % Konfidenzintervall (CI) verwendet wurde. Gesamtüberleben wurde dabei definiert als die Zeit vom Datum der Operation bis zum Tod jedweder Genese oder dem Zeitpunkt des letzten *Follow-Ups*.

Nach der Regressionsanalyse wurde auf Grundlage von *Akaike information criterion* die Suche nach dem besten statistischen Modell durchgeführt, unter Verwendung eines schrittweise ablaufenden Auswahlverfahrens der einzelnen Variablen [150]. Zur Identifikation der Untergruppen von Patienten, welche eine besonders schlechte Prognose besitzen, wurde zusätzlich eine Überlebensanalyse mittels Regressionsbaum erstellt.

Experimente der Zellkultur wurden mindestens dreimal in jeweils unterschiedlichen Passagen durchgeführt und für statistische Signifikanz mit dem parameterfreien Mann-Whitney-U-Test evaluiert.

Die statistischen Analysen wurden mit *GraphPad Prism* (Version 5.0a) und *Statistical Software R* (Version 3.1.0) durchgeführt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1 CXCR4 und CXCR7 in Schilddrüsenkarzinomen

Zur Beurteilung der Expression der CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 und 7 in follikulären Schilddrüsenkarzinomen wurden aus Gewebeproben von Patienten *Tissue Microarrays* hergestellt. Für die Beurteilung bei medullären Schilddrüsenkarzinomen konnte auf einen bereits zur Verfügung stehenden TMA zurückgegriffen werden [128]. Nach immunhistochemischer Färbung wurde die Expressionsstärke von CXCR4 und CXCR7 mit klinisch-pathologischen Variablen sowie dem *Outcome* assoziiert, um die Bedeutung der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse für Schilddrüsenkarzinome und deren Prognose zu untersuchen. Die Datenanalyse und ihre Assoziation erfolgte gemäß den *REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies* (REMARK) [148].

3.1.1 CXCR4 und CXCR7 im follikulären Schilddrüsenkarzinom

Anhand des erstellten *Tissue Microarrays* wurden Gewebeproben von 44 Patienten mit FTC und 18 follikulären Schilddrüsenadenomen sowie zehn Fernmetastasen eines FTCs auf die Expression von CXCR4 und CXCR7 untersucht. Durch den Verlust von zwei Gewebeproben während des Färbeprozesses für CXCR4 und vier Gewebeproben bei der CXCR7-Färbung ergab sich in der anschließenden Auswertung eine abweichende Stichprobengröße. Weiterhin wurden zehn Patienten aufgrund eines abgebrochenen *Follow-Ups* nicht in der Überlebensanalyse berücksichtigt. Genaue Angaben über die in die Studie aufgenommenen Patienten zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Charakteristiken der Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom

Teile dieser Tabelle wurden bereits veröffentlicht [151].

Variablen	Patientenzahl (%)
Gesamt	44 (100)
Alter	
Median (Streuung in Jahren)	59 (17-85)
Geschlecht	
Männlich	19 (43)
Weiblich	25 (57)

Operationstechnik	
Hemithyreoidektomie	3 (7)
mit unilateraler ND	1 (2)
Subtotale Thyreoidektomie	11 (25)
mit unilateraler ND	4 (9)
mit zentraler LKD	1 (2)
Totale Thyreoidektomie	7 (16)
mit unilateraler ND	2 (5)
mit bilateraler ND	11 (25)
mit zentraler LKD	4 (9)
Tumor-Stadium	
T1/2	24 (55)
T3/4	20 (45)
Lymphknotenmetastasierung	
N0	41 (93)
N1a/b	3 (7)
Fernmetastasierung	
M0	38 (86)
M1	6 (14)
UICC-Stadium	
UICC I/II	22 (50)
UICC III/IV	22 (50)
Invasivität	
Minimal	20 (45)
Grob	22 (50)
Unbekannt	2 (5)
Rezidiv	
Nein	17 (39)
Ja	9 (20)
Unbekannt	18 (41)

Abkürzungen: ND = Neck dissection; LKD = Lymphknotendissektion; UICC = Union internationale contre le cancer

3.1.1.1 Expression in Normal- und Tumorgewebe

Nach immunhistochemischer Färbung des TMA's für CXCR4 und CXCR7 (siehe Abbildung 8) erfolgte ein Vergleich der Expression beider Marker in den Gewebeproben. Dazu wurde die Expression mit Hilfe des Immunreaktiven *Scores* nach Remmele bewertet und anschließend mit dem parameterfreien Mann-Whitney-U-Test statistisch ausgewertet.

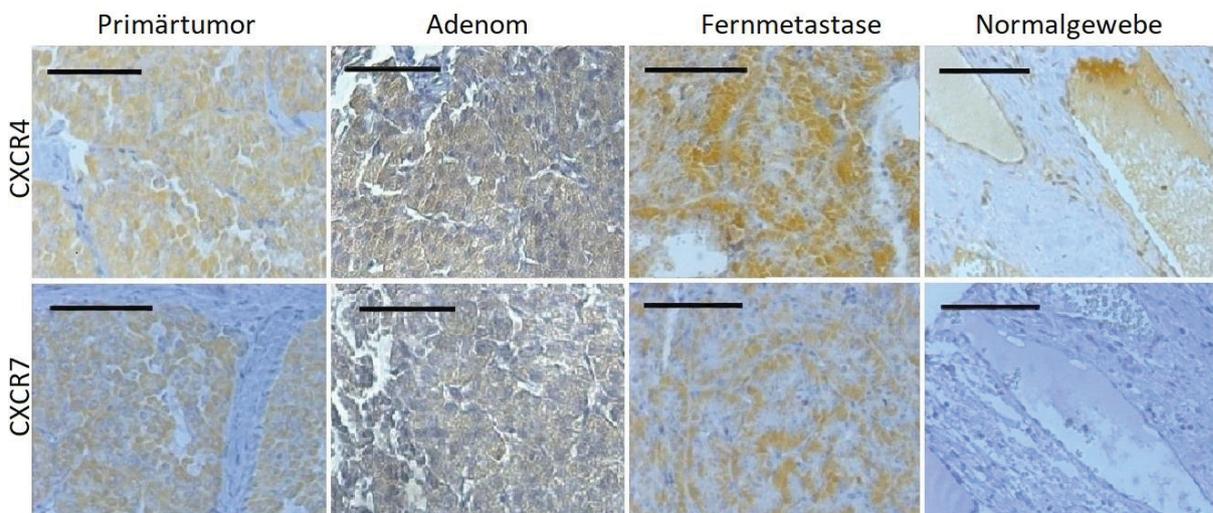


Abb. 8: Immunhistochemische Färbung des FTC-Tissue Microarrays für CXCR4 und CXCR7. Repräsentative Gewebeproben von follikulärem Schilddrüsenkarzinom (FTC), follikulärem Adenom, Fernmetastasen und thyroidalem Normalgewebe immunhistochemisch für die CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) gefärbt. Aufgenommen mit dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Der Balken in der oberen linken Ecke entspricht 50 µm. Diese Abbildung wurde bereits veröffentlicht [151].

Es zeigte sich eine signifikant höhere Expression von CXCR4 ($p < 0,001$) und CXCR7 ($p < 0,001$) in den FTC im Vergleich zum thyroidalen Normalgewebe (siehe Abbildung 9). Beim Vergleich der Markerexpression von follikulären Schilddrüsenadenomen und gesundem Gewebe zeigte sich für CXCR4 eine signifikante Erhöhung der IRS-Werte ($p < 0,001$) in den Adenomen, was der erhöhten Expression im FTC gleicht. Auch die CXCR7-Expression war in den Adenomen im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erhöht ($p < 0,01$), jedoch im Vergleich zum FTC signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). Des Weiteren sind die IRS-Werte von CXCR4 und CXCR7 in den Fernmetastasen im Vergleich zum normalen Schilddrüsengewebe deutlich signifikant angestiegen (CXCR4: $p < 0,001$; CXCR7: $p < 0,001$). Die Korrelation von Fernmetastase und Primärtumor zeigte ebenfalls eine signifikant höhere Expression von CXCR4 in den Metastasen ($p < 0,05$).

Dies gilt jedoch nicht für CXCR7. Interessanterweise zeigte sich im Normalgewebe eine moderate Färbung für CXCR4, jedoch nicht für CXCR7.

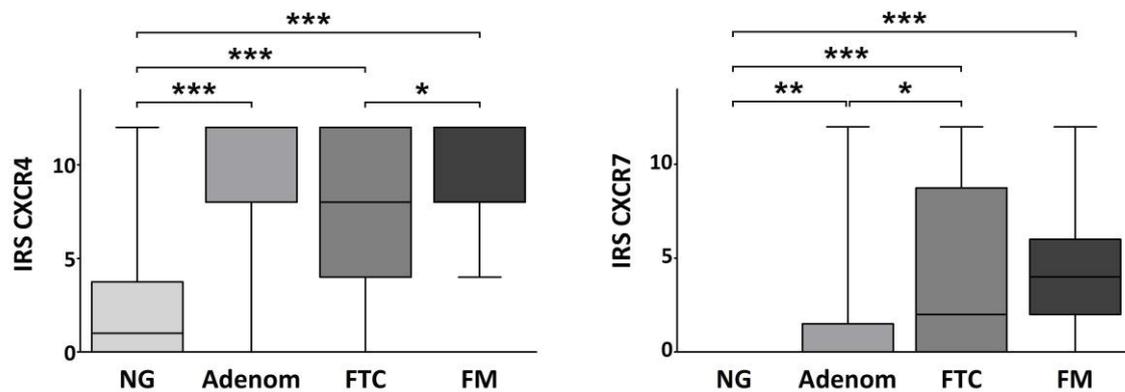
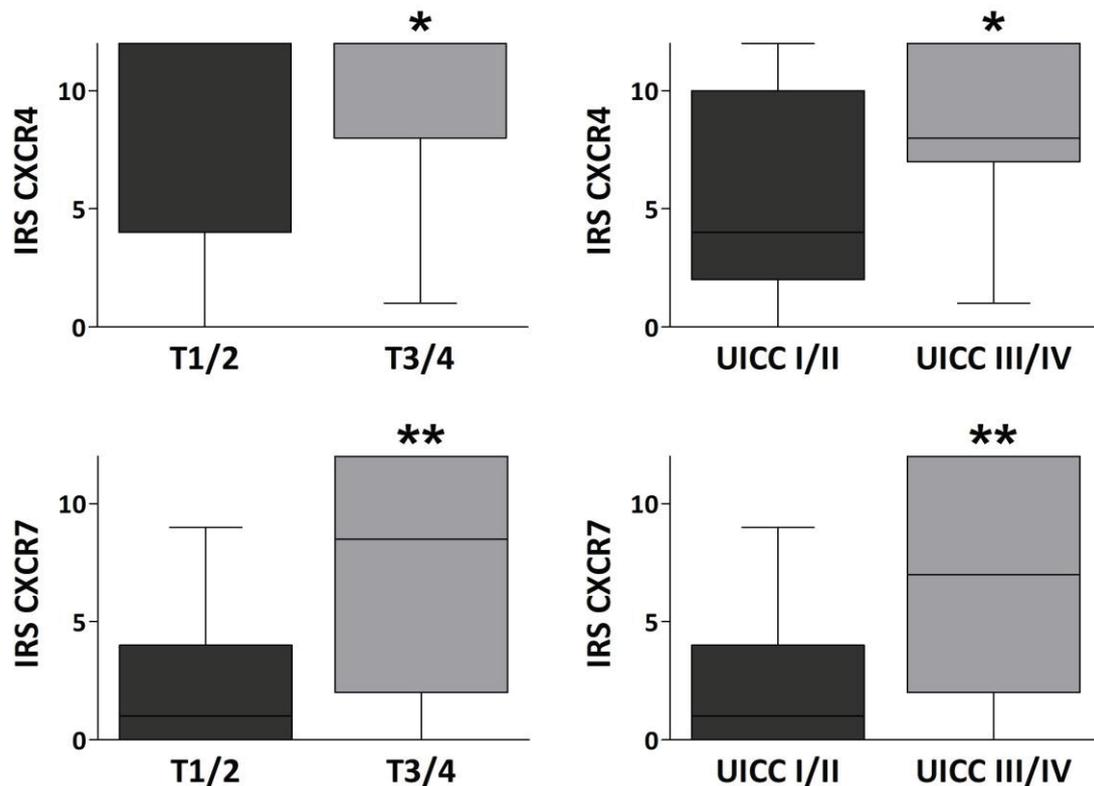


Abb. 9: Expression von CXCR4 und CXCR7 in Normal- und Tumorgewebe des FTC. Die *Box-Plots* zeigen die Expressionsstärke der CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) in follikulärem Schilddrüsenkarzinom (FTC), follikulärem Adenom, Fernmetastasen (FM) und thyroidealem Normalgewebe (NG) anhand des erhobenen Immunreaktiven *Scores* (IRS). Dargestellt ist der IRS-Median mit oberem und unterem Quartil sowie dem Expressionsmaximum und -minimum des jeweiligen Markers. Die statistische Testung erfolgte mittels parameterfreiem Mann-Whitney-U-Test. Diese Abbildung wurde bereits veröffentlicht [151]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.1.2 Assoziation mit klinisch-pathologischen Variablen

Zur Analyse eines Zusammenhangs zwischen CXCR4- und CXCR7-Expression im FTC und klinisch-pathologischen Parametern wurde für jede Variable der IRS zwischen zwei Gruppen dieses Merkmals mit Hilfe des parameterfreien Mann-Whitney-U-Testes verglichen (siehe Abbildung 10). Es zeigte sich, dass eine verstärkte CXCR4- sowie CXCR7-Expression mit größeren Tumoren einhergeht. Die Expression der Rezeptoren war im T3/4-Stadium signifikant höher, als im T1/2-Stadium (CXCR4: $p < 0,05$; CXCR7: $p < 0,01$). Zusätzlich zeigten Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium UICC III/IV eine signifikant höhere Expression von CXCR4 ($p < 0,05$) und CXCR7 ($p < 0,01$) als im Stadium UICC I/II.



Zur weiteren Validierung der Daten wurden die Patienten entsprechend ihrer Rezeptorexpression in hoch (\geq Median) und niedrig ($<$ Median) eingeteilt und durch den *Fisher's Exact Test* in den verschiedenen Merkmalen miteinander verglichen (siehe Tabelle 11). Es wurde eine signifikant höhere Expression von CXCR4 und CXCR7 in großen Tumoren (CXCR4: $p < 0,05$; CXCR7: $p < 0,05$) und fortgeschrittenem UICC-Stadium (CXCR4: $p < 0,05$; CXCR7: $p < 0,05$) nachgewiesen. Zusätzlich konnte bei einem Tumorrezidiv eine signifikant höhere Rezeptorexpression von CXCR4 ($p < 0,05$) und CXCR7 ($p < 0,05$) festgestellt werden.

Die Parameter Alter, Geschlecht, Invasivität sowie Lymphknoten- und Fernmetastasierung erwiesen sich dagegen in beiden statistischen Testungen als nicht signifikant.

Tabelle 11: Assoziation der CXCR4-/CXCR7-Expression mit klinisch-pathologischen Variablen im follikulären Schilddrüsenkarzinom. Die statistische Testung erfolgte mittels *Fisher's Exact Test*. Diese Tabelle wurde bereits veröffentlicht [151].

Variablen	CXCR4-Expression			CXCR7-Expression		
	Niedrig n = 18 (%)	Hoch n = 24 (%)	p-Wert	Niedrig n = 15 (%)	Hoch n = 25 (%)	p-Wert
Alter (MW±SD)	52,6 ±17,3	58,9 ±16,9	0,756	56,2 ±18,9	55,8 ±15,4	1,0
Geschlecht						
Männlich	5 (28)	13 (54)	0,120	3 (20)	12 (48)	0,101
Weiblich	13 (72)	11 (46)		12 (80)	13 (52)	
Tumor-Stadium						
T1/2	14 (78)	9 (38)	0,013 *	12 (80)	10 (40)	0,022 *
T3/4	4 (22)	15 (62)		3 (20)	15 (60)	
Lymphknotenmetastasierung						
N0	17 (94)	22 (92)	1,0	14 (93)	23 (92)	1,0
N1a/b	1 (6)	2 (8)		1 (7)	2 (8)	
Fernmetastasierung						
M0	16 (89)	20 (83)	0,685	13 (87)	21 (84)	1,0
M1	2 (11)	4 (17)		2 (3)	4 (16)	
UICC-Stadium						
UICC I/II	13 (72)	8 (33)	0,0278 *	11 (73)	9 (36)	0,0484 *
UICC III/IV	5 (28)	16 (67)		4 (27)	16 (64)	
Invasivität						
Minimal	11 (61)	9 (38)	0,212	10 (67)	10 (40)	0,191
Grob	7 (39)	15 (62)		5 (33)	15 (60)	
	Niedrig n = 10 (%)	Hoch n = 15 (%)	p-Wert	Niedrig n = 8 (%)	Hoch n = 16 (%)	p-Wert
Rezidiv						
Nein	9 (90)	7 (47)	0,0405 *	8 (100)	8 (50)	0,022 *
Ja	1 (10)	8 (53)		0 (0)	8 (50)	

Abkürzungen: CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; CXCR7 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7; n = Stichprobengröße; p = Probability; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; UICC = *Union internationale contre le cancer*

3.1.1.3 Assoziation mit dem Gesamtüberleben

Zur Eruiierung eines Zusammenhangs zwischen CXCR4- und CXCR7-Expression im follikulären Primärtumor und dem Patienten-*Outcome* erfolgte eine Überlebensanalyse. Die mediane Überlebenszeit der in die Studie aufgenommenen Patienten betrug 39,5 Monate bei einer Streuung von 0 bis 197 Monaten und einer *Follow-Up*-Zeit von 62 Monaten (Streuung: 0 bis 197 Monate). Angaben zum Rezidiv-freien Überleben lagen bei 26 Patienten vor. Dieses zeigte einen Median von 43 Monaten bei einer Streuung von 2 bis 137 Monaten. Während des Beobachtungszeitraumes verstarben neun Patienten.

Für eine univariate Überlebensanalyse wurde die Kohorte zunächst eingeteilt in Patienten mit niedriger ($<$ Median) und hoher (\geq Median) Rezeptorexpression. Danach wurde das Gesamt- sowie das Rezidiv-freie Überleben beider Gruppen anhand einer Kaplan-Meier-Kurve (siehe Abbildung 11) miteinander verglichen und mit Hilfe des *Log-rank* Testes statistisch evaluiert. Es zeigte sich, dass eine hohe CXCR4-Expression mit einer signifikant schlechteren Prognose einhergeht ($p = 0,0134$) (siehe Tabelle 12). Das mediane Gesamtüberleben bei hoher CXCR4-Expression lag bei 28 Monaten, während dieses bei Patienten mit einer niedrigen Expression 44 Monate betrug. Ebenso ist eine erhöhte Rezeptorexpression signifikant mit einem kürzeren Rezidiv-freien Überleben ($p = 0,0492$) assoziiert. Das mediane, Rezidiv-freie Überleben bei hoher CXCR4-Expression lag bei 29 Monaten, während Patienten mit niedriger Expression ein medianes, Rezidiv-freies *Outcome* von 54,5 Monaten aufwiesen. Auch für CXCR7 korreliert das Rezeptorexpressionslevel signifikant invers mit dem Gesamtüberleben ($p = 0,0337$) und einem höheren Risiko für ein Rezidiv ($p = 0,0369$). Der Median bei Patienten mit hoher CXCR7-Expression lag beim Gesamtüberleben bei 28 Monaten und bei Rezidiv-freiem Überleben bei 31,5 Monaten, während Patienten mit einer niedrigen Rezeptorexpression im Durchschnitt 44 Monate insgesamt und 54,5 Monate Rezidiv-frei überlebten. Zusätzlich ergab die statistische Analyse bei Patienten mit einem grob-invasivem Wachstum des follikulären Schilddrüsenkarzinoms ein signifikant kürzeres Überleben als bei minimal-invasivem Wachstum ($p = 0,0142$).

Zusammenfassend zeigten also Patienten mit hoher Rezeptorexpression beider Marker eine signifikant kürzere Gesamt- und Rezidiv-freie Überlebenszeit und eine schlechtere Prognose. CXCR4 und CXCR7 erwiesen sich damit in der univariaten Überlebensanalyse als negative prognostische Marker im FTC.

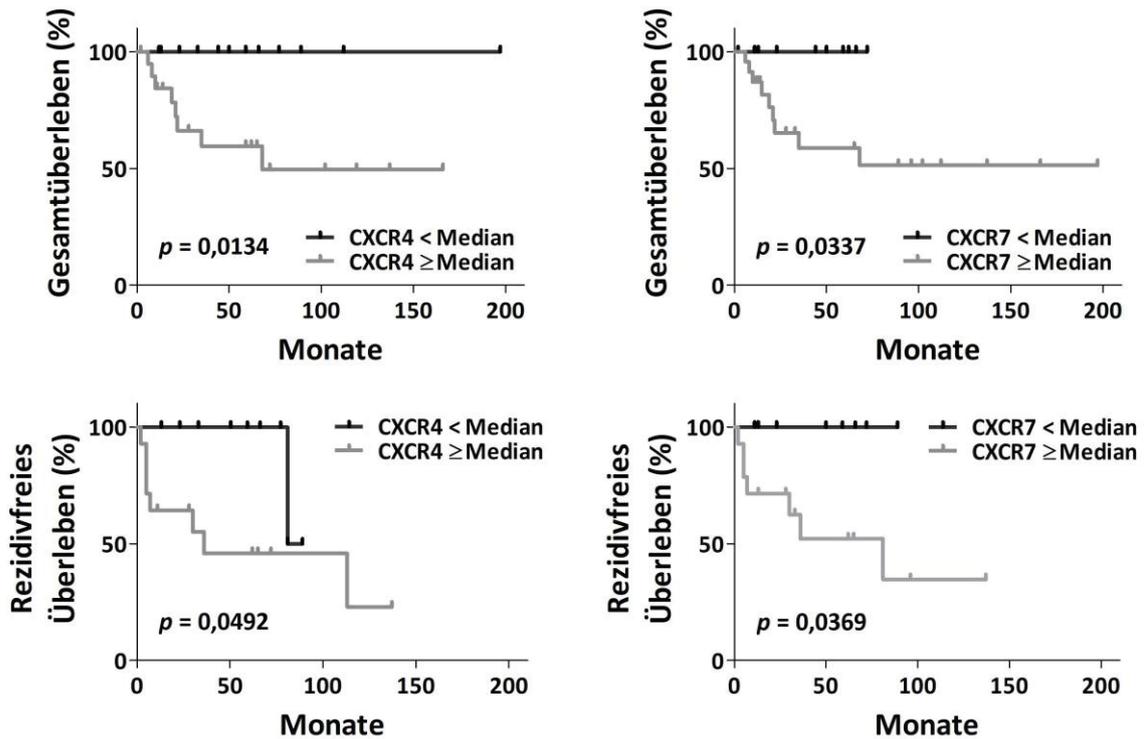


Abb. 11: Univariate Überlebensanalyse von Patienten mit FTC. Vergleich von Gesamt- und Rezidivfreiem Überleben mittels Kaplan-Meier-Kurve. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Log-rank* Test. Die Patienten wurden zuvor entsprechend dem Immunreaktiven *Score* (IRS) ihrer Rezeptorexpression der CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) im Primärtumor in hoch (\geq Median) und niedrig ($<$ Median) eingeteilt. Diese Abbildung wurde bereits veröffentlicht [151]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Für die anschließende multivariate Überlebensanalyse zur Identifikation unabhängiger Prognosefaktoren für das follikuläre Schilddrüsenkarzinom diente die Cox-Regression zur Abschätzung des Risikoquotienten (*Hazard Ratio*, HR) mit einem 95 % Konfidenzintervall (CI). Es zeigte sich, dass unter allen Variablen nur die Invasivität des Tumors ($p = 0,0446$) und ein fortgeschrittenes Alter bei Erstdiagnose ($p = 0,0098$) unabhängige, negative prognostische Marker in der Patientenkohorte waren (siehe Tabelle 12). Wegen einer fast identischen Verteilung der Patientenergebnisse bei T- und UICC-Stadium konnte eine multivariate Analyse mit beiden Variablen leider nicht durchgeführt werden. Daraufhin wurde sich für die Inklusion des UICC-Stadiums wegen seiner besseren Repräsentanz der Tumorbiologie entschieden. Ähnlich konnte das Rezidiv-freie Überleben wegen einer zu geringen Anzahl an Events nicht in die Analyse miteinbezogen werden.

Auf der Suche nach dem besten statistischen Modell für die multivariate Überlebensanalyse wurde danach ein schrittweise ablaufendes Auswahlverfahren der einzelnen Variablen verwendet, basierend auf dem *Akaike information criterion* (AIC) [150]. Die Selektion bestätigte Invasivität als zentralen Prognose-bestimmenden Faktor ($p = 0,0206$) (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Analyse des Gesamtüberlebens bei Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom
Teile dieser Tabelle wurden bereits veröffentlicht [151].

Univariate Überlebensanalyse			
Variablen	HR	95 % CI	p-Wert
Alter bei Erstdiagnose	1,814	0,487-6,765	0,375
Geschlecht	0,485	0,131-1,808	0,281
Invasivität	5,164	1,397-19,09	0,0142 *
UICC I/II vs. III/IV	2,503	0,670-9,358	0,173
CXCR4-Expression	5,846	1,442-23,69	0,0134 *
CXCR4 im Rezidiv	4,146	1,005-17,10	0,0492 *
CXCR7-Expression	4,553	1,124-18,44	0,0337 *
CXCR7 im Rezidiv	5,218	1,106-24,63	0,0369 *
Multivariate Überlebensanalyse			
Variablen	HR	95 % CI	p-Wert
Alter bei Erstdiagnose	1,066	1,016-1,120	0,0098 **
Geschlecht	1,236	0,292-5,241	0,774
Invasivität	9,173	1,055-79,76	0,0446 *
UICC I/II vs. III/IV	0,267	0,023-3,084	0,290
CXCR4-Expression	1,183	0,912-1,535	0,204
CXCR7-Expression	1,133	0,901-1,424	0,286
Multivariate Überlebensanalyse nach schrittweiser Variablenselektion			
Variablen	HR	95 % CI	p-Wert
Invasivität	6,117	1,008-1,106	0,0206 *
CXCR4-Expression	1,280	0,994-1,649	0,055

Abkürzungen: HR = Hazard Ratio; CI = Konfidenzintervall; p = Probability; UICC = Union internationale contre le cancer; CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; CXCR7 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7

Abschließend wurde eine Überlebensanalyse mittels Regressionsbaum erstellt, um die Patientengruppe mit dem höchsten Sterberisiko zu ermitteln. Der Regressionsbaum identifizierte die Kombination von hoher CXCR4-Expression im Primärtumor ($IRS > 7$) zusammen mit einem fortgeschrittenen Alter bei Erstdiagnose ($Alter > 66$ Jahre) als ungünstigste Konstellation mit einem 2,778-fach erhöhten Mortalitätsrisiko (siehe Abbildung 12). Da das Regressionsbaum-Verfahren eine Rangordnung der einzelnen Variablen bezüglich ihrer Bedeutung für das Patienten-*Outcome* ermöglicht, lässt sich außerdem feststellen, dass CXCR4 der dominantere der beiden Marker im follikulären Schilddrüsenkarzinom ist.

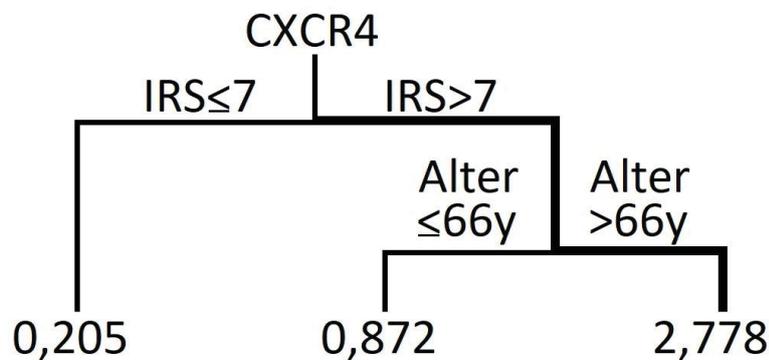


Abb. 12: Regressionsbaum-Analyse zur Ermittlung der Variablenkonstellation mit dem höchsten Sterberisiko. Dargestellt werden Untergruppen von Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom entsprechend ihrer Merkmale. Jede Kreuzung stellt einen Entscheidungspunkt dar mit einem *Cut-Off*-Wert für die jeweilige Variable. Die Zahl unter der Linie entspricht der *Hazard Ratio*. Diese Abbildung wurde bereits veröffentlicht [151].

Abkürzungen: CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; IRS = Immunreaktiver Score; y = Jahr

3.1.2 CXCR4 und CXCR7 im medullären Schilddrüsenkarzinom

Repräsentative Gewebeproben von 86 Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom wurden mit Hilfe eines bereits vorhandenen *Tissue Microarrays* hinsichtlich ihrer CXCR4- und CXCR7-Expression analysiert. Wegen einem verfrühten Abbruch des *Follow-Ups* wurden elf Patienten nicht in der Überlebensanalyse berücksichtigt. Des Weiteren war der basale, präoperative Serum-Calcitonin-Spiegel nur von 67 Patienten zugänglich, während bei acht Patienten die Tumorgenese (sporadisch oder vererbt) unbekannt war. Aus Tabelle 13 können Charakteristika der in die Studie aufgenommenen Patienten entnommen werden.

Tabelle 13: Charakteristiken der Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom
Diese Tabelle wurde bereits veröffentlicht [152].

Variablen	Patientenzahl (%)
Gesamt	86 (100)
Alter	
Median (Streuung in Jahren)	48 (6-83)
Geschlecht	
Männlich	42 (49)
Weiblich	44 (51)
Genese	
Sporadisch	40 (47)
MEN 2A	38 (44)
Unbekannt	8 (9)
Calcitonin-Basalspiegel vor Operation	
< 12 pg/ml	9 (10)
> 12 pg/ml	58 (68)
Unbekannt	19 (22)
Operationstechnik	
Hemithyreoidektomie mit unilateraler ND	11 (13) 3 (3)
Subtotale Thyreoidektomie mit bilateraler ND	7 (8) 2 (2)
Totale Thyreoidektomie mit unilateraler ND mit bilateraler ND	16 (19) 16 (19) 31 (36)

Betroffene Hälfte	
Unilateral	70 (81)
Bilateral	16 (19)
Tumor-Stadium	
T1/2	67 (78)
T3/4	19 (22)
Lymphknotenmetastasierung	
N0	43 (50)
N1a/b	43 (50)
Fernmetastasierung	
M0	68 (79)
M1	18 (21)
UICC-Stadium	
UICC I/II	41 (48)
UICC III/IV	45 (52)

Abkürzungen: MEN 2A = Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2A; ND = Neck dissection; UICC = Union internationale contre le cancer

3.1.2.1 Expression in Normal- und Tumorgewebe

Der Expressionsvergleich beider Rezeptoren im MTC erfolgte nach immunhistochemischer Färbung des TMA für CXCR4 und CXCR7 (siehe Abbildung 13). Nach Bewertung des IRS-Status wurden die Daten mit dem parameterfreien Mann-Whitney-U-Test statistisch analysiert.

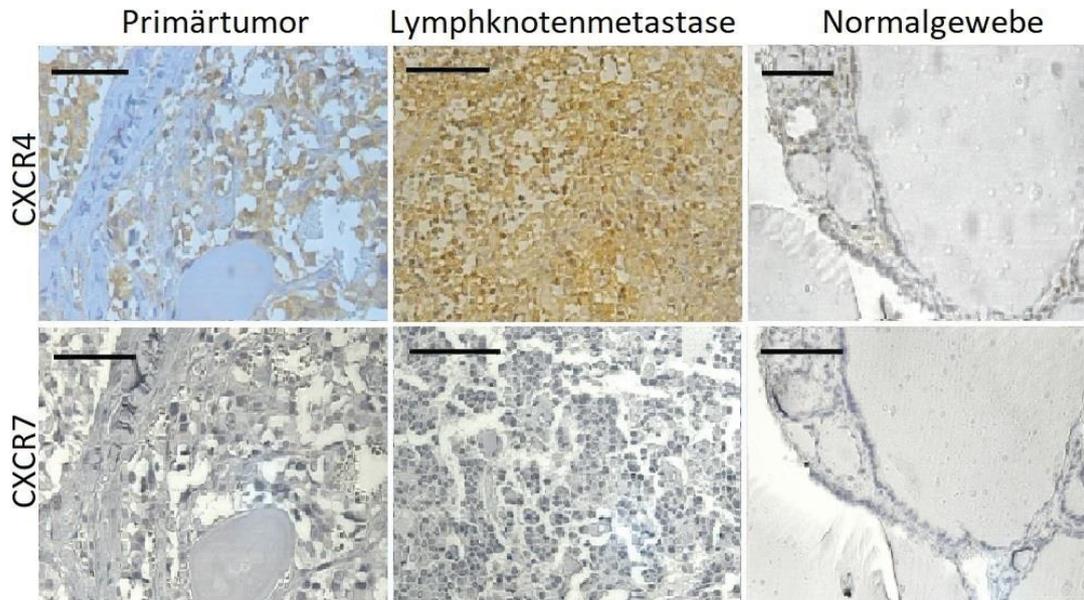


Abb. 13: Immunhistochemische Färbung des MTC-Tissue Microarrays für CXCR4 und CXCR7. Repräsentative Gewebeproben von medullärem Schilddrüsenkarzinom (MTC), Lymphknotenmetastasen und physiologischem Schilddrüsengewebe, immunhistochemisch für die CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) gefärbt. Aufgenommen mit dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Der Balken in der oberen linken Ecke entspricht 50 µm. Teile dieser Abbildung wurden bereits veröffentlicht [152].

Die Primärtumore der MTCs zeigten im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe, welches nicht angefärbt wurde, eine signifikant erhöhte CXCR4-Expression ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 14). Lymphknotenmetastasen färbten sich ebenfalls für CXCR4 signifikant stärker an, als das gesunde Schilddrüsengewebe ($p < 0,001$). Des Weiteren war die CXCR4-Expression in den Lymphknotenmetastasen zusätzlich noch signifikant höher vorhanden als im Primärtumor ($p < 0,001$). Bei der Korrelation der Rezeptorexpression von CXCR4 in den Fernmetastasen mit physiologischem Gewebe ergab sich auch hier eine signifikante Erhöhung der IRS-Werte ($p < 0,001$). Interessanterweise zeigten die MTCs nach immunhistochemischer Färbung für CXCR7 in nahezu keiner Probe eine Reaktion (siehe Abbildung 13). Nur ein Primärtumor wies eine starke Färbung für CXCR7 auf.

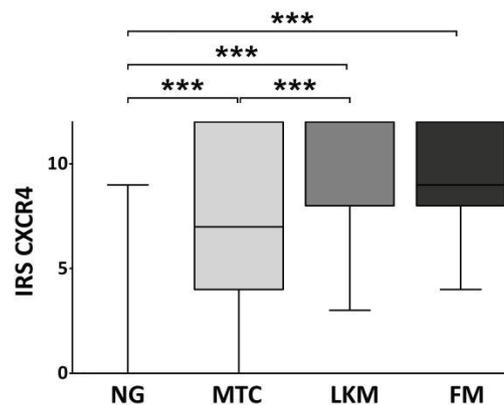


Abb. 14: Expression von CXCR4 in Normal- und Tumorgewebe des MTC. Die *Box-Plots* zeigen die Expressionsstärke vom CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) im medullären Schilddrüsenkarzinom (MTC), Lymphknotenmetastasen (LKM), Fernmetastasen (FM) und korrespondierendem Normalgewebe (NG) anhand des erhobenen Immunreaktiven *Scores* (IRS). Dargestellt ist der IRS-Median mit oberem und unterem Quartil sowie dem Expressionsmaximum und -minimum des jeweiligen Markers. Die statistische Testung erfolgte mittels parameterfreiem Mann-Whitney-U-Test. Diese Abbildung wurde bereits veröffentlicht [152]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.2.2 Assoziation mit klinisch-pathologischen Variablen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen einer erhöhten CXCR4-Expression im MTC und klinisch-pathologischen Variablen zu identifizieren, wurde der IRS für jedes Merkmal anhand des parameterfreien Mann-Whitney-U-Testes statistisch ausgewertet.

Die Analyse zeigte, dass eine verstärkte CXCR4-Expression mit größeren Tumoren ($p < 0,01$), Lymphknotenmetastasierung ($p < 0,001$) und Fernmetastasierung ($p < 0,01$) assoziiert war (siehe Abbildung 15). Zusätzlich zeigte sich im Vergleich zu UICC I/II-Stadien eine statistisch signifikante Überexpression des Rezeptors in den fortgeschrittenen Tumorstadien UICC III/IV ($p < 0,001$). Auch bei einer sporadischen Genese des Tumors ($p < 0,001$) sowie bei fortgeschrittenem Alter bei Erstdiagnose ($p < 0,05$) war der IRS für CXCR4 signifikant erhöht.

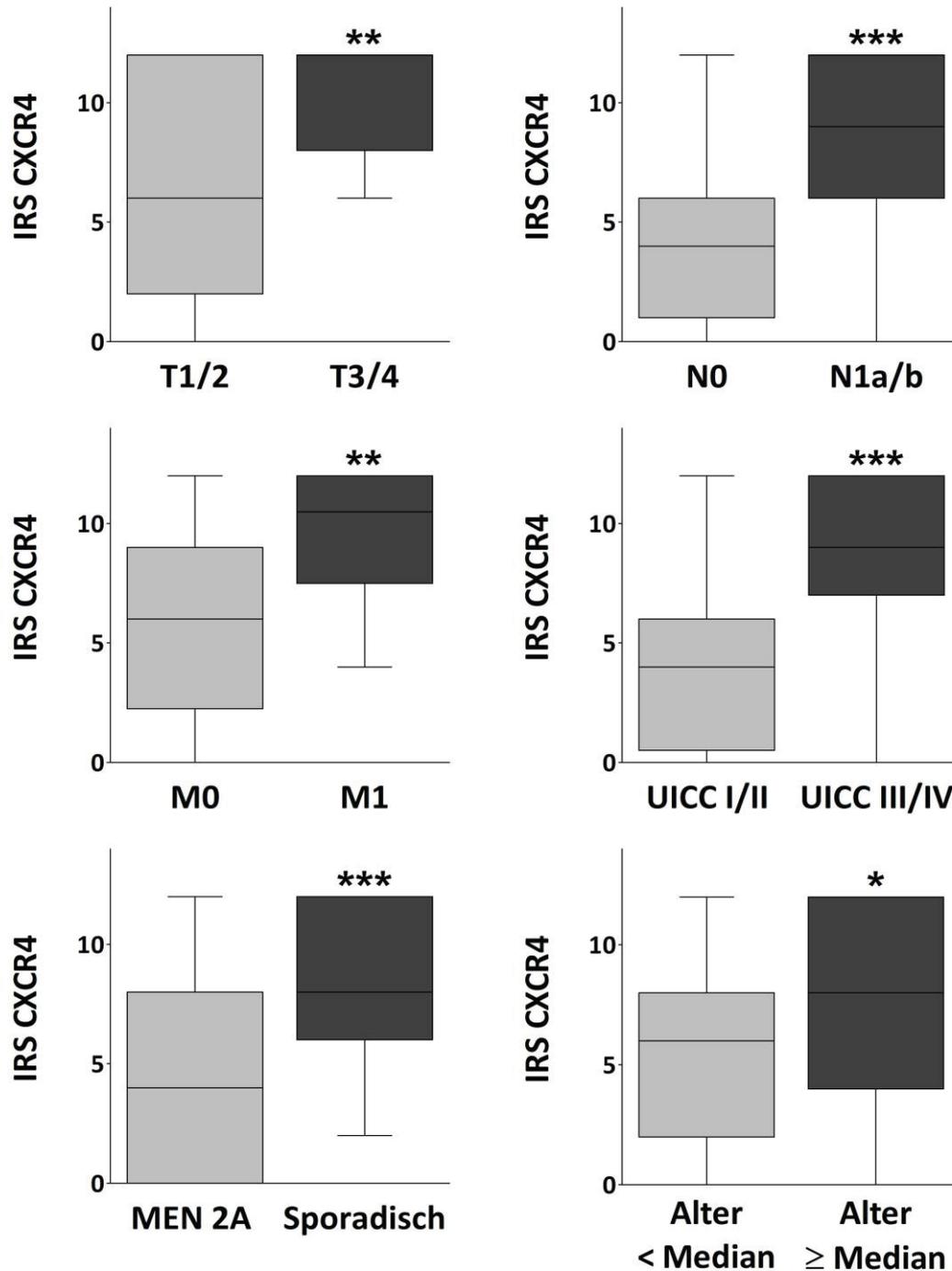


Abb. 15: Vergleich der CXCR4-Rezeptorexpression im MTC-Primärtumor mit klinisch-pathologischen Variablen. Die *Box-Plots* zeigen die Expressionsstärke des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) im medullären Primärtumor (MTC) anhand des erhobenen Immunreaktiven Scores (IRS), aufgeteilt nach TNM-Status, UICC-Stadium, Tumorgenese und Alter. Dargestellt ist der IRS-Median mit oberem und unterem Quartil sowie dem Expressionsmaximum und -minimum des Markers. Die statistische Testung erfolgte mittels parameterfreiem Mann-Whitney-U-Test. Teile dieser Abbildung wurden bereits veröffentlicht [152]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Nachdem die Patienten entsprechend ihrer Rezeptorexpression in hoch (\geq Median) und niedrig ($<$ Median) eingeteilt worden waren, wurden die klinisch-pathologischen Parameter mit dem *Fisher's Exact Test* zur weiteren Verifizierung der Signifikanzen miteinander verglichen (siehe Tabelle 14). Es zeigte sich die Validierung einer signifikant höheren Expression von CXCR4 in großen Tumoren ($p < 0,001$), Lymphknotenmetastasen ($p < 0,001$), Fernmetastasen ($p < 0,001$), fortgeschrittenem UICC-Stadium ($p < 0,001$) und sporadischer Tumorgenese ($p < 0,001$). Darüber hinaus konnte jedoch keine signifikant höhere CXCR4-Rezeptorexpression bei höherem Alter bei Erstdiagnose festgestellt werden.

Die Merkmale Geschlecht und basaler, präoperativer Calcitonin-Spiegel erwiesen sich indessen in beiden statistischen Testungen als nicht signifikant. Außerdem konnte die Rezeptorexpression von CXCR7 im MTC wegen der niedrigen Expressionsrate im MTC nicht mit klinisch-pathologischen Markern korreliert werden.

Zusammenfassend belegt die Auswertung des IRS im medullären Schilddrüsenkarzinom einen Gradienten der CXCR4-Expression vom thyroidalen Normalgewebe über den Primärtumor hin zu den korrespondierenden Metastasen.

Tabelle 14: Assoziation der CXCR4-Expression mit klinisch-pathologischen Variablen im medullären Schilddrüsenkarzinom. Die statistische Testung erfolgte mittels *Fisher's Exact Test*. Diese Tabelle wurde bereits veröffentlicht [152].

Variablen	CXCR4-Expression		
	Niedrig n = 27 (%)	Hoch n = 59 (%)	p-Wert
Alter (MW±SD)	35,0 ±19,3	50,0 ±18,7	0,163
Geschlecht			
Männlich	10 (37)	32 (54)	0,167
Weiblich	17 (63)	27 (46)	
Tumor-Stadium			
T1/2	27 (100)	40 (68)	< 0,001 ***
T3/4	0 (0)	19 (32)	
Lymphknotenmetastasierung			
N0	26 (96)	17 (29)	< 0,001 ***
N1a/b	1 (4)	42 (71)	
Fernmetastasierung			
M0	27 (100)	41 (69)	< 0,001 ***
M1	0 (0)	18 (31)	
UICC-Stadium			
UICC I/II	26 (96)	15 (25)	< 0,001 ***
UICC III/IV	1 (4)	44 (75)	
	Niedrig n = 23 (%)	Hoch n = 44 (%)	p-Wert
Calcitonin-Basalspiegel vor Operation			
Normal	5 (22)	4 (9)	0,256
Erhöht	18 (78)	40 (91)	
	Niedrig n = 26 (%)	Hoch n = 52 (%)	p-Wert
Genese			
Sporadisch	23 (88)	17 (33)	< 0,001 ***
MEN 2A	3 (12)	35 (67)	

Abkürzungen: CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4; n = Stichprobengröße; p = Probability; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; UICC = *Union internationale contre le cancer*; MEN 2A = Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2A

3.1.2.3 Assoziation mit dem Gesamtüberleben

Anschließend wurde zur Erforschung der prognostischen Relevanz von CXCR4 im medullären Schilddrüsenkarzinom eine Überlebensanalyse durchgeführt. Die mediane Gesamtüberlebenszeit der untersuchten Patientenkohorte betrug 170 Monate bei einer Streuung von 5 bis 287 Monaten und einer *Follow-Up*-Zeit von 191 Monaten (Streuung 5 bis 287 Monate). 19 Patienten verstarben während des Beobachtungszeitraumes.

Für die Assoziation der CXCR4-Expression im MTC und dem Gesamtüberleben der Patienten wurde die Kohorte zunächst für eine univariate Überlebensanalyse in Patienten mit niedriger ($<$ Median) und hoher (\geq Median) Rezeptorexpression eingeteilt. Danach wurde mit Hilfe einer Kaplan-Meier-Kurve (siehe Abbildung 16) das Gesamtüberleben beider Gruppen miteinander verglichen und anhand des *Log-rank* Testes statistisch ausgewertet. Die Analyse zeigte, dass eine hohe CXCR4-Expression mit einem signifikant kürzerem Überleben einhergeht ($p = 0,003$) (siehe Tabelle 15). Das mediane Gesamtüberleben bei hoher Rezeptorexpression lag bei 154 Monaten, während Patienten mit einer niedrigen Expression ein medianes Überleben von 184 Monaten hatten. Außerdem zeigte sich, dass weitere klinisch-pathologische Variablen, wie fortgeschrittenes Alter bei Erstdiagnose ($p = 0,005$), größere Tumore ($p = 0,032$), Auftreten von Metastasen (N1a/b: $p < 0,001$; M1: $p < 0,001$) und sporadische Tumorgenese ($p < 0,001$) negativ mit dem Überleben assoziiert sind. Damit offenbarte sich CXCR4 im MTC in der univariaten Überlebensanalyse als negativer prognostischer Marker.

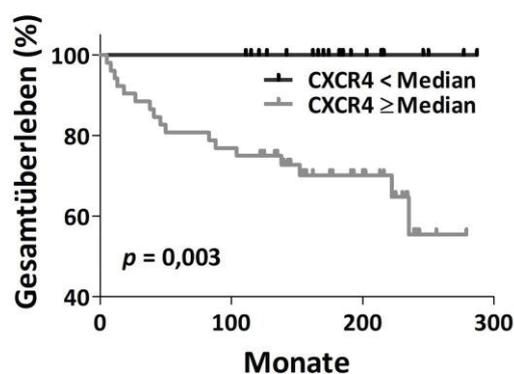


Abb. 16: Univariate Überlebensanalyse von Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom. Vergleich vom Gesamtüberleben mittels Kaplan-Meier-Kurve. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Log-rank* Test. Die Patienten wurden zuvor entsprechend dem Immunreaktiven *Score* ihrer Expression des CXCR4-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) im Primärtumor in hoch (\geq Median) und niedrig ($<$ Median) eingeteilt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabelle 15: Analyse des Gesamtüberlebens bei Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom
Diese Tabelle wurde bereits veröffentlicht [152].

Univariate Überlebensanalyse			
Variablen	HR	95 % CI	p-Wert
Alter bei Erstdiagnose	3,740	1,477-9,469	0,005 **
Geschlecht	1,893	0,749-4,785	0,178
T1/2 vs. T3/4	3,641	1,115-11,89	0,032 *
N0 vs. N1a/b	4,773	1,879-12,13	0,001 ***
M0 vs. M1	21,45	6,304-72,98	< 0,001 ***
Sporadisch vs. MEN 2A	6,289	2,193-18,03	< 0,001 ***
Calcitonin-Basalspiegel	3,688	0,856-15,89	0,080
CXCR4-Expression	4,474	1,671-11,98	0,003 **
Multivariate Überlebensanalyse			
Variablen	HR	95 % CI	p-Wert
Alter bei Erstdiagnose	3,166	0,089-1,116	0,074
Geschlecht	0,953	0,328-2,766	0,930
T1/2 vs. T3/4	1,074	0,360-3,202	0,898
N0 vs. N1a/b	2,193	0,401-11,987	0,365
M0 vs. M1	2,219	0,558-8,823	0,258
Sporadisch vs. MEN 2A	4,523	0,507-40,30	0,176
Calcitonin-Basalspiegel	0,946	0,313-2,860	0,922
CXCR4-Expression	1,045	0,867-1,261	0,643
Multivariate Überlebensanalyse nach schrittweiser Variablenselektion			
Variablen	HR	95 % CI	p-Wert
M0 vs. M1	11,47	2,941-44,71	< 0,001 ***

Abkürzungen: HR = Hazard Ratio; CI = Konfidenzintervall; p = Probability; MEN 2A = Multiple Endokrine Neoplasie Typ 2A; CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4

Schließlich erfolgte bei der multivariaten Überlebensanalyse eine Cox-Regression für die Abschätzung des Risikoquotienten (*Hazard Ratio*) mit einem 95 % Konfidenzintervall (*Confidence interval*) zur Identifikation unabhängiger Prognosefaktoren für das medulläre Schilddrüsenkarzinom (siehe Abbildung 17). Es zeigte sich, dass keine getestete Variable als unabhängiger prognostischer Marker in der Patientenkohorte fungierte (siehe Tabelle 15).

Bei der darauffolgenden Suche nach dem besten statistischen Modell wurde ein schrittweise ablaufendes Auswahlverfahren der einzelnen Variablen basierend auf dem *Akaike information criterion* verwendet [150]. Es konnte lediglich die Fernmetastasierung als signifikanter Prognose-bestimmender Faktor ($p < 0,001$) ermittelt werden (siehe Tabelle 15). Die multivariate Überlebensanalyse offenbarte damit Fernmetastasierung als unabhängigen, negativen prognostischen Marker im MTC.

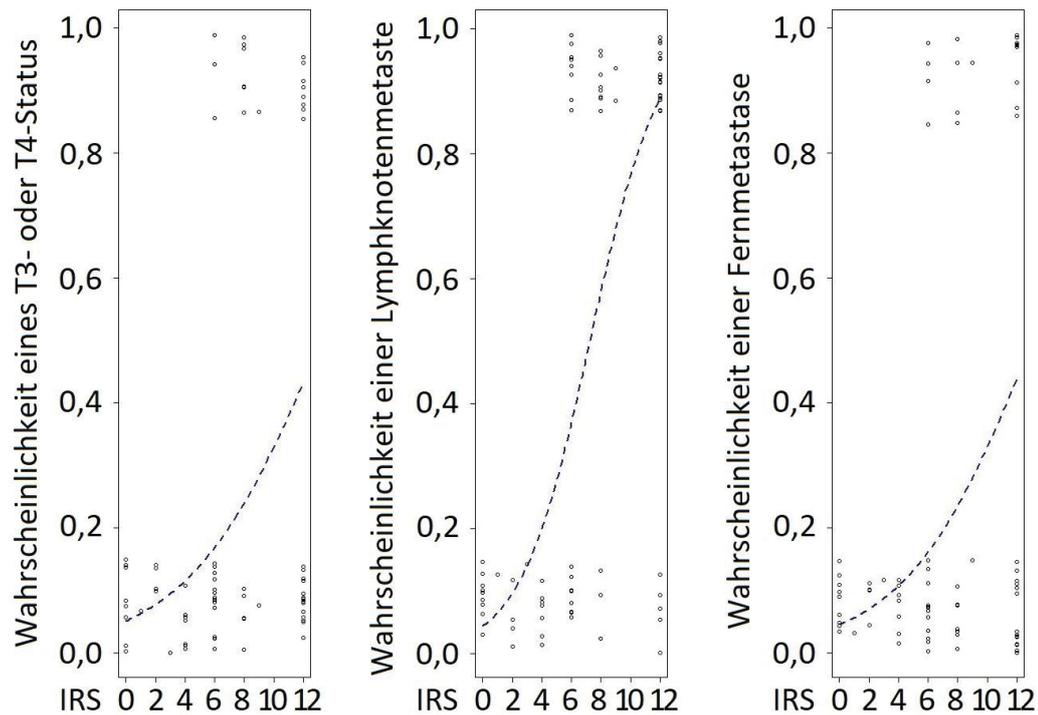


Abb. 17: Regressionsanalyse nach Cox. Die Graphik verdeutlicht eine Korrelation zwischen steigender CXCR4-Expression in MTC und der erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit eines fortgeschrittenen Tumorstadiums sowie metastatischem Phänotyp. Diese Abbildung wurde bereits veröffentlicht [152].

3.2 Struktureller Nachweis von CXCR4 und CXCR7 in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

3.2.1 Proteinexpression

Der Rezeptor-Status der Zelllinien für CXCR4 und CXCR7 wurde auf Proteinebene mittels *Western Blot* beurteilt. Abbildung 18 zeigt die Proteinexpression der CXCR4- und CXCR7-Rezeptoren, die in allen fünf Zelllinien deutlich nachgewiesen werden konnte. GAPDH diente dabei als Ladungskontrolle.

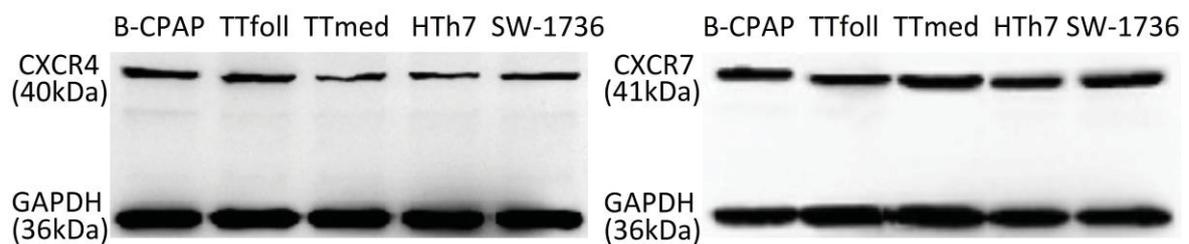


Abb. 18: Proteinexpression der CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien im *Western Blot*. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) fungierte als Ladungskontrolle. Teile dieser Abbildung wurden bereits veröffentlicht [151, 152].

3.2.2 Rezeptorvisualisierung

Zur Visualisierung von CXCR4- und CXCR7-Rezeptoren wurde eine immunzytochemische Färbung der Zelllinien mit Hilfe von *Alexa Fluor 488* als fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper durchgeführt. DAPI wurde zur Kernfärbung eingesetzt, während Isotypkontrollen (MOPC-21 und X0903) die Antikörper-Spezifität bestätigten. Nach der Färbung zeigte sich sowohl eine deutliche Expression von CXCR4 (siehe Abbildung 19) als auch von CXCR7 (siehe Abbildung 20) in den fünf untersuchten Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien. Die mitgeführten Isotypkontrollen waren gänzlich negativ.

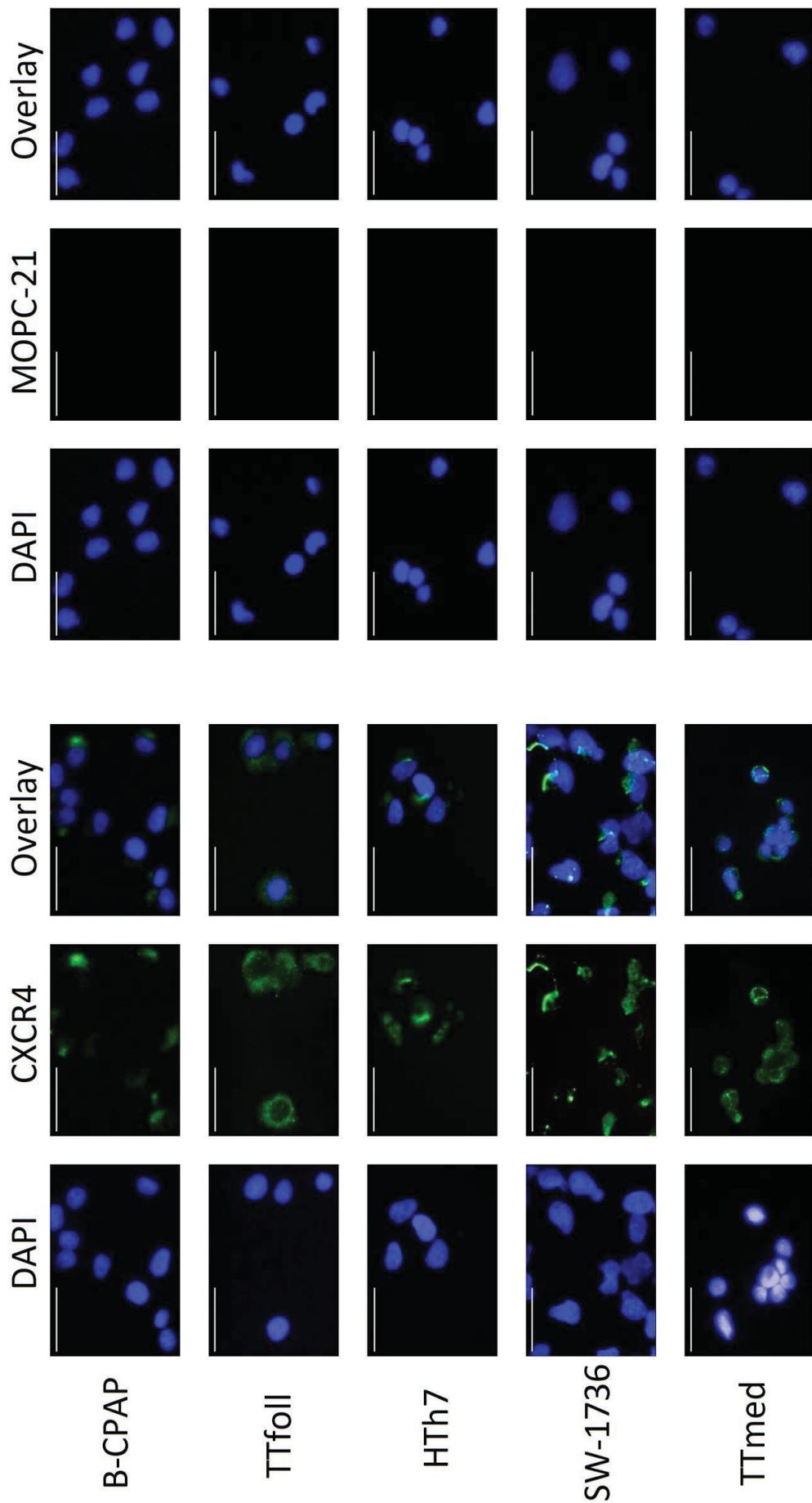


Abb. 19: Immunocytochemische Färbung der Karzinomzellen für CXCR4. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurde zur Visualisierung des Zellkerns eingesetzt, während *Alexa Fluor* 488 als fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper die Expression des CXCR4-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) auf der Zelloberfläche der Schilddrüsenkarzinomzellen veranschaulicht. Ein *Overlay* beider Bilder bestätigt die Lokalisation des Rezeptors. Mitgeführte Isotypkontrollen (MOPC-21) zeigten sich negativ. Die Bilder wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Balken in der oberen, linken Ecke entspricht 25 µm. Teile dieser Abbildung wurden bereits veröffentlicht [151, 152].

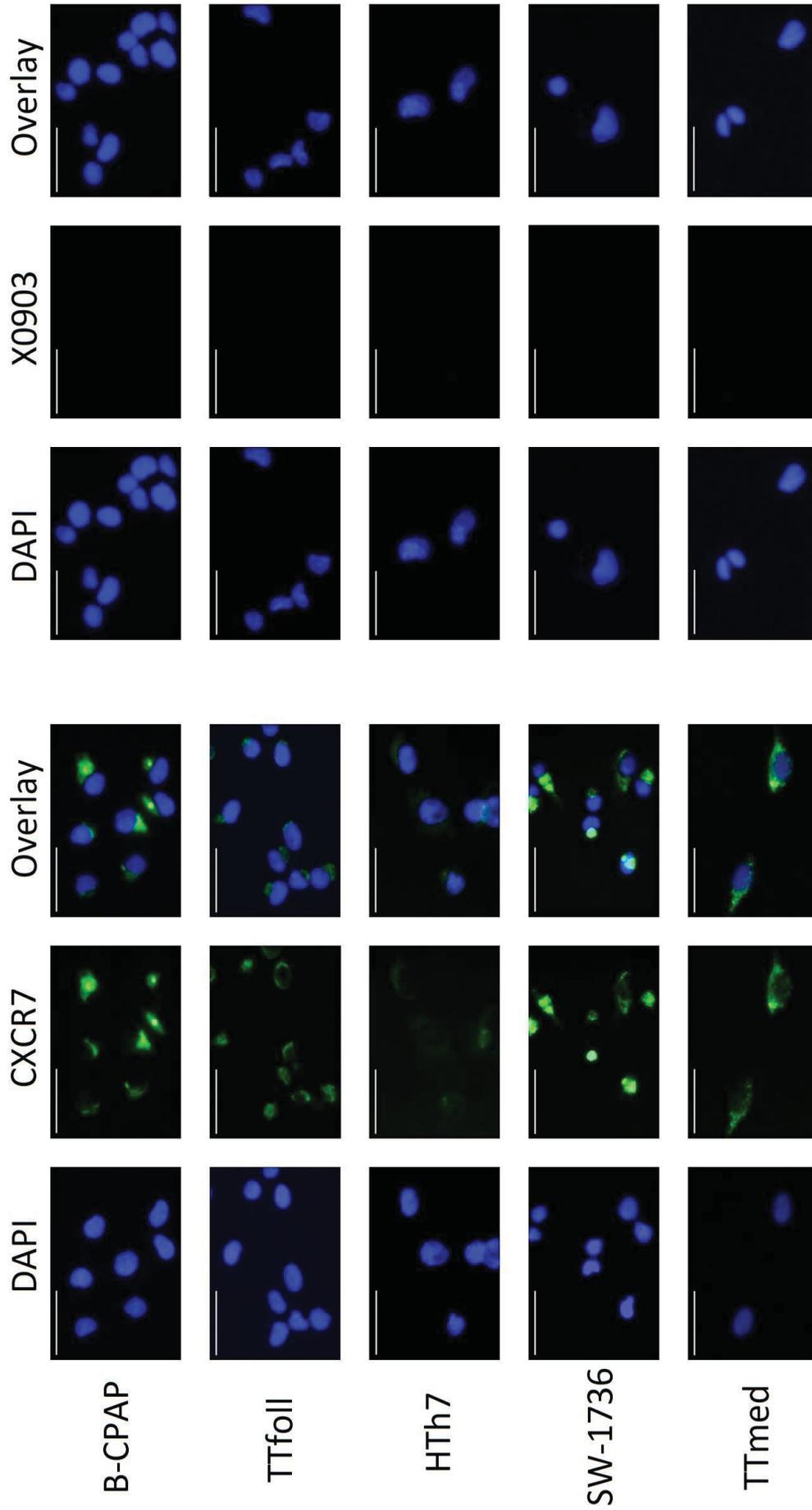


Abb. 20: Immunocytochemische Färbung der Karzinomzellen für CXCR7. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurde zur Visualisierung des Zellkerns eingesetzt, während *Alexa Fluor* 488 als fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper die Expression des CXC-Motiv-Chemokininrezeptors 7 (CXCR7) auf der Zelloberfläche der Schilddrüsenkarzinomzellen veranschaulicht. Ein *Overlay* beider Bilder bestätigt die Lokalisation des Rezeptors. Mitgeführte Isotypkontrollen (X0903) zeigten sich negativ. Die Bilder wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen. Der Balken in der oberen, linken Ecke entspricht 25 µm. Teile dieser Abbildung wurden bereits veröffentlicht [151, 152].

3.3 Funktionelle Auswirkung der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Schilddrüsenkarzinomen *in vitro*

3.3.1 Veränderungen der Zellinvasivität

Für die Untersuchung der funktionellen Auswirkung der Achse in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien wurden zunächst Veränderungen der Zellinvasivität mit Hilfe des *Invasionsassays* quantifiziert. Dieser lässt Rückschlüsse über die Auswirkung CXCL12-gesteuerter Invasivität und die Rolle der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 im Metastasierungsprozess zu. Dafür wurden die Schilddrüsenkarzinomzellen mit den spezifischen *Compounds* AMD3100, WZ811 und rh-SDF1 α (CXCL12) in verschiedenen Konzentrationen behandelt (siehe Tabelle 2) und anhand des *Invasionsassays* ausgewertet. Als Kontrollen dienten die jeweiligen Lösungsmittel in äquimolaren Mengen der jeweils höchsten *Compound*-Konzentration. Invadierende Zellen wurden anschließend in fünf Gesichtsfeldern von mindestens drei unterschiedlichen Membranen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten bei einer 200-fachen Vergrößerung ausgezählt und mit dem parameterfreien Mann-Whitney-U-Test ausgewertet.

Es zeigte sich, dass die Behandlung der papillären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie B-CPAP mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 eine signifikante Reduktion der Tumorzellinvasivität ($p < 0,001$ für 100 nM und 1 μ M) *in vitro* zur Folge hatte, während interessanterweise bei WZ811 eine nicht-signifikante Abnahmetendenz zu beobachten war (siehe Abbildung 21). Bei der Stimulation mit dem Rezeptor-Agonisten rh-SDF1 α konnte sowohl für die niedrige Konzentration 10 nM ($p < 0,05$) als auch für die hohe Konzentration 100 nM ($p < 0,01$) des *Compounds* eine signifikant erhöhte Zahl invadierter Zellen nachgewiesen werden. Follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen der Linie TTfoll reagierten auf AMD3100 ebenfalls mit einer signifikanten Minderung invadierender Zellen ($p < 0,001$ für 100 nM; $p < 0,01$ für 1 μ M). Zusätzlich zeigte sich bei einer Behandlung mit WZ811 eine statistisch signifikante Reduktion der Invasivität ($p < 0,001$ für beide Konzentrationen). Rh-SDF1 α dagegen führte zu einer signifikanten Zunahme der Invasivität ($p < 0,01$ für 10 nM; $p < 0,001$ für 100 nM). Die Invasivität der anaplastischen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie HTh7 erwies sich nur bei den höheren Konzentrationen von AMD3100 und WZ811 signifikant erniedrigt ($p < 0,05$ für 100 nM; $p < 0,01$ für 1 μ M), während bei Behandlung mit rh-SDF1 α für beide Konzentrationen ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen war ($p < 0,05$ für 10 nM; $p < 0,01$ für 100 nM). Die ebenfalls

undifferenzierte, anaplastische SW-1736-Zelllinie reagierte für AMD3100 und WZ811 in beiden Konzentrationen mit einer signifikanten Abnahme ($p < 0,05$) der Invasivität. Eine Steigerung erwirkte dagegen rh-SDF1 α in beiden Konzentrationen ($p < 0,01$). Bei den medullären Schilddrüsenkarzinomzellen (TTmed) führte die höhere Konzentration von AMD3100 zu einer signifikanten Reduktion einer Invasion ($p < 0,01$), während dies bei WZ811 für beide Konzentration nachweisbar war ($p < 0,05$ für 100 nM; $p < 0,01$ für 1 μ M). Rh-SDF1 α induzierte auch hier eine signifikante Zunahme der Invasivität ($p < 0,001$ für 10 nM; $p < 0,05$ für 100 nM).

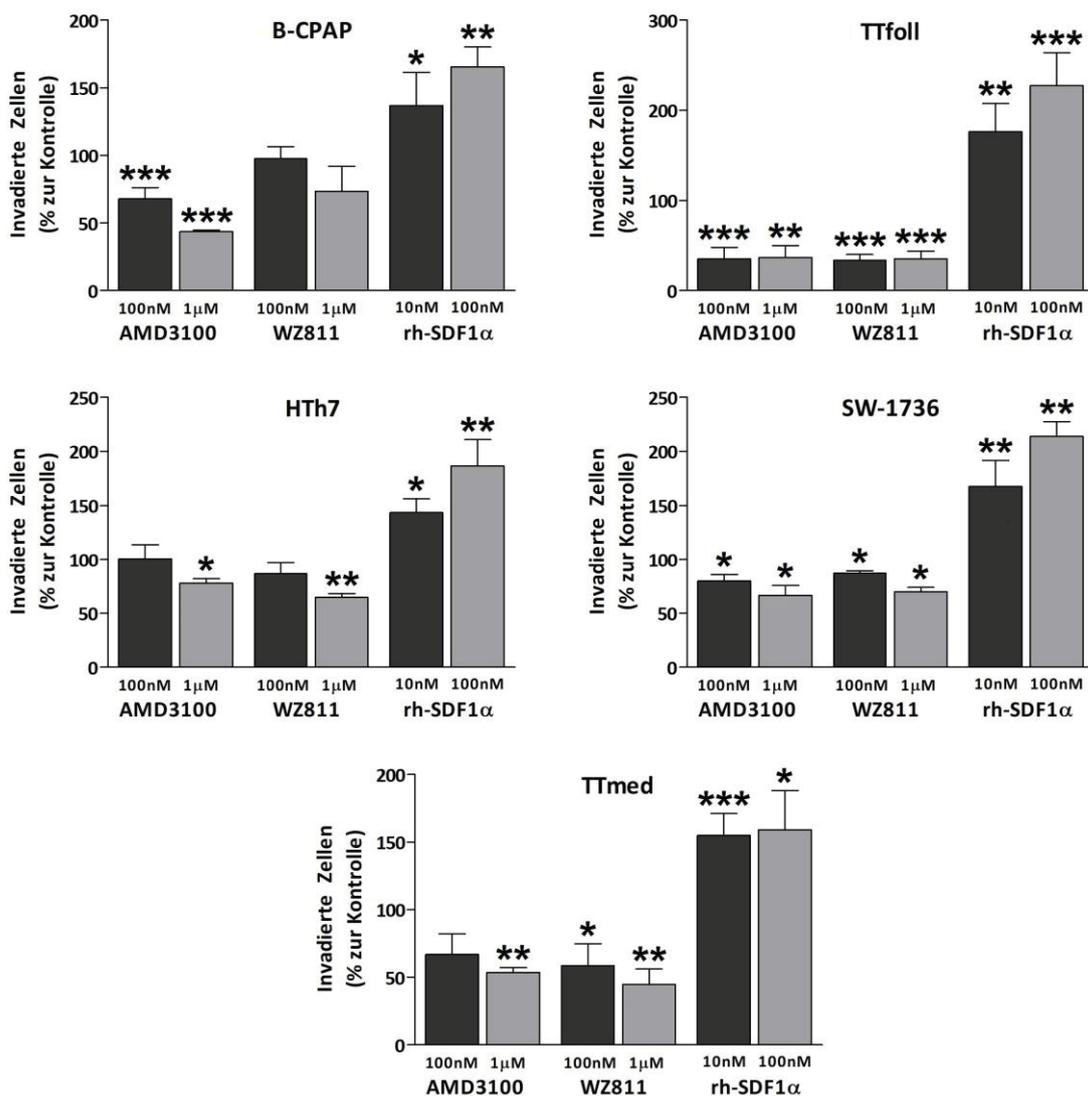


Abb. 21: Veränderungen der Zellinvasivität nach Behandlung mit spezifischen Compounds. Das Balkendiagramm zeigt Mittelwert und Standardabweichung der in die Matrigel-Membran invadierten Schilddrüsenkarzinomzellen nach Behandlung mit AMD3100, WZ811 und rh-SDF1 α in unterschiedlichen Konzentrationen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Invasivität wird in Relation zu einer Kontrollprobe dargestellt. Teile dieser Abbildung wurden bereits veröffentlicht [151, 152]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.2 Zellzyklusveränderungen

Um potenzielle Auswirkungen der *Compounds* AMD3100, WZ811 und rh-SDF1 α auf die Proliferation der Karzinomzellen zu untersuchen, wurde eine Zellzyklusanalyse mittels *Fluorescence-activated cell sorting* nach Propidiumiodid-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden dafür zunächst 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen *Compounds* behandelt (siehe Tabelle 2) und nach FACS mit dem parameterfreien Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Die Kontrollen wurden in äquimolaren Mengen des jeweiligen Lösungsmittels der jeweils höchsten *Compound*-Konzentration mitgeführt.

Die statistische Auswertung zeigte im Vergleich zu den Kontrollen einen signifikanten Effekt auf die Zellzyklusaktivität der Tumorzellen nach Behandlung mit rh-SDF1 α (siehe Abbildung 22). Die papillären Schilddrüsenkarzinomzellen (B-CPAP) reagierten in der höheren Konzentration (100 ng/ml rh-SDF1 α) mit einem signifikanten Abfall der Zellzahl in der G₁-Phase ($p < 0,05$), während es sowohl in der S-Phase ($p < 0,05$ bei 100 ng/ml rh-SDF1 α) als auch in der G₂/M-Phase des Zellzyklus zu einem signifikanten Anstieg der Zellpopulation kam ($p < 0,05$ für beide Konzentrationen). Eine signifikante Reduktion der Zellen in der G₁-Phase zeigte sich auch in der folliculären Zelllinie TTfol ($p < 0,05$ für beide Konzentrationen). Auf die Inkubation mit 100 ng/ml rh-SDF1 α erfolgte zusätzlich eine signifikante Zunahme der Zellzahl in der S- und G₂/M-Phase (jeweils $p < 0,05$). Anaplastische Schilddrüsenkarzinomzellen der HTh7-Zelllinie dagegen zeigten schon bei einer Konzentration von 10 ng/ml rh-SDF1 α eine signifikante Minderung der Zellquantität ($p < 0,01$) in der G₁-Phase. Für 100 ng/ml rh-SDF1 α konnte eine Signifikanz von $p < 0,05$ ermittelt werden. In der G₂/M-Phase stieg bei beiden Konzentrationen die Population signifikant an ($p < 0,05$), während sich in der S-Phase keine Änderungen ergaben. Kongruent dazu erwies sich die Zellzahl der zweiten anaplastischen Zelllinie SW-1736 in der G₁-Phase sowohl bei Inkubation mit der niedrigeren *Compound*-Konzentration ($p < 0,05$) als auch der höheren ($p < 0,01$) signifikant vermindert. Eine signifikante Erhöhung zeigte sich zudem in der S-Phase ($p < 0,05$) und der G₂/M-Phase ($p < 0,01$) für 100 ng/ml rh-SDF1 α . Abschließend demonstrierten die medullären Tumorzellen der Zelllinie TTmed eine Signifikanz für beide Konzentrationen in der G₁-Phase (jeweils $p < 0,05$) durch Reduktion und in der G₂/M-Phase (jeweils $p < 0,05$) durch Steigerung der Zellpopulation. Die S-Phase zeigte keine signifikante Veränderung.

Zusammenfassend verursachte rh-SDF1 α in allen Tumorzelllinien unabhängig von der Differenzierung eine Zellzyklusaktivierung mit signifikant erhöhter Zellpopulation in der G₂/M-Phase sowie Abnahme der Zellpopulation in der G₁-Phase. Die Inkubation der Zellen mit den CXCR4-Antagonisten AMD3100 und WZ811 initiierte dagegen keine signifikanten Zellzyklusveränderungen in den Zellpopulationen (Daten nicht gezeigt).

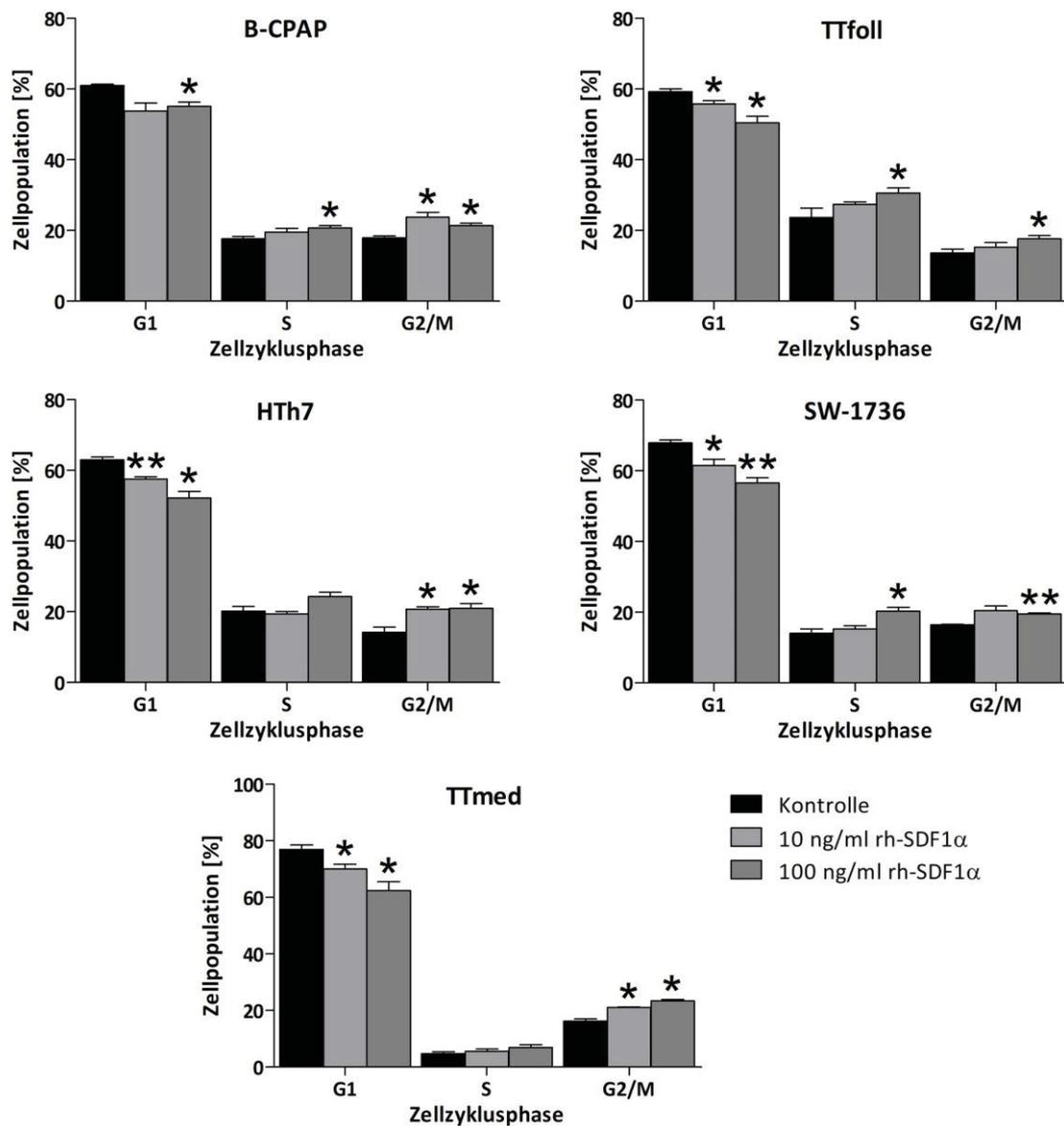


Abb. 22: Zellzyklusanalyse der Schilddrüsenkarzinomzellen mittels FACS nach Stimulation mit rh-SDF1 α . Das Balkendiagramm zeigt Mittelwert und Standardabweichung (in Prozent) der mittels *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) der jeweiligen Zellzyklusphase (G₁, S und G₂/M) zugeordneten Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von rh-SDF1 α sowie einer Kontrolle aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Teile dieser Abbildung wurden bereits veröffentlicht [151, 152]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.3 Wirkung von CXCL12 auf die Expression EMT-spezifischer Gene

Zur Evaluation einer fraglichen Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition nach Behandlung der Zellen mit CXCL12 (rh-SDF1 α), wurden Veränderungen in der Genexpression EMT-assoziiierter Marker untersucht. Mittels qPCR wurden Unterschiede der *Messenger RNA* (mRNA)-Expression dieser Zielgene in Zellen mit und ohne rh-SDF1 α -Stimulation quantifiziert und mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode in Relation zu einem Referenzgen (GAPDH) gesetzt. Zu den untersuchten Zielgenen gehörten das *Bone marrow stromal cell antigen 2* (BST2), der *Fibroblast growth factor 9* (FGF9), das *Twist homolog 1* (Twist), der *Snail family transcriptional repressor 1* (SNAI1), Vimentin und das Adhäsionsprotein E-Cadherin. GAPDH diene als *housekeeping*-Gen. Die ermittelten Daten wurden anschließend mit dem parameterfreien Mann-Whitney-U-Test analysiert.

Die papillären B-CPAP-Zellen zeigten nach Inkubation mit rh-SDF1 α deutliche Expressionsunterschiede im Vergleich zur Kontrolle. BST2 ($p < 0,001$), FGF9 ($p < 0,01$), Twist ($p < 0,05$) und Vimentin ($p < 0,01$) wurden signifikant hinaufreguliert, während E-Cadherin ($p < 0,05$) runterreguliert wurde (siehe Abbildung 23). SNAI1 zeigte keine relevante Veränderung. Ein Anstieg EMT-assoziiierter Genexpression erfolgte auch in der follikulären Zelllinie TTfol. BST2 ($p < 0,05$), FGF9 ($p < 0,05$), SNAI1 ($p < 0,01$), Twist ($p < 0,05$) und Vimentin ($p < 0,01$) wurden nach Behandlung mit rh-SDF1 α signifikant höher exprimiert als in den Kontrollen. E-Cadherin ($p < 0,01$) dagegen erwies sich als erniedrigt. Anaplastische HTh7-Tumorzellen regulierten nur BST2 ($p < 0,001$), FGF9 ($p < 0,05$) und Vimentin ($p < 0,05$) auf mRNA-Ebene signifikant hoch, wogegen E-Cadherin vermindert exprimiert wurde ($p < 0,05$). SNAI1 und Twist unterschieden sich nach der *Compound*-Behandlung nicht signifikant. Selbiges zeigte sich auch für die Zelllinie SW-1736, deren Expression von BST2 ($p < 0,05$), FGF9 ($p < 0,05$) und Vimentin ($p < 0,05$) signifikant anstieg, während E-Cadherin ($p < 0,001$) vermindert gebildet wurde. Interessanterweise wurde Twist von diesen Zellen überhaupt nicht exprimiert. Auch bei den medullären Schilddrüsenkarzinomzellen (TTmed) erwiesen sich nur die EMT-typischen Marker BST2 ($p < 0,01$), FGF9 ($p < 0,01$) und Vimentin ($p < 0,01$) signifikant erhöht und E-Cadherin als Adhäsionsprotein signifikant erniedrigt ($p < 0,05$), während SNAI1 keine Veränderung auswies. Bemerkenswerterweise gab es auch hier einen Unterschied bei der Expression von Twist, welches signifikant herunter- statt heraufreguliert wurde ($p < 0,01$).

Zusammenfassend verursachte rh-SDF1 α in allen Zellentitäten eine vermehrte mRNA-Expression der EMT-assoziierten Marker BST2, FGF9 und Vimentin, während das Adhäsionsprotein E-Cadherin vermindert exprimiert wurde.

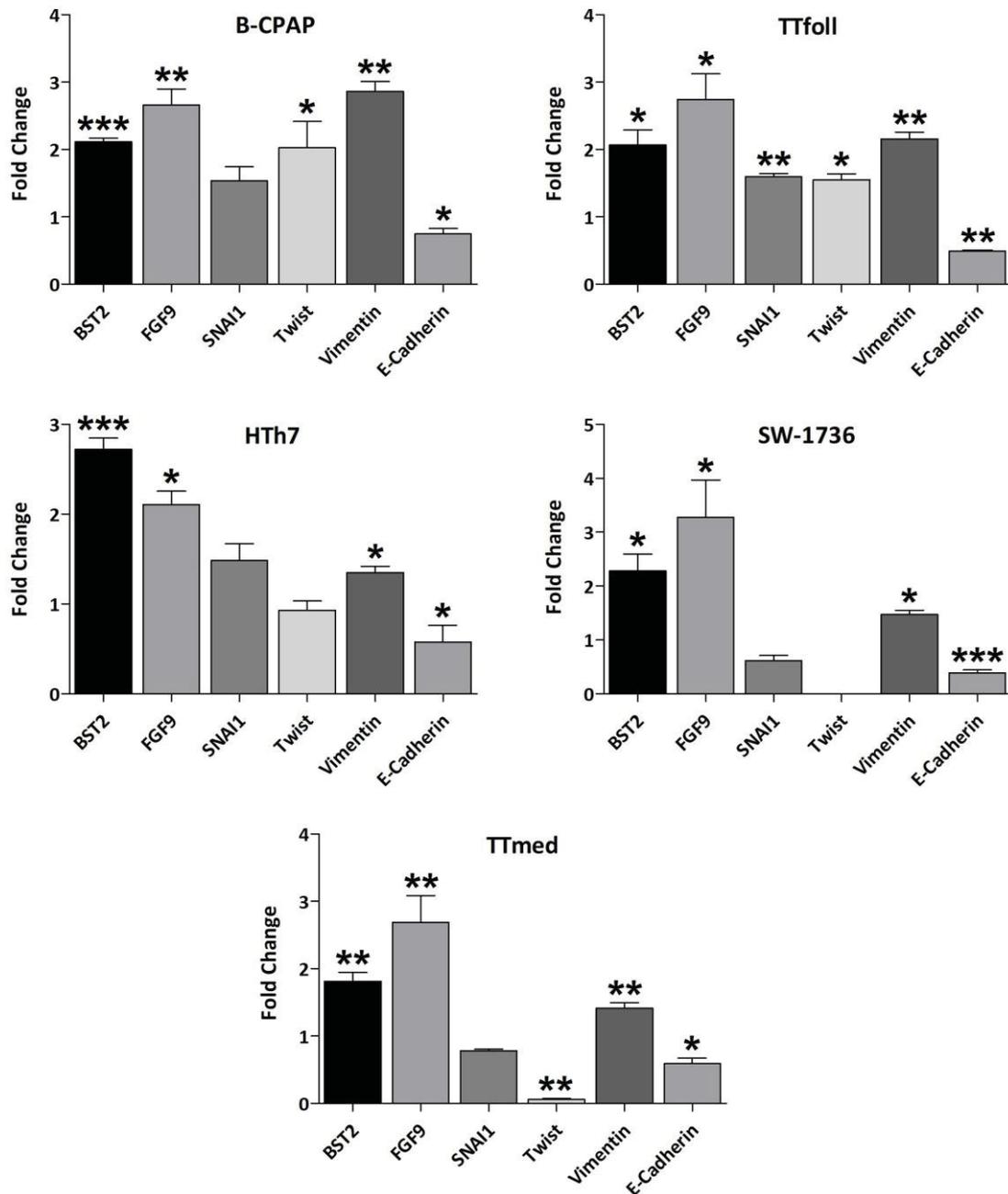


Abb. 23: mRNA-Expression EMT-spezifischer Marker in Schilddrüsenkarzinomzellen nach Stimulation mit rh-SDF1 α . Das Balkendiagramm zeigt Mittelwert und Standardabweichung der anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode berechneten *Fold Change* aus drei unabhängigen qPCR-Läufen. Die mRNA-Expression der Zielgene wird in Relation zu einer Referenzprobe (GAPDH) dargestellt. Teile dieser Abbildung wurden bereits veröffentlicht [151, 152]. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4 Diskussion

Karzinome der Schilddrüse sind die häufigsten endokrinen Tumore der Welt. Sie sind für mehr Todesfälle verantwortlich, als alle anderen endokrinen Malignome zusammen [153]. Trotz der Möglichkeit einer kurativen Therapie durch chirurgische Intervention in den frühen Stadien der Krankheit, ist der Therapieerfolg nach hämatogener Streuung und Fernmetastasierung limitiert. Eine systemische Therapie, etwa durch Behandlung mit radioaktivem Jod oder einer Chemotherapie mittels Tyrosinkinase-Inhibitoren, kann den Krankheitsverlauf oft nicht ausreichend beeinflussen [154]. Da eine Vielzahl von Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen aufweisen, werden dringend neue, adjuvante Therapiestrategien benötigt [19].

Obwohl Chemokine ursprünglich als chemotaktische Zytokine identifiziert wurden, deren Hauptaufgabe die Steuerung der Leukozyten-Migration ist, wurde diesen Proteinen und ihren spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bald eine Schlüsselrolle in der Tumorentwicklung zugesprochen. Es wurde in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen, dass Chemokine nicht nur das Immunsystem stimulieren, sondern auch Tumorzellen aktivieren sowie ihre Proliferation und das Zellüberleben beeinflussen. Ebenso fördern sie Invasion, Migration und Metastasierung der malignen Zellen [65, 155]. Eine besondere Bedeutung wurde schon früh vor allem der CXCR4/CXCL12-Achse zugesprochen, deren Interaktion Rezeptor-positive Zellen zur Entwicklung von Metastasen anregt [95]. Der CXCR4-Rezeptor wird unter hypoxischen Bedingungen im Tumor nach Stimulation durch HIF-1 α verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Migration der CXCR4-positiven Zellen erfolgt dann entlang eines Konzentrationsgradienten zu CXCL12-exprimierenden Organen, wo sie bevorzugt Metastasen bilden [55]. Die Bindung des aktivierenden Liganden CXCL12 induziert außerdem nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor CXCR4 verschiedene intrazelluläre Signalwege, die Einfluss auf die Gentranskription nehmen und die malignen Zellen unter anderem zur Proliferation anregen [103]. Nachdem man entdeckt hat, dass CXCL12 auch an den atypischen Chemokinrezeptor CXCR7 bindet und dieser mit CXCR4 Heterodimere bilden kann, wurde dieser Verbindung ebenfalls verstärkte tumorgene Effekte und eine Induktion von Metastasierung nachgewiesen [84, 156]. Daher ist ein fundiertes Verständnis über die Expression und Funktion der Achse in Schilddrüsenkarzinomen von Bedeutung, um Modulatoren dieser Achse zukünftig als potentielle Therapiealternative beim metastasierten Schilddrüsenkarzinom erfolgreich nutzen zu können.

4.1 Die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Schilddrüsenkarzinomen

In den vergangenen Jahren wurde in zahlreichen Tumorentitäten und deren Metastasen eine erhöhte Expression von CXCR4 und CXCR7 nachgewiesen [73, 157-161]. Deshalb wurde der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse der Ruf als Schlüsselfigur bei Tumorzellproliferation, Invasivität und Fernmetastasierung durch Tumorzell-*Homing* zuteil. Nichtsdestotrotz weiß man aktuell wenig über die Rolle der Achse in Schilddrüsenkarzinomen, weshalb ein Ziel dieser Arbeit war, die stadienabhängige Expression von CXCR4 und CXCR7 in Schilddrüsenkarzinomen anhand von Gewebeproben zu untersuchen und sie mit klinisch-pathologischen Variablen und dem Überleben der Patienten zu vergleichen.

4.1.1 Assoziation der Expressionsstärke mit klinisch-pathologischen Variablen

Um CXCR4 und CXCR7 als potenzielle Angriffspunkte für eine neue medikamentöse Therapie des Schilddrüsenkarzinoms identifizieren zu können, wurde zunächst die Expression der Rezeptoren beispielhaft in Gewebeproben aus medullären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen untersucht. Hierfür wurden Patientenproben von Primärtumoren, korrespondierendem Normalgewebe, Adenomen, Lymphknoten- und Fernmetastasen mit Hilfe von *Tissue Microarrays* nach immunhistochemischer Färbung für CXCR4 und CXCR7 untersucht. Anschließend wurde zur weiteren Evaluation der Achse die Expression mit klinisch-pathologischen Variablen verglichen.

42 Gewebeproben von Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom konnten auf eine Expression von CXCR4 hin untersucht werden. Hingegen waren nur 40 Proben für die Untersuchung von CXCR7 auswertbar. Diese Diskrepanz begründet sich auf einen Materialverlust während des immunhistochemischen Färbevorgangs. Des Weiteren wurden 18 follikuläre Adenome und zehn Fernmetastasen in das Studienkollektiv eingeschlossen. Nach der Auswertung des *Tissue Microarrays* konnte eine signifikant höhere Expression der beiden Chemokinrezeptoren im FTC im Vergleich zum dazugehörigen thyroidalen Normalgewebe festgestellt werden. Interessanterweise zeigten bereits die gutartigen Adenome eine signifikant höhere Expression von CXCR4 und CXCR7. Auch die Fernmetastasen wiesen signifikant höhere IRS für beide Rezeptoren im Vergleich zum

Normalgewebe auf. Darüber hinaus konnte außerdem eine signifikant höhere CXCR4-Expression in den Fernmetastasen bei der Gegenüberstellung von Primärtumor und Metastase festgestellt werden. Bislang wurde nur durch Zhu *et al.* die Expression von CXCR4 und CXCR7 in zehn Gewebeproben aus follikulären Schilddrüsenkarzinomen und aus zehn Adenomen untersucht. Bei ihnen zeigten nur 30 % der FTC-Proben und 20 % der Adenome eine lediglich schwache Färbung für CXCR4 [106]. Diese deutliche Abweichung zu unseren Resultaten könnte durch die geringe Anzahl der Proben bei Zhu *et al.* und durch eine unterschiedliche Verdünnung bei der Immunhistochemie verursacht worden sein. Eine starke Expression von CXCR7 in follikulären Adenomen und Schilddrüsenkarzinomen wurde dagegen bestätigt.

Ähnlich der Expression im follikulären Schilddrüsenkarzinom verhielt sich die Anwesenheit von CXCR4 in den 86 Patientenproben aus medullären Schilddrüsenkarzinomen. CXCR4 war sowohl im Primärtumor als auch in den Lymphknoten- und Fernmetastasen signifikant höher exprimiert als im korrespondierenden Normalgewebe. Es bestätigte sich ebenfalls der signifikante Expressionsgradient vom Primärtumor hin zur Metastase. Auffallend war die Abwesenheit von CXCR7 in fast allen untersuchten Gewebeproben. Nur ein Primärtumor zeigte eine starke Expression von CXCR7. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit denen von Zhu *et al.*, welche zehn MTC-Proben untersucht haben. Sie wiesen zwar eine Färbung für CXCR7 auf, jedoch zeigte sich, dass der Rezeptor hauptsächlich in den Blutgefäßen des Schilddrüsenorgans lokalisiert war [106]. Dies legt die Vermutung nahe, dass CXCR7 im MTC eher die Angiogenese im Tumor fördert und darüber die Bildung hämatogener Metastasen vereinfacht.

Ungeachtet dessen reihen sich unsere Ergebnisse tadellos in die aktuelle Literatur ein, die durch Immunhistochemie eine erhöhte Expression beider Chemokinrezeptoren in unterschiedlichen Tumorentitäten und einen mit der Malignität ansteigenden Expressionsgradienten ermittelt hat [156, 162]. Überdies verdeutlicht der Nachweis der erhöhten Rezeptorexpression in den papillären und anaplastischen Entitäten des Schilddrüsenkarzinoms durch Wu *et al.*, Dang *et al.* und De Falco *et al.* die bedeutende Rolle der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Schilddrüsenkarzinomen [163-165].

Neben der Expressionsanalyse mittels Immunhistochemie eruierten Zhu *et al.* keine weiteren Korrelationen hinsichtlich Expressionsstärke und klinisch-pathologischen

Variablen im Schilddrüsenkarzinom. Daher ist die vorliegende Arbeit die erste, welche den Einfluss der Chemokinrezeptoren im FTC und MTC als prognosebestimmende Faktoren hin untersucht. Es konnte eine statistisch signifikante Assoziation zwischen einer hohen CXCR4- und CXCR7-Expression in folliculären Malignomen und fortgeschrittener Tumorgroße (Stadium T3/T4) sowie hohem UICC-Stadium (UICC III/IV) festgestellt werden. Es zeigte sich zusätzlich eine signifikant höhere Expression beider Rezeptoren in rezidivierenden Tumoren. Die Parameter Alter, Geschlecht, Invasivität sowie Lymphknoten- und Fernmetastasierung erwiesen sich dagegen nach den statistischen Testungen als nicht signifikant.

Beim medullären Schilddrüsenkarzinom konnte bei erhöhter CXCR4-Expression im Primärtumor neben der Assoziation mit einem hohen T- und UICC-Stadium auch ein signifikanter Zusammenhang zur Metastasierung und sporadischen Tumorgene beobachtet werden. Die Merkmale Alter, Geschlecht und basaler präoperativer Calcitonin-Spiegel zeigten keine Relevanz in der Statistik. CXCR7 konnte wegen mangelnder Expression im MTC nicht evaluiert werden.

Ähnliche Zusammenhänge wurden von Wagner *et al.* beim papillären Schilddrüsenkarzinom beobachtet. Bei ihnen war eine hohe CXCR4-Expression signifikant mit größeren Tumoren assoziiert [166]. Auch Wang *et al.* zeigten einen Zusammenhang zwischen hoher CXCR4-Expression und Lymphknotenmetastasierung im PTC. Analog zu diesen Ergebnissen wurde von Dang *et al.* eine erhöhte CXCR7-Expression bei fortgeschrittener Tumorgroße und Lymphknotenmetastasierung nachgewiesen. Somit fügen sich unsere Ergebnisse in den Kontext der aktuellen Studienlage, die eine hohe Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen in Verbindung bringen.

4.1.2 Bedeutung für das Patienten-Outcome

Da eine hohe Rezeptorexpression mit fortgeschrittener Krankheit und Metastasierung assoziiert ist, erachtete man die beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 schon länger als prognostisch relevante Biomarker für Karzinomerkrankungen. Yopp *et al.* fanden heraus, dass eine vermehrte CXCR4-Expression negativ mit dem krankheitsspezifischen und Rezidiv-freien Überleben von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom assoziiert ist [167]. Auch Schrevel *et al.* bestätigte den CXCR7-Rezeptor als unabhängigen Marker für ein schlechtes Patienten-Outcome im

Zervixkarzinom [168]. Ein verkürztes Überleben zeigte sich unter anderem auch bei erhöhter CXCR4- und CXCR7-Expression im Nierenzellkarzinom [169]. Zur Evaluation der prognostischen Relevanz der Rezeptoren für das Schilddrüsenkarzinom wurden daher zunächst Kaplan-Meier-Kurven erstellt und die univariate Überlebensanalyse mittels *Log-rank* Test ausgewertet. Für eine multivariate Testung wurde die Cox-Regression auf der Grundlage von *Akaike information criterion* verwendet.

In der univariaten Überlebensanalyse zeigte die untersuchte Patientenkohorte mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom bei erhöhter CXCR4- und CXCR7-Expression eine stark negative Assoziation mit dem Gesamt- sowie dem Rezidiv-freien Überleben auf. Zusammen mit der Invasivität konnten sie als negative prognostische Marker im FTC nachgewiesen werden. Beim medullären Schilddrüsenkarzinom konnte eine erhöhte CXCR4-Expression ebenfalls mit einer signifikant schlechteren Prognose der Patienten in Verbindung gebracht werden. Ebenso waren das Alter bei Erstdiagnose, ein fortgeschrittenes TNM-Stadium sowie eine sporadische Genese des MTC mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert. CXCR7 konnte aufgrund fehlender Expression im MTC nicht untersucht werden.

Bei der Identifikation von unabhängigen Prognosefaktoren in der multivariaten Analyse nach stufenweiser Variablenselektion erwies sich jedoch nur die Invasivität des Tumors als unabhängiger, negativ prognostischer Marker im FTC. Bei der Regressionsbaumanalyse erwies sich CXCR4 hingegen als stärkster Marker mit der höchsten prognostischen Aussagekraft in der Patientenkohorte. Obwohl diese Art der Analyse ein rein exploratives statistisches Verfahren darstellt, lässt es doch die biologische Relevanz von CXCR4 im follikulären Schilddrüsenkarzinom vermuten. Beim medullären Schilddrüsenkarzinom stellte nur das Vorhandensein von Metastasen einen unabhängigen Prognosemarker dar, welcher negativ mit dem Überleben der Patienten assoziiert ist.

CXCR4 zeigt eine deutliche Überexpression im Schilddrüsenkarzinom und ist mit fortgeschrittener Krankheit, Metastasierung und einer ungünstigen Prognose assoziiert. Diese Arbeit verdeutlicht vor allem, dass die Metastasierung ein äußerst wichtiger, negativer Faktor für das Patienten-*Outcome* ist, welcher auch von CXCR4 beeinflusst wird. Denn CXCR4 fördert die Invasivität des Tumors und vereinfacht so die Bildung von Metastasen, was wiederum die Überlebenschance der Patienten wesentlich bestimmt. Der Rezeptor kann daher als nützlicher, prädiktiver Biomarker für Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen angesehen werden.

4.2 Effekt der Rezeptor-Modulatoren auf die Tumorprogression

Weiterhin war ein Ziel dieser Arbeit, die Funktion von CXCR4 und CXCR7 in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien sowie den Effekt von Rezeptor-Modulatoren auf ihre Invasivität *in vitro* zu untersuchen. Daher wurde im Anschluss an die Analyse der Rezeptorexpression und deren Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern die Wirkung der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Zellkulturversuchen erforscht. Dafür wurde zunächst die Expression von CXCR4 und CXCR7 in verschiedenen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien mittels *Western Blot* und Immunzytochemie nachgewiesen. Die Zelllinien der papillären (B-CPAP), der follikulären (TTfol), der anaplastischen (HTh7 und SW-1736) sowie der medullären (TTmed) Tumorentitäten exprimierten dabei allesamt beide Chemokinrezeptoren.

4.2.1 Einfluss auf Zellinvasivität und Zellzyklusaktivierung

Die Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien wurden daraufhin zunächst mit steigenden Konzentrationen von rekombinantem SDF1 α (CXCL12) und den CXCR4-Antagonisten AMD3100 und WZ811 behandelt, um den Einfluss der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse hinsichtlich ihres Invasionspotentials in Schilddrüsenkarzinomen *in vitro* zu prüfen.

Mit Hilfe der *BioCoat Matrigel Invasion Chambers* wurde das invasive Wachstum der Zellen nach Inkubation mit den *Compounds* beobachtet und ausgewertet. Die Inkubation mit rh-SDF1 α induzierte in allen Zelllinien eine Invasion der Matrigel-Membran. Die Behandlung der Zellen mit AMD3100 und WZ811 reduzierte dagegen die Invasion in allen Zelllinien. Diese Ergebnisse lassen auf eine CXCL12-gesteuerte Invasivität schließen und untermauern die funktionell wichtige Rolle der Achse bei der Tumorprogression in Schilddrüsenkarzinomen. Diese Resultate bestätigen die Ergebnisse von Lin *et al.*, die bei den papillären B-CPAP-Zellen nach Behandlung mit CXCL12 ebenfalls eine gesteigerte Invasivität feststellten [170]. Auch Hwang *et al.* demonstrierten ähnliche Ergebnisse beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom [171]. Jung *et al.* konnten fernerhin den antiinvasiven Effekt von AMD3100 durch die Blockade von CXCR4 im PTC *in vitro* und *in vivo* bekräftigen [172].

Zur Erörterung möglicher Mechanismen hinter der gesteigerten Zellinvasivität nach Behandlung mit rh-SDF1 α wurde dem *Invasionsassay* anschließend eine Zellzyklusanalyse mittels FACS durchgeführt. Die Stimulation der Zellen führte in allen Zellentitäten zu

einer Aktivierung des Zellzyklus. Es kam zur signifikanten Abnahme der Zellen, die in der G₁-Phase verweilten, während sich ein signifikanter Anstieg der Zellpopulation in der G₂/M-Phase manifestierte. Weiterhin zeigte die Inkubation der Zellen mit den CXCR4-Antagonisten AMD3100 und WZ811 keine Veränderungen im Zellzyklus, was einhergeht mit den Ergebnissen von Jung *et al.* [172]. De Falco *et al.* hingegen wiesen eine CXCL12-vermittelte Induktion der Proliferation von anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen nach. Außerdem konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch AMD3100 das Tumorwachstum des ATC signifikant blockiert werden [164].

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 gleichmäßig in den untersuchten Zelllinien exprimiert werden. Dass eine Koinkubation mit rh-SDF1 α den inhibitorischen Einfluss der beiden CXCR4-spezifischen Antagonisten AMD3100 und WZ811 nicht ausgleichen konnte, legt die Tatsache nahe, dass ein funktionsfähiger CXCR4-Rezeptor zwingend notwendig ist, damit sich die Wirkung der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Schilddrüsenkarzinomen voll entfalten kann. Des Weiteren erschließt sich, dass CXCR7 alleine einen Funktionsverlust von CXCR4 nicht kompensieren kann, was CXCR4 als zwingende Voraussetzung für eine CXCL12-induzierte Invasivität erfordert. Allerdings ist zu erwähnen, dass eine Studie von Kalatskaya *et al.* AMD3100 als allosterischen Agonisten für CXCR7 ausweist [120], was die Spezifität für CXCR4 in Frage stellt. Del Molino *et al.* und Zhu *et al.* postulierten, dass CXCR7 alleine nicht an der CXCL12-induzierten Migration teilnimmt, der Rezeptor aber den invasiven Effekt von CXCL12 verstärkt, sobald er mit CXCR4 koexprimiert wird [106, 173]. Im Hinblick auf die Fähigkeit von CXCR7, mit CXCR4 funktionelle Heterodimere zu bilden, stützen die Ergebnisse die Theorie, dass CXCR7 statt durch eigenständige Signaltransduktion eher als Co-Rezeptor und Regulator von CXCR4-vermittelten Signalkaskaden agiert [80]. Auf der anderen Seite zeigten aktuelle Studien jedoch, dass CXCR7 auch alleine Tumorproliferation und Invasivität *in vitro* fördert [109, 174]. Da auch Schilddrüsenkarzinome aus unterschiedlichen genetischen Ursprüngen resultieren, heben unsere Ergebnisse die komplexen Wechselwirkungen der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in verschiedenen Tumorentitäten hervor. Dennoch sind zukünftig weitere Studien nötig, um die vielschichtigen Zusammenhänge zwischen CXCR4, CXCR7 und ihrem gemeinsamen Liganden, dem Chemokin CXCL12, vollständig zu entschlüsseln.

4.2.2 CXCL12-induzierte epithelial-mesenchymale Transition

Abschließend wurde der Frage nachgegangen, ob es durch CXCL12 zur Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition in Schilddrüsenkarzinomen kommt. EMT ist ein Schlüsselereignis bei der Tumorprogression, da sie Tumorzellen ermöglicht, sich aus dem Zellverband zu lösen. Sie fördert so invasives Wachstum und Migration der malignen Zellen und vereinfacht die Bildung von Metastasen [113]. Daher ist die epithelial-mesenchymale Transition von essentieller Bedeutung für den Krankheitsverlauf der Patienten. So konnte bereits in verschiedenen Tumoren gezeigt werden, dass nach Bindung von CXCL12 an seine beiden Rezeptoren über die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse EMT induziert wurde. Duan *et al.* berichteten, dass eine Überexpression von CXCR4 im Plattenepithelkarzinom der Zunge signifikant mit der EMT assoziiert ist, während eine Herabregulation von CXCR4 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit einer Unterdrückung der EMT und reduzierter Metastasierung einhergeht [175]. Ähnliche Ergebnisse wurden unter anderem beim hepatozellulären Karzinom bestätigt [176]. Auch für CXCR7 konnte die Initiation und Förderung der EMT in Lungen- und Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden [111, 177]. Die Rolle der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse bei der epithelial-mesenchymalen Transition in Schilddrüsenkarzinomen ist dagegen noch kaum untersucht.

Daher wurde in dieser Arbeit in den Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien die mRNA-Expression von Genen untersucht, die mit Invasion und EMT assoziiert sind. Mittels qPCR wurden Veränderungen der zellulären Genexpression nach Behandlung mit rh-SDF1 α analysiert. Als Marker für EMT diente dabei die Genexpression des Intermediärfilaments Vimentin und des Adhäsionsproteins E-Cadherin. Vimentin ist ein mesenchymaler Marker, welcher während der EMT verstärkt exprimiert wird. Er bewirkt einen Kontaktverlust der Epithelzellen durch Veränderung ihrer Zellmorphologie in eine mesenchymale Form und ermöglicht dadurch eine Motilität der Zellen [178, 179]. In der Arbeit von Albert *et al.* konnte Vimentin sogar als unabhängiger prognostischer Faktor im oralen Plattenepithelkarzinom identifiziert werden, welcher mit einem schlechteren Gesamtüberleben der Patienten assoziiert war [180]. Der epitheliale Marker E-Cadherin ist während der EMT dagegen durch eine verminderte Genexpression charakterisiert. Sein Fehlen führt zu einer ineffektiven Bindung unter den Karzinomzellen, wodurch sie sich aus dem Tumorverband lösen und metastasieren können [181]. Eine Herabregulation von CXCR4 führte bei Li *et al.* zu einem Anstieg von E-Cadherin in hepatischen Tumorzellen, was die zentrale Rolle der Achse bei der epithelial-mesenchymalen Transition unterstreicht [176].

Weiterhin wurden die in zahlreichen anderen Malignomen mit EMT und Invasion assoziierten Transkriptionsfaktoren BST2, FGF9, SNAI1 und Twist untersucht. Die verstärkte Expression von BST2 fördert bei der EMT durch Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs unabhängiges Wachstum sowie Invasivität [182, 183]. FGF9 hat ebenfalls ein starkes, mitogenes Potenzial und ist mit EMT und einer Hochregulation von VEGF assoziiert [184]. Seine Expression ist in diversen Tumoren mit schlechter Prognose und metastatischem Phänotyp korreliert [185, 186]. SNAI1 und Twist fungieren dagegen als Transkriptionsrepressor für den E-Cadherin-Promoter. Sie unterdrücken die Expression des Adhäsionsmoleküls und fördern dadurch die epithelial-mesenchymale Transition bei der Tumorentwicklung [187-189].

In dieser Arbeit führte die Inkubation mit CXCL12 in allen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien zu einer signifikanten Zunahme des mesenchymalen Markers Vimentin, während E-Cadherin merklich verringert produziert wurde. Dadurch liegt nahe, dass die Zellen von einem epithelialen auf einen mesenchymalen Phänotyp gewechselt haben. Dies ist im Einklang mit den Resultaten von Lin *et al.*, welche für die papillären B-CPAP-Zellen nach CXCL12-Behandlung eine Herabregulation von E-Cadherin und eine verstärkte Expression von Vimentin nachgewiesen haben [170]. Zusätzlich waren die mRNA-Spiegel von BST2 und FGF9 nach der Stimulation mit CXCL12 in allen Zellreihen signifikant erhöht. SNAI1 hingegen zeigte nur in der follikulären Zelllinie eine relevante Steigerung der Expression. Während Twist eine deutliche Erhöhung in den differenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen zeigte, war es interessanterweise in den medullären Zellen signifikant heruntergesetzt und in einer anaplastischen Linie überhaupt nicht exprimiert.

Neben Lin *et al.* für das PTC ist die vorliegende Arbeit bis heute die einzige, welche den Einfluss von CXCL12 auf die EMT-Marker in Schilddrüsenkarzinomen untersucht hat. Einige Studien wiesen lediglich die erhöhte Expression der Marker in den verschiedenen thyroidalen Tumorentitäten nach [190-192]. Nichtsdestotrotz verursachte CXCL12 in allen Zellreihen *in vitro* eine signifikant vermehrte Genexpression EMT-assoziierter Marker wie BST2, FGF9 und Vimentin und führte zu einer Reduktion von E-Cadherin. So lässt sich auf eine CXCL12-getriggerte Aktivierung und Intensivierung des EMT-Prozesses in thyroidalen Malignomen schließen. Die erhöhte mRNA-Expression dieser Marker kann man als Indiz auf den zugrunde liegenden, molekularen Mechanismus der CXCR4/CXCR7/CXCL12-vermittelten Metastasierung sehen, jedoch sind weitere Studien nötig, um diesen Prozess vollständig zu erklären.

Zusammenfassend verweisen die Ergebnisse der Zellkulturversuche auf die bedeutende Funktion der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse bei der Progression, Invasion und Metastasierung von Schilddrüsenkarzinomen. Unsere funktionellen Experimente zeigten *in vitro*, dass eine Blockade der Chemokinrezeptoren mit den CXCR4-Inhibitoren AMD3100 und WZ811 eine signifikante Reduktion der Invasionskapazität maligner Zellen bewirkte. Sie könnten daher in Zukunft für die Therapie von Patienten mit fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinomen geeignet sein.

4.3 Rezeptor-Inhibitoren als Ansatzpunkte einer zielgerichteten Therapie

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die führende Rolle der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse bei der Tumorprogression des Schilddrüsenkarzinoms. Vor allem ihre Beteiligung bei der Induktion und Förderung der epithelial-mesenchymalen Transition ist eine bedeutende Erkenntnis in der Onkogenese von thyroidalen Malignomen. Auch die nachgewiesene prognostische Relevanz verweist auf die Achse als eine mögliche therapeutische Zielstruktur in fortgeschrittenen Schilddrüsenmalignomen. Unsere Resultate deuten außerdem auf eine vielversprechende Wirkung der Rezeptor-Inhibitoren von CXCR4 in der Therapie des Schilddrüsenkarzinoms hin. Vor allem für Patienten im metastasierten Stadium könnten diese Ergebnisse von Bedeutung sein, da sie, in Ermangelung einer adäquaten systemischen Therapie, bisher oft nicht erfolgreich behandelt werden konnten.

Zahlreiche Studien untersuchten bereits die Wirksamkeit von CXCR4- und CXCR7-Antagonisten in verschiedenen Tumorentitäten *in vitro* und *in vivo*. AMD3100 demonstrierte bei einer Vielzahl von Malignomen eine Unterdrückung der Tumorprogression und Metastasierung [172, 193, 194]. Bis heute ist es der einzige CXCR4-Inhibitor, der für den klinischen Gebrauch zugelassen ist. Seine Indikation beschränkt sich bisher auf eine Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen vor autologen Transplantationen bei Patienten mit Lymphomen oder Multiplem Myelom [121]. Seine schlechte orale Bioverfügbarkeit und seine ausgeprägte Toxizität verhindern jedoch einen Einsatz in der Langzeittherapie zur Prävention von Metastasen [195]. Auch dem zweiten CXCR4-Antagonisten WZ811 wird in präklinischen Studien durch eine Reduktion der Zellproliferation, des Zellwachstums und der Migration CD3-positiver T-Zellen ein gutes antitumorigenes Potential sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Mausversuchen

bescheinigt [124, 196]. Jedoch ist WZ811 ebenfalls durch seine schlechte orale Bioverfügbarkeit in der Klinik nicht nutzbar [123].

Daher steht die Suche nach effektiveren Rezeptor-Inhibitoren der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse im Fokus aktueller Studien. Durch eine Modifizierung seiner pharmakologischen Struktur wurden Derivate der CXCR4-Antagonisten synthetisiert, welche sich durch eine hohe orale Bioverfügbarkeit, größere Potenz und geringere Toxizität auszeichnen [197-199]. Einige davon sind aktuell Gegenstand präklinischer als auch klinischer Forschungen. In Studien der Phase II wurde der antimetastatische Effekt von LY2510924, einem potenten selektiven CXCR4-Antagonisten, untersucht. Sowohl im Nierenzellkarzinom als auch beim kleinzelligen Bronchialkarzinom zeigte sich in Kombination mit Sunitinib und Carboplatin/Etoposid leider kein antitumogener Effekt [200, 201]. Auch das Gesamt- und das Rezidiv-freie Überleben der Patienten konnte durch die Kombination der Chemotherapeutika mit LY2510924 nicht verbessert werden. Des Weiteren wiesen die Patienten ein verstärktes Nebenwirkungsprofil im Vergleich zur Monotherapie mit den Zytostatika auf, darunter verstärkte Neutropenie, Leukopenie und Erbrechen. Trotz der vielversprechenden präklinischen Daten konnte dieser CXCR4-Antagonist den antitumorenen Effekt nicht bestätigen. Dies könnte an der aggressiven und äußerst fortgeschrittenen Krankheit der in der Studie untersuchten Patienten und der bereits erfolgten Metastasierung liegen, da man von CXCR4-Antagonisten den besten Effekt im Anfangsstadium der Zelldissemination erwarten würde. Ein anderer CXCR4-Antagonist, POL6326 (Balixafortide), wurde in Phase I der klinischen Studien bei Frauen mit metastasiertem Brustkarzinom in Kombination mit Eribulin, einem Mikrotubuli-Inhibitor, verabreicht [202]. Die 56 CXCR4-positiven Frauen, welche in der Anamnese bereits Chemotherapien bekommen haben, wurden in Kohorten eingeteilt und mit unterschiedlichen Dosierungen von POL6326 behandelt. Patientinnen mit der höchsten Dosis POL6326 zeigten in der Kombinationstherapie mit Eribulin eine objektive Ansprechrate des Tumors von 38 % und 63 % der Frauen hatten einen klinischen Vorteil durch längere Krankheitskontrolle. Die gesamte Studienkohorte wies dagegen eine Ansprechrate von nur 30 % auf. Da selbst bei Dosis-Eskalation keine limitierende Toxizität von POL6326 beobachtet wurde, konnte der CXCR4-Inhibitor aufgrund seiner guten Verträglichkeit über sechs Monate oder länger gegeben werden. Das 1-Jahres-Überleben in der Kohorte mit der höheren Dosis POL6326 lag bei 75 %, während das Überleben aller Patientinnen bei 62 % lag. Die Kombinationstherapie in dieser Studie zeigte also deutlich höhere Ansprechraten und ein

verlängertes Gesamtüberleben der Patientinnen als bei einer Monotherapie mit Eribulin [203]. Diese unterschiedlichen Studienergebnisse verdeutlichen die nach wie vor notwendige, weitere klinische Evaluation neuer Rezeptor-Inhibitoren.

Die Fähigkeit von CXCL12, sowohl an CXCR4 als auch CXCR7 zu binden und verschiedene intrazelluläre Prozesse zu induzieren, wirft die Frage auf, ob eine selektive Blockade von CXCR4 ohne eine gleichzeitige Inhibition von CXCR7 wirklich effektiv ist. Daher sollte man zukünftig einen Antagonisten für beide Rezeptoren entwickeln, um so einen bessere, antineoplastische Wirkung zu erzielen. Da die Achse auch eine zentrale Rolle in zahlreichen homöostatischen und inflammatorischen Prozessen spielt, muss der Einsatz von Achsen-Inhibitoren bei längerfristigen Verabreichungen in weiteren präklinischen und klinischen Studien auf Sicherheit und Wirksamkeit hin evaluiert werden. Umfangreiche präklinische Daten weisen auf die günstigen Effekte einer Blockade der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse hin. Eine Kombination von Rezeptor-Inhibitoren mit konventionellen Chemotherapeutika oder mit Bestrahlungstherapie zeigten in den wenigen klinischen Studien bisher jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Weitere Studien mit den neuen Wirkstoffen sind nötig, um definitiv entscheiden zu können, ob eine Blockade der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 ein ausreichendes, antitumorigenes Potential aufweist. Diese Arbeit befürwortet die Etablierung der Rezeptor-Inhibitoren als Therapieoption in der zielgerichteten Therapie des Schilddrüsenkarzinoms.

4.4 Schlussfolgerung

Invadierendes Wachstum und die darauffolgende Bildung von Metastasen sind die Hauptdeterminanten für ein schlechtes *Outcome* von Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen. Ein umfassendes Verständnis über die molekularen Signalwege der Tumorzell dissemination ist unerlässlich für die Entwicklung neuer Therapien. Zusammenfassend demonstriert diese Arbeit die bedeutende Rolle der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in der Tumorbilogie des Schilddrüsenkarzinoms. CXCR4 zeigt ein signifikant verstärktes Expressionsprofil in Schilddrüsenkarzinomen und ist assoziiert mit größeren Tumoren, fortgeschrittener Krankheit, metastatischem Phänotyp und schlechter Prognose. Wenn man die relevante Stellung bei der Bildung von Fernmetastasen bedenkt, ist der explorierte Gradient der Rezeptorexpression vom Normalgewebe über den Primärtumor hin zur Lymphknoten- und Fernmetastase logisch und fügt sich perfekt in das wachsende Verständnis über die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse in Karzinomen ein. Besonders die Beteiligung der Achse bei der Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition und der darauffolgenden Förderung der Dissemination maligner Zellen in entfernte Organe zeigt neue Einsicht in die Onkogenese des Schilddrüsenkarzinoms. So ist vor allem CXCR4 ein nützlicher prognostischer Biomarker und eine potenzielle Zielstruktur für eine neue Therapiestrategie bei Patienten mit fortgeschrittenem und metastasiertem Schilddrüsenkarzinom, welche auch heute noch durch stark limitierte Therapieoptionen eine schlechte Prognose aufweisen.

Eine pharmakologische Intervention durch Inhibition der Chemokinrezeptoren bietet einen spannenden Ansatzpunkt für die zukünftige Therapie des Schilddrüsenkarzinoms. Da AMD3100 bereits in der Klinik Anwendung findet, jedoch nicht für die Therapie des Schilddrüsenkarzinoms zugelassen ist, bietet diese Arbeit einen guten Ausgangspunkt für weitere Studien zur Evaluation der CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse als Angriffsziel einer personalisierten Therapie in humanen Schilddrüsenmalignomen. Da einige Studien nach Rezeptor-Inhibition bereits *in vitro* und *in vivo* vielversprechende Ergebnisse gezeigt haben, gewinnt die CXCR4/CXCR7/CXCL12-Achse zunehmend an Bedeutung in der aktuellen Tumorforschung, sodass diese Arbeit in Konkordanz mit dem aktuellen Trend der medikamentösen Karzinombekämpfung ist.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2017. 11: p. 112-115.
2. Davies, L. and H.G. Welch, *Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002*. *Jama*, 2006. 295(18): p. 2164-7.
3. Leboulleux, S., et al., *Medullary thyroid carcinoma*. *Clinical endocrinology*, 2004. 61(3): p. 299-310.
4. Dralle, H., et al., *German Association of Endocrine Surgeons practice guideline for the surgical management of malignant thyroid tumors*. *Langenbecks Arch Surg*, 2013. 398(3): p. 347-75.
5. Iglesias, M.L., et al., *Radiation exposure and thyroid cancer: a review*. *Arch Endocrinol Metab*, 2017. 61(2): p. 180-187.
6. Conard, R.A., B.M. Dobyns, and W.W. Sutow, *Thyroid neoplasia as late effect of exposure to radioactive iodine in fallout*. *Jama*, 1970. 214(2): p. 316-24.
7. Veiga, L.H.S., et al., *Thyroid Cancer after Childhood Exposure to External Radiation: An Updated Pooled Analysis of 12 Studies*. *Radiation Research*, 2016. 185(5): p. 473-484.
8. Guilmette, J. and V. Nose, *Hereditary and familial thyroid tumours*. *Histopathology*, 2018. 72(1): p. 70-81.
9. Dal Maso, L., et al., *Risk factors for thyroid cancer: an epidemiological review focused on nutritional factors*. *Cancer Causes Control*, 2009. 20(1): p. 75-86.
10. Henne-Bruns, D., *Duale Reihe Chirurgie*. Thieme Verlag Stuttgart, 2012. 4. Auflage: p. 581-584.
11. Kitahara, C.M., et al., *Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2011. 20(3): p. 464-72.
12. Carling, T. and R. Udelsman, *Thyroid cancer*. *Annual review of medicine*, 2014. 65: p. 125-137.
13. Herold, G., *Innere Medizin 2018*. Herold, Gerd, 2017. p. 766-768.
14. Cabanillas, M.E., D.G. McFadden, and C. Durante, *Thyroid cancer*. *The Lancet*, 2016. 388(10061): p. 2783-2795.
15. Cooper, D.S., et al., *Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer*. *Thyroid*, 2009. 19(11): p. 1167-214.
16. Anderson, R.T., et al., *Clinical, safety, and economic evidence in radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer: a systematic literature review*. *Thyroid*, 2013. 23(4): p. 392-407.

17. Strosberg, J.R., *Update on the management of unusual neuroendocrine tumors: pheochromocytoma and paraganglioma, medullary thyroid cancer and adrenocortical carcinoma*. Semin Oncol, 2013. 40(1): p. 120-33.
18. Tuttle, R.M., et al., *Thyroid carcinoma, version 2.2014*. J Natl Compr Canc Netw, 2014. 12(12): p. 1671-80; quiz 1680.
19. Hu, M.I., A.K. Ying, and C. Jimenez, *Update on medullary thyroid cancer*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2014. 43(2): p. 423-42.
20. Resteghini, C., et al., *Management of tyrosine kinase inhibitors (TKI) side effects in differentiated and medullary thyroid cancer patients*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2017. 31(3): p. 349-361.
21. Laursen, R., et al., *Effects and Role of Multikinase Inhibitors in Thyroid Cancer*. Curr Pharm Des, 2016. 22(39): p. 5915-5926.
22. Riede, U.N., M. Werner, and N. Freudenberg, *Basiswissen allgemeine und spezielle Pathologie*. Springer-Verlag, 2009. p. 554-556.
23. Giordano, T.J., *Follicular cell thyroid neoplasia: insights from genomics and The Cancer Genome Atlas research network*. Curr Opin Oncol, 2016. 28(1): p. 1-4.
24. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. 417(6892): p. 949-54.
25. Ceccherini, I., et al., *Exon structure and flanking intronic sequences of the human RET proto-oncogene*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. 196(3): p. 1288-95.
26. Donis-Keller, H., et al., *Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC*. Hum Mol Genet, 1993. 2(7): p. 851-6.
27. Takahashi, M., *Oncogenic activation of the ret protooncogene in thyroid cancer*. Crit Rev Oncog, 1995. 6(1): p. 35-46.
28. DeLellis, R.A., *Pathology and genetics of tumours of endocrine organs*. IARC, 2004. 8: p. 49-77.
29. Miyauchi, A., et al., *Prognostic impact of serum thyroglobulin doubling-time under thyrotropin suppression in patients with papillary thyroid carcinoma who underwent total thyroidectomy*. Thyroid, 2011. 21(7): p. 707-16.
30. Nikiforov, Y.E. and M.N. Nikiforova, *Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer*. Nat Rev Endocrinol, 2011. 7(10): p. 569-80.
31. Raman, P. and R.J. Koenig, *Pax-8-PPAR-gamma fusion protein in thyroid carcinoma*. Nat Rev Endocrinol, 2014. 10(10): p. 616-23.
32. Schmid, K., *Pathogenese, klassifikation und histologie von schilddrüsenkarzinomen*. Der Onkologe, 2010. 16(7): p. 644-656.
33. Arastéh, K., et al., *Duale Reihe Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag, 2018. 4: p. 787-791.

34. Durante, C., et al., *Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. 91(8): p. 2892-9.
35. Pacini, F., et al., *Medullary thyroid carcinoma*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2010. 22(6): p. 475-85.
36. Elisei, R., et al., *Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. 93(3): p. 682-7.
37. Moura, M.M., et al., *High prevalence of RAS mutations in RET-negative sporadic medullary thyroid carcinomas*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. 96(5): p. E863-8.
38. Eng, C., et al., *The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis*. Jama, 1996. 276(19): p. 1575-9.
39. Kloos, R.T., et al., *Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association*. Thyroid, 2009. 19(6): p. 565-612.
40. Elisei, R., et al., *Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. 89(1): p. 163-8.
41. Kebebew, E., et al., *Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors*. Cancer, 2005. 103(7): p. 1330-5.
42. Molinaro, E., et al., *Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies*. Nat Rev Endocrinol, 2017. 13(11): p. 644-660.
43. Jossart, G.H., et al., *Immunocytochemical detection of p53 in human thyroid carcinomas is associated with mutation and immortalization of cell lines*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. 81(10): p. 3498-504.
44. Fagin, J.A., et al., *High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas*. J Clin Invest, 1993. 91(1): p. 179-84.
45. Keutgen, X.M., S.M. Sadowski, and E. Kebebew, *Management of anaplastic thyroid cancer*. Gland surgery, 2015. 4(1): p. 44.
46. Haddad, R.I., et al., *Anaplastic Thyroid Carcinoma, Version 2.2015*. J Natl Compr Canc Netw, 2015. 13(9): p. 1140-50.
47. Links, T.P., et al., *Endocrine tumours: progressive metastatic medullary thyroid carcinoma: first- and second-line strategies*. Eur J Endocrinol, 2015. 172(6): p. R241-51.
48. Nicolson, G.L., *Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 1993. 12(3-4): p. 325-43.
49. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. 410(6824): p. 50-6.

50. Vandercappellen, J., J. Van Damme, and S. Struyf, *The role of CXC chemokines and their receptors in cancer*. Cancer Lett, 2008. 267(2): p. 226-44.
51. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. 12(2): p. 121-7.
52. Schall, T.J. and A.E. Proudfoot, *Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(5): p. 355-63.
53. Zlotnik, A., A.M. Burkhardt, and B. Homey, *Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis*. Nat Rev Immunol, 2011. 11(9): p. 597-606.
54. Netelenbos, T., et al., *Proteoglycans on bone marrow endothelial cells bind and present SDF-1 towards hematopoietic progenitor cells*. Leukemia, 2003. 17(1): p. 175-84.
55. Balkwill, F., *Cancer and the chemokine network*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(7): p. 540-50.
56. Sun, X., et al., *CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression*. Cancer Metastasis Rev, 2010. 29(4): p. 709-22.
57. Schimanski, C.C., et al., *Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. 11(5): p. 1743-50.
58. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes*. J Biol Chem, 2005. 280(42): p. 35760-6.
59. Ingold, B., et al., *Vascular CXCR4 expression - a novel antiangiogenic target in gastric cancer?* PLoS One, 2010. 5(4): p. e10087.
60. Tanabe, S., et al., *Functional expression of the CXC-chemokine receptor-4/fusin on mouse microglial cells and astrocytes*. J Immunol, 1997. 159(2): p. 905-11.
61. Scala, S., *Molecular Pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 Axis--Untapped Potential in the Tumor Microenvironment*. Clin Cancer Res, 2015. 21(19): p. 4278-85.
62. Aiuti, A., et al., *Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lymphohematopoietic progenitors*. European journal of immunology, 1999. 29(6): p. 1823-1831.
63. Jordan, N.J., et al., *Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells*. J Clin Invest, 1999. 104(8): p. 1061-9.
64. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 217-42.
65. Balkwill, F.R., *The chemokine system and cancer*. J Pathol, 2012. 226(2): p. 148-57.
66. Pozzobon, T., et al., *CXCR4 signaling in health and disease*. Immunol Lett, 2016. 177: p. 6-15.

67. Ratajczak, M.Z., et al., *The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis*. Leukemia, 2006. 20(11): p. 1915-24.
68. McGrath, K.E., et al., *Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4*. Dev Biol, 1999. 213(2): p. 442-56.
69. Tachibana, K., et al., *The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract*. Nature, 1998. 393(6685): p. 591-4.
70. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. 272(5263): p. 872-7.
71. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. Nature, 1996. 382(6594): p. 829-33.
72. Gerrits, H., et al., *Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice*. Genesis, 2008. 46(5): p. 235-45.
73. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. J Exp Med, 2006. 203(9): p. 2201-13.
74. Tripathi, V., et al., *Differential expression of RDC1/CXCR7 in the human placenta*. J Clin Immunol, 2009. 29(3): p. 379-86.
75. Gebauer, F., et al., *Prognostic impact of CXCR4 and CXCR7 expression in pancreatic adenocarcinoma*. J Surg Oncol, 2011. 104(2): p. 140-5.
76. Chen, N., et al., *CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis contributes to cell motilities of oral squamous cell carcinoma*. Tumour Biol, 2016. 37(1): p. 567-75.
77. Sierro, F., et al., *Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(37): p. 14759-64.
78. Thelen, M. and S. Thelen, *CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio?* J Neuroimmunol, 2008. 198(1-2): p. 9-13.
79. Graham, G.J., *D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes*. Eur J Immunol, 2009. 39(2): p. 342-51.
80. Sanchez-Martin, L., P. Sanchez-Mateos, and C. Cabanas, *CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease*. Trends Mol Med, 2013. 19(1): p. 12-22.
81. Luker, K.E., et al., *Imaging ligand-dependent activation of CXCR7*. Neoplasia, 2009. 11(10): p. 1022-35.
82. Miao, Z., et al., *CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(40): p. 15735-40.
83. Wang, J., et al., *The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer*. J Biol Chem, 2008. 283(7): p. 4283-94.

84. Levoye, A., et al., *CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling*. Blood, 2009. 113(24): p. 6085-93.
85. Shimizu, N., et al., *A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses*. J Virol, 2000. 74(2): p. 619-26.
86. Yu, L., et al., *Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1*. Gene, 2006. 374: p. 174-9.
87. Secchiero, P., et al., *Differential effects of stromal derived factor-1 α (SDF-1 α) on early and late stages of human megakaryocytic development*. The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists, 2000. 260(2): p. 141-147.
88. Roland, J., et al., *Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling*. Blood, 2003. 101(2): p. 399-406.
89. Karin, N., *The multiple faces of CXCL12 (SDF-1 α) in the regulation of immunity during health and disease*. J Leukoc Biol, 2010. 88(3): p. 463-73.
90. Kucia, M., et al., *The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2006. 54(2): p. 121-35.
91. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. J Exp Med, 1997. 185(1): p. 111-20.
92. Hattori, K., et al., *Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells*. Blood, 2001. 97(11): p. 3354-60.
93. Smith, M.C., et al., *CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer*. Cancer Res, 2004. 64(23): p. 8604-12.
94. Phillips, R.J., et al., *The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. 167(12): p. 1676-86.
95. Geminder, H., et al., *A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma*. J Immunol, 2001. 167(8): p. 4747-57.
96. Schioppa, T., et al., *Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia*. J Exp Med, 2003. 198(9): p. 1391-402.
97. Schutyser, E., et al., *Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells*. Eur Cytokine Netw, 2007. 18(2): p. 59-70.

98. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature, 1992. 359(6398): p. 843-5.
99. Zagzag, D., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion*. Lab Invest, 2006. 86(12): p. 1221-32.
100. Xie, K., *Interleukin-8 and human cancer biology*. Cytokine & growth factor reviews, 2001. 12(4): p. 375-391.
101. Singh, R.K. and B.L. Lokeshwar, *The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth*. Cancer Res, 2011. 71(9): p. 3268-77.
102. Princen, K., et al., *Evaluation of SDF-1/CXCR4-induced Ca²⁺ signaling by fluorometric imaging plate reader (FLIPR) and flow cytometry*. Cytometry A, 2003. 51(1): p. 35-45.
103. Shen, X., et al., *Chemokine receptor CXCR4 enhances proliferation in pancreatic cancer cells through AKT and ERK dependent pathways*. Pancreas, 2010. 39(1): p. 81-7.
104. Jiang, C., et al., *Effect of CXCR4 on Apoptosis in Osteosarcoma Cells via the PI3K/Akt/NF-kappabeta Signaling Pathway*. Cell Physiol Biochem, 2018. 46(6): p. 2250-2260.
105. Lu, D.Y., et al., *SDF-1alpha up-regulates interleukin-6 through CXCR4, PI3K/Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in microglia*. Eur J Pharmacol, 2009. 613(1-3): p. 146-54.
106. Zhu, X., et al., *Expression and function of CXCL12/CXCR4/CXCR7 in thyroid cancer*. Int J Oncol, 2016. 48(6): p. 2321-9.
107. Rajagopal, S., et al., *Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(2): p. 628-32.
108. Hattermann, K., et al., *The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects*. Cancer Res, 2010. 70(8): p. 3299-308.
109. Zhang, H., et al., *Gene expression profile analyze the molecular mechanism of CXCR7 regulating papillary thyroid carcinoma growth and metastasis*. J Exp Clin Cancer Res, 2015. 34: p. 16.
110. Onoue, T., et al., *Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells*. Int J Oncol, 2006. 29(5): p. 1133-8.
111. Yu, H., L. Zhang, and P. Liu, *CXCR7 signaling induced epithelial-mesenchymal transition by AKT and ERK pathways in epithelial ovarian carcinomas*. Tumour Biol, 2015. 36(3): p. 1679-83.

112. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. 112(12): p. 1776-84.
113. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. 139(5): p. 871-90.
114. Li, Y., et al., *Regulation of EMT by Notch signaling pathway in tumor progression*. Curr Cancer Drug Targets, 2013. 13(9): p. 957-62.
115. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. 15(3): p. 178-96.
116. Yang, J. and R.A. Weinberg, *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis*. Dev Cell, 2008. 14(6): p. 818-29.
117. Bai, R., et al., *Symmetrical bis-tertiary amines as novel CXCR4 inhibitors*. Eur J Med Chem, 2016. 118: p. 340-50.
118. Grande, F., et al., *An update on small molecules targeting CXCR4 as starting points for the development of anti-cancer therapeutics*. Eur J Med Chem, 2017. 139: p. 519-530.
119. De Clercq, E., et al., *Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100*. Antimicrob Agents Chemother, 1994. 38(4): p. 668-74.
120. Kalatskaya, I., et al., *AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties*. Mol Pharmacol, 2009. 75(5): p. 1240-7.
121. Devine, S.M., et al., *Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 2004. 22(6): p. 1095-102.
122. De Clercq, E., *The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil)*. Biochem Pharmacol, 2009. 77(11): p. 1655-64.
123. Zhan, W., et al., *Discovery of small molecule CXCR4 antagonists*. J Med Chem, 2007. 50(23): p. 5655-64.
124. Li, S.H., et al., *Suppression of chronic lymphocytic leukemia progression by CXCR4 inhibitor WZ811*. Am J Transl Res, 2016. 8(9): p. 3812-3821.
125. Kim, S.Y., et al., *Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases*. Clin Exp Metastasis, 2008. 25(3): p. 201-11.
126. Porvasnik, S., et al., *Effects of CXCR4 antagonist CTCE-9908 on prostate tumor growth*. Prostate, 2009. 69(13): p. 1460-9.
127. Rubin, J.B., et al., *A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(23): p. 13513-8.
128. Werner, T.A., et al., *Survivin and XIAP: two valuable biomarkers in medullary thyroid carcinoma*. Br J Cancer, 2016. 114(4): p. 427-34.

129. Gospodarowicz, M.K., J.D. Brierley, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons, 2017. 8: p.51-54.
130. *Guideline for Good Clinical Practice E6 (R2) Integrated Addendum*. ICH website, June 2015. Available from: <http://www.ich.org/products/guidelines/efficacy/efficacy-single/article/integrated-addendum-good-clinical-practice.html>
131. *The Helsinki Declaration of the World Medical Association (WMA). Ethical principles of medical research involving human subjects*. Pol Merkur Lekarski, 2014. 36(215): p. 298-301.
132. Bastidas, O., *Cell counting with Neubauer chamber, basic hemocytometer usage*. Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting, 2013. Available from: <https://de.scribd.com/document/116101966/Cell-Counting-Neubauer-Chamber>
133. Strober, W., *Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability*. Curr Protoc Immunol, 2015. 111: p. A3.B.1-3.
134. Shaw, L.M., *Tumor cell invasion assays*, in *Cell Migration*. Springer, 2005. p. 97-105.
135. Alsharif, R. and W. Godfrey, *Bacterial detection and live/dead discrimination by flow cytometry*. Microbial Cytometry Application Note. BD Biosciences, Immunocytometry Systems, 2002. Available from: https://www.bdbiosciences.com/documents/Bacterial_Detection_Live_Dead.pdf
136. Hoppe, T., *Untersuchungen zur Entwicklungsphysiologie und molekularen Phylogenetik ausgewählter Vertreter der Myxomyceten und zur Photosynthese fähiger Eugleniden (Organismenreich Protoctista)*. kassel university press GmbH, 2009. p. 45-46.
137. Holzapfel, B. and L. Wickert, *Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete*. Biologie in unserer Zeit, 2007. 37(2): p. 120-126.
138. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. 155: p. 335-50.
139. Livak, K.J., et al., *Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization*. Genome Research, 1995. 4(6): p. 357-362.
140. Didenko, V.V., *DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications*. Biotechniques, 2001. 31(5): p. 1106.
141. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of clinical investigation, 2009. 119(6): p. 1420-1428.
142. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nature Reviews Cancer, 2002. 2(6): p. 442.

143. Baum, B., J. Settleman, and M.P. Quinlan, *Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease*. Semin Cell Dev Biol, 2008. 19(3): p. 294-308.
144. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. 25(4): p. 402-8.
145. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. 72(1): p. 248-254.
146. Sternberger, L.A., et al., *The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1970. 18(5): p. 315-333.
147. Remmele, W., et al., *Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1986. 409(2): p. 127-47.
148. McShane, L.M., et al., *REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK)*. Nat Clin Pract Urol, 2005. 2(8): p. 416-22.
149. Merighi, A. and L. Lossi, *Immunocytochemistry and related techniques*. Springer, 2015. 101: p. 1-35.
150. Akaike, H., *Akaike's information criterion*, in *International encyclopedia of statistical science*. 2011, Springer. p. 25-25.
151. Werner, T.A., et al., *CXCR4/CXCR7/CXCL12-Axis in Follicular Thyroid Carcinoma*. J Cancer, 2018. 9(6): p. 929-940.
152. Werner, T.A., et al., *CXCR4/CXCR7/CXCL12 axis promotes an invasive phenotype in medullary thyroid carcinoma*. Br J Cancer, 2017. 117(12): p. 1837-1845.
153. Ernani, V., et al., *Systemic treatment and management approaches for medullary thyroid cancer*. Cancer Treat Rev, 2016. 50: p. 89-98.
154. Licitra, L., et al., *Multikinase inhibitors in thyroid cancer*. Eur J Cancer, 2010. 46(6): p. 1012-8.
155. Chow, M.T. and A.D. Luster, *Chemokines in cancer*. Cancer Immunol Res, 2014. 2(12): p. 1125-31.
156. Heckmann, D., et al., *The disparate twins: a comparative study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1alpha-induced gene expression, invasion and chemosensitivity of colon cancer*. Clin Cancer Res, 2014. 20(3): p. 604-16.

157. Krieg, A., et al., *CXCR4--A Prognostic and Clinicopathological Biomarker for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Meta-Analysis*. PLoS One, 2015. 10(6): p. e0130192.
158. Nazari, A., H. Khorramdelazad, and G. Hassanshahi, *Biological/pathological functions of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axes in the pathogenesis of bladder cancer*. Int J Clin Oncol, 2017. 22(6): p. 991-1000.
159. Lv, S., et al., *The association of CXCR4 expression with prognosis and clinicopathological indicators in colorectal carcinoma patients: a meta-analysis*. Histopathology, 2014. 64(5): p. 701-12.
160. Liu, C.F., et al., *The prognostic value of CXCR4 in ovarian cancer: a meta-analysis*. PLoS One, 2014. 9(3): p. e92629.
161. Lv, S., et al., *The Clinical Implications of Chemokine Receptor CXCR4 in Grade and Prognosis of Glioma Patients: A Meta-Analysis*. Mol Neurobiol, 2015. 52(1): p. 555-61.
162. Lu, C.L., et al., *CXCR4 heterogeneous expression in esophageal squamous cell cancer and stronger metastatic potential with CXCR4-positive cancer cells*. Dis Esophagus, 2014. 27(3): p. 294-302.
163. Wu, Z., et al., *Clinicopathological significance of chemokine receptor CXCR4 expression in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis*. Minerva Endocrinol, 2018: p. 576-583.
164. De Falco, V., et al., *Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer*. Cancer research, 2007. 67(24): p. 11821-11829.
165. Dang, S., et al., *Stimulation of TLR4 by LMW-HA induces metastasis in human papillary thyroid carcinoma through CXCR7*. Clin Dev Immunol, 2013. 2013: p. 712561.
166. Wagner, P.L., et al., *The chemokine receptors CXCR4 and CCR7 are associated with tumor size and pathologic indicators of tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma*. Ann Surg Oncol, 2008. 15(10): p. 2833-41.
167. Yopp, A.C., et al., *CXCR4 expression predicts patient outcome and recurrence patterns after hepatic resection for colorectal liver metastases*. Ann Surg Oncol, 2012. 19 Suppl 3: p. S339-46.
168. Schrevel, M., et al., *CXCR7 expression is associated with disease-free and disease-specific survival in cervical cancer patients*. Br J Cancer, 2012. 106(9): p. 1520-5.
169. D'Alterio, C., et al., *Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2010. 10(7): p. 772-81.
170. Lin, Y., et al., *The CXCL12-CXCR4 axis promotes migration, invasiveness, and EMT in human papillary thyroid carcinoma B-CPAP cells via NF-kappaB signaling*. Biochem Cell Biol, 2018. 96(5): p. 619-626.

171. Hwang, J.H., et al., *CXC chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003. 88(1): p. 408-416.
172. Jung, Y.H., et al., *Antitumor effect of CXCR4 antagonist AMD3100 on the tumorigenic cell line of BHP10-3 papillary thyroid cancer cells*. Head Neck, 2016. 38(10): p. 1479-86.
173. Del Molino Del Barrio, I., et al., *Breast Cancer: An Examination of the Potential of ACKR3 to Modify the Response of CXCR4 to CXCL12*. Int J Mol Sci, 2018. 19(11), p. 3592.
174. Liu, Z., et al., *The involvement of CXCR7 in modulating the progression of papillary thyroid carcinoma*. J Surg Res, 2014. 191(2): p. 379-88.
175. Duan, Y., et al., *Targeted silencing of CXCR4 inhibits epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma*. Oncol Lett, 2016. 12(3): p. 2055-2061.
176. Wang, X., et al., *CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of CXCR4 decreases the malignancy of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo*. Oncol Rep, 2017. 37(6): p. 3565-3571.
177. Wu, Y.C., et al., *CXCR7 mediates TGFbeta1-promoted EMT and tumor-initiating features in lung cancer*. Oncogene, 2016. 35(16): p. 2123-32.
178. Mendez, M.G., S. Kojima, and R.D. Goldman, *Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition*. Faseb j, 2010. 24(6): p. 1838-51.
179. Satelli, A. and S. Li, *Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy*. Cell Mol Life Sci, 2011. 68(18): p. 3033-46.
180. Albert, S., et al., *Prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in patients with squamous cell carcinoma of the mobile tongue*. Oral Oncol, 2012. 48(12): p. 1263-71.
181. Beavon, I.R., *The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation*. Eur J Cancer, 2000. 36(13 Spec No): p. 1607-20.
182. Woodman, N., et al., *Two E-selectin ligands, BST-2 and LGALS3BP, predict metastasis and poor survival of ER-negative breast cancer*. Int J Oncol, 2016. 49(1): p. 265-75.
183. Matsuda, A., et al., *Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways*. Oncogene, 2003. 22(21): p. 3307-18.
184. Teishima, J., et al., *Accumulation of FGF9 in prostate cancer correlates with epithelial-to-mesenchymal transition and induction of VEGF-A expression*. Anticancer Res, 2014. 34(2): p. 695-700.

185. Ueng, T.H., et al., *Potential roles of fibroblast growth factor-9 in the benzo(a)pyrene-induced invasion in vitro and the metastasis of human lung adenocarcinoma*. Arch Toxicol, 2010. 84(8): p. 651-60.
186. Ren, C., et al., *The anti-apoptotic and prognostic value of fibroblast growth factor 9 in gastric cancer*. Oncotarget, 2016. 7(24): p. 36655-36665.
187. Yang, J., et al., *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. Cell, 2004. 117(7): p. 927-39.
188. Cano, A., et al., *The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression*. Nat Cell Biol, 2000. 2(2): p. 76-83.
189. Battle, E., et al., *The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells*. Nat Cell Biol, 2000. 2(2): p. 84-9.
190. Wu, J., et al., *Expression of EMT regulators TWIST, SLUG, and SNAIL in follicular thyroid tumours may relate to widely invasive, poorly differentiated, and distant metastasis*. Histopathology, 2019; 74(5): p. 780-791.
191. Salerno, P., et al., *TWIST1 plays a pleiotropic role in determining the anaplastic thyroid cancer phenotype*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. 96(5): p. E772-81.
192. Hardy, R.G., et al., *Snail family transcription factors are implicated in thyroid carcinogenesis*. Am J Pathol, 2007. 171(3): p. 1037-46.
193. Taromi, S., et al., *CXCR4 antagonists suppress small cell lung cancer progression*. Oncotarget, 2016. 7(51): p. 85185-85195.
194. Uchida, D., et al., *Involvement of an autocrine stromal cell derived factor-1/CXCR4 system on the distant metastasis of human oral squamous cell carcinoma*. Mol Cancer Res, 2007. 5(7): p. 685-94.
195. Hendrix, C.W., et al., *Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2004. 37(2): p. 1253-62.
196. Jung, S.H., et al., *DJ-1 protein regulates CD3+ T cell migration via overexpression of CXCR4 receptor*. Atherosclerosis, 2014. 235(2): p. 503-9.
197. Mooring, S.R., et al., *Synthesis of pyridine derivatives as potential antagonists of chemokine receptor type 4*. Heterocyclic communications, 2014. 20(3): p. 149-153.
198. Zhou, Y., et al., *The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 chemokine axis: Oncogenic properties, molecular targeting, and synthetic and natural product CXCR4 inhibitors for cancer therapy*. Chin J Nat Med, 2018. 16(11): p. 801-810.
199. Ganju, R.K., et al., *The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways*. J Biol Chem, 1998. 273(36): p. 23169-75.

200. Hainsworth, J.D., et al., *A Randomized, Open-Label Phase 2 Study of the CXCR4 Inhibitor LY2510924 in Combination with Sunitinib Versus Sunitinib Alone in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma (RCC)*. *Target Oncol*, 2016. 11(5): p. 643-653.
201. Salgia, R., et al., *A randomized phase II study of LY2510924 and carboplatin/etoposide versus carboplatin/etoposide in extensive-disease small cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2017. 105: p. 7-13.
202. Pernas, S., et al., *Balixafortide plus eribulin in HER2-negative metastatic breast cancer: a phase I, single-arm, dose-escalation trial*. *Lancet Oncol*, 2018. 19(6): p. 812-824.
203. Cortes, J., et al., *Phase II Study of the Halichondrin B Analog Eribulin Mesylate in Patients With Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer Previously Treated With an Anthracycline, a Taxane, and Capecitabine*. *Journal of Clinical Oncology*, 2010. 28(25): p. 3922-3928.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der Neuerkrankungs- und Sterbefälle.....	2
Abbildung 2: Tumorzell dissemination und –invasion.....	13
Abbildung 3: Aufbau und Wirkungsweise der <i>Invasion Chambers</i>	29
Abbildung 4: Beispielhaftes Ergebnis einer FACS-Analyse.....	31
Abbildung 5: Prinzip der Hybridierungssonden.....	35
Abbildung 6: Schematischer Aufbau einer <i>Blotting</i> -Kassette.....	39
Abbildung 7: Prinzip der immunhistochemischen Färbung.....	41
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung des FTC- <i>Tissue Microarrays</i> für CXCR4 und CXCR7.....	48
Abbildung 9: Expression von CXCR4 und CXCR7 in Normal- und Tumorgewebe des FTC.....	49
Abbildung 10: Vergleich der CXCR4- und CXCR7-Rezeptorexpression im FTC-Primärtumor mit klinisch-pathologischen Parametern.....	50
Abbildung 11: Univariate Überlebensanalyse von Patienten mit FTC.....	53
Abbildung 12: Regressionsbaum-Analyse zur Ermittlung der Variablen- konstellation mit dem höchsten Sterberisiko.....	55
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung des MTC- <i>Tissue Microarrays</i> für CXCR4 und CXCR7.....	58
Abbildung 14: Expression von CXCR4 in Normal- und Tumorgewebe des MTC.....	59
Abbildung 15: Vergleich der CXCR4-Rezeptorexpression im MTC-Primärtumor mit klinisch-pathologischen Variablen.....	60

Abbildung 16: Univariate Überlebensanalyse von Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom.....	63
Abbildung 17: Regressionsanalyse nach Cox.....	65
Abbildung 18: Proteinexpression der CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 4 (CXCR4) und 7 (CXCR7) in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien im <i>Western Blot</i>	66
Abbildung 19: Immunzytochemische Färbung der Karzinomzellen für CXCR4.....	67
Abbildung 20: Immunzytochemische Färbung der Karzinomzellen für CXCR7.....	68
Abbildung 21: Veränderungen der Zellinvasivität nach Behandlung mit spezifischen <i>Compounds</i>	70
Abbildung 22: Zellzyklusanalyse der Schilddrüsenkarzinomzellen mittels FACS nach Stimulation mit rh-SDF1 α	72
Abbildung 23: mRNA-Expression EMT-spezifischer Marker in Schilddrüsenkarzinomzellen nach Stimulation mit rh-SDF1 α	74

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	24
Tabelle 2: Konzentrationen der <i>Compounds</i> für <i>Invasionsassay</i> und Durchflusszytometrie.....	28
Tabelle 3: Ablauf der cDNA-Syntheseschritte im <i>Thermal Cycler</i>	33
Tabelle 4: Zusammensetzung des Trenngels (12 %).....	38
Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels (12 %).....	38
Tabelle 6: Übersicht der für den <i>Western Blot</i> verwendeten Antikörper.....	40
Tabelle 7: Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper...42	
Tabelle 8: Immunreaktiver <i>Score</i> zur Auswertung der Immunhistochemie.....	43
Tabelle 9: Übersicht über die in der Immunzytochemie verwendeten Antikörper.....	44
Tabelle 10: Charakteristiken der Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom.....	46
Tabelle 11: Assoziation der CXCR4-/CXCR7-Expression mit klinisch-pathologischen Variablen im follikulären Schilddrüsenkarzinom.....	51
Tabelle 12: Analyse des Gesamtüberlebens bei Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom.....	54
Tabelle 13: Charakteristiken der Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom.....	56
Tabelle 14: Assoziation der CXCR4-Expression mit klinisch-pathologischen Variablen im medullären Schilddrüsenkarzinom.....	62
Tabelle 15: Analyse des Gesamtüberlebens bei Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom.....	64

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. **ANDREAS KRIEG**, danke ich sehr herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, der Vergabe des interessanten Themas und seine ausgezeichnete Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. **WOLFRAM T. KNOEFEL** danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Klinik.

Ein besonderer Dank gilt meinem hervorragenden Betreuer, Herrn Dr. med. **THOMAS WERNER**, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und immer geduldig und freundlich meine unzähligen Fragen beantwortet und mir stets weitergeholfen hat, wenn ich mal wieder etwas zu hektisch oder zu langsam war.

Thomas, ich wünschte, du könntest heute dabei sein, denn mein Erfolg ist dein Verdienst. Dafür werde ich dir immer von Herzen dankbar sein.

Dem Team der Experimentellen Chirurgischen Forschung des Universitätsklinikums Düsseldorf, vor allem Frau Dr. rer. nat. **BIRTE MÖHLENDICK**, Frau Dr. rer. nat. **SABRINA MERSCH** und Frau **SINA SCHÜTTE**, möchte ich danken für die Hilfsbereitschaft und Ratschläge bei experimentellen Methoden sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und nette Integration in das Team.

Meinen Eltern **URSULA** und **MICHAEL FORSTER** sowie meiner Schwester **GABRIELE SCHRAY** danke ich sehr für die jahrelange finanzielle und moralische Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freundinnen **CONNY FÖRSTER**, **SOPHIA KLEEMANN** und **LARISSA WAHLEFELD** für ihren geistigen Beistand, vor allem in Zeiten der Not, ganz besonders herzlich bedanken.