

Aus der Klinik für Urologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Albers

**Die Rolle der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in
testikulären Keimzelltumoren und deren Mikromilieu**

Dissertation

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

vorgelegt von
Philipp Bierholz

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Daniel Nettersheim

Zweitgutachter: Prof. Dr. James Adjaye

Publikation assoziiert mit dieser Studie

Wakileh GA, **Bierholz P**, Kotthoff M, Skowron MA, Bremmer F, Stephan A, Anbuhl SM, Heukers R, Smit MJ, Ströbel P, Nettersheim D. Molecular characterization of the CXCR4 / CXCR7 axis in germ cell tumors and its targetability using nanobody-drug-conjugates. *Exp Hematol Oncol*. 2023 Nov 23;12(1):96. doi: 10.1186/s40164-023-00460-9. PMID: 37996954; PMCID: PMC10668499.

Zusammenfassung

Testikuläre Keimzelltumoren (KZT) sind bei Männern im Alter von 14 - 44 Jahren die häufigste Tumorerkrankung. Obwohl die Prognose im Allgemeinen sehr gut ist, kann die Erkrankung aufgrund der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegenüber der Standard-Cisplatin-basierten Chemotherapie tödlich verlaufen. Hier bietet die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse einen neuen Forschungsansatz für zusätzliche Therapiemöglichkeiten. Die Chemokin-Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR, „*G protein-coupled receptor*“), welche durch ihren gemeinsamen Liganden, dem aus dem Tumor-Mikromilieu (z. B. von Fibroblasten) sezernierten Chemokin CXCL12, aktiviert werden. Folglich können nachgeschaltete Signalwege der MAP-Kinase, NF- κ B, AKT / PKB oder auch JAK / STAT aktiviert werden.

In vielen Tumoren (u.a. in KZT) sind Zellen CXCR4 und / oder CXCR7 positiv; z.B. beim Mamma-, Kolorektal- oder dem Prostatakarzinom ist bekannt, dass die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12 -Achse eine Schlüsselrolle in der Proliferation, Migration, Angiogenese und Tumorerkrankung spielt und mit einer schlechten Prognose einhergeht. Somit bietet diese Achse ein therapeutisches Ziel, welches als Medikament bereits für Non-Hodgkin-Lymphome mit dem CXCR4-Antagonisten „Plerixafor“ durch die europäische und amerikanische Arzneimittelbehörde zugelassen ist.

Das Ziel der Promotionsarbeit war die Aufschlüsselung der molekularen Mechanismen der aus Fibroblasten sezernierten CXCL12-Stimulation in testikulären KZT; insbesondere sollte erforscht werden, welche Signalwege durch CXCL12-Stimulation aktiviert werden, da dies in testikulären KZT unzureichend bekannt ist. Zudem sollte herausgefunden werden, welchen Einfluss die Achse auf die Migration und Proliferation von Keimzelltumor-Zellen hat und ob CXCR4 und CXCR7 Ziele für neue Therapiemöglichkeiten darstellen. Insgesamt konnten durch Western-Blot-Analysen, PCRs und Human-Phospho-Kinase-Arrays in dieser Arbeit mehrere Signalwege in KZT, welche unter dem Einfluss der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse stehen identifiziert werden (z.B. p53). Zusätzlich wurde mittels Zellviabilitäts-, Apoptose- und Zellzyklusanalysen ein CXCR4-spezifisches Nanobody-Wirkstoff-Konjugat als mögliche therapeutische Option in KZT identifiziert.

Summary (english)

Testicular germ cell tumors (GCT) are the most common type of cancer in men aged 14–44. Although the prognosis is generally very good, the disease can be fatal due to the development of resistance mechanisms to standard cisplatin-based chemotherapy. Here, the CXCR4 / CXCR7 / CXCL12 axis offers a new research approach for additional therapeutic options. The chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 are G protein-coupled receptors (GPCR) that are activated by their common ligand, the chemokine CXCL12, which is secreted from the tumor microenvironment (for example fibroblasts). Consequently, downstream signaling pathways of MAP kinase, NF- κ B, AKT / PKB or JAK / STAT can be activated.

In many tumors (including GCT), cells are CXCR4 and/or CXCR7 positive, such as breast, colorectal, or prostate cancer, the CXCR4 / CXCR7 / CXCL12 axis is known to play a key role in proliferation, migration, angiogenesis, and tumor invasion and is associated with a poor prognosis. This axis therefore offers a therapeutic target, which has already been approved as a drug for non-Hodgkin's lymphoma by the European and American drug authorities with the CXCR4 antagonist "Plerixafor".

The aim of the doctoral thesis was to break down the molecular mechanisms of CXCL12 stimulation secreted from fibroblasts in testicular germ cell tumors; in particular, the aim was to investigate which signaling pathways are activated by CXCL12 stimulation, as this is insufficiently known in testicular germ cell tumors. In addition, the aim was to determine the influence of the axis on the migration and proliferation of germ cell tumor cells and whether CXCR4 and CXCR7 represent targets for new therapeutic options. Overall, Western blot analyses, PCRs and human phospho-kinase arrays in this study identified several signaling pathways in GCT that are influenced by the CXCR4/CXCR7/CXCL12 axis (for example p53). In addition, cell viability, apoptosis, and cell cycle analyses identified a CXCR4-specific nanobody drug conjugate as a potential therapeutic option in GCT.

Abkürzungsverzeichnis

°C: Celsius

µg: Mikrogramm

µL: Mikroliter

µM: Mikromolar

ADC: Antibody-drug-conjugates

AFP: alpha-1-Fetoprotein

Akt: Ak-Thymoma

AKT/PKB: Protein Kinase B

AP-1: Activator Protein-1

APS: Ammoniumperoxodisulfat

BCA: Bicinchoninsäure

BCL2: B-cell lymphoma 2

BMP2, BMP4, BMP8b: Bone Morphogenetic Protein 2, 4, 8b

BSA: Bovine Serum Albumin

BV: Brentuximab Vedotin

Bzw.: Beziehungsweise

c-Jun: C-Jun N-Terminal Kinase

CaMK: Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase

CC: Chorionkarzinom

CCND1: Cyclin D1

CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A

cDNA: Komplementäre Desoxyribonukleinsäure

CDR3: Complementarity-Determining Region 3

CFOS: FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog

CO₂: Kohlendioxid

CREB: CAMP Response Element-Binding Protein

CT: C-terminal

Ct-Wert: Zyklusschwellenwert

CXCL12: C-X-C Motif Chemokine Ligand 12

CXCR4: C-X-C Chemokine Receptor Type 4

CXCR7: C-X-C Chemokine Receptor Type 7

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid
DNA: Desoxyribonukleinsäure
dNTP: Desoxynukleotidtriphosphat
DOC: Sodium Deoxycholat
EC: Embryonalkarzinom
EC50: Halbmaximale effektive Konzentration
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases
Et al. : Und andere
FACS: Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
Fas: First apoptosis signal receptor
FBS: Fetales Rinderserum (Fetal Bovine Serum)
FCS: Fetales Kälberserum
FITC: Fluorescein Isothiocyanate
GCNIS: germ cell neoplasia in situ
GCT72: YST-Zelllinie
GPCR: G protein-coupled receptor
GSK-3: Glycogen Synthase Kinase 3
GY: Gray
h: Stunde
H2O: Wasser
Hdm2: Human double minute 2 homolog
HEK293: Human Embryonic Kidney 293 cells
HRP: Horseradish Peroxidase
HSP60: Heat Shock Protein 60
HVHF2: Fibroblasten-Zelllinie
IGCCCG: International Germ Cell Cancer Cooperative Group
IL6: Interleukin 6
ITGA4: Integrin Alpha 4
JAK: Janus Kinase
JAK/STAT: Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
JAR, JEG-3: CC-Zelllinien
JUN: Jun Proto-Oncogene

KZT: Keimzelltumoren
L-Glutamin: Eine Aminosäure
LD50: Letale Dosis, bei der 50 % der Population sterben
LDH: Lactatdehydrogenase
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MMAE: Monomethyl-Auristatin E
mg: Milligramm
min: Minute
mL: Milliliter
mM: Millimolar
MMP: Matrix Metalloproteinase
MMP1, MMP2, MMP3: Matrix Metallopeptidasen 1, 2, 3
MPAF: Fibroblasten-Zelllinie
mRNA: Messenger RNA
mTOR: mechanistic Target of Rapamycin
NaCl: Natriumchlorid
NCCIT: Embryonal carcinoma cell line
NDC: Nanobody-Drug Conjugate
NEAA: Nicht-essenzielle Aminosäuren
NF- κ B: Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS: Phosphatpufferlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR: Polymerase-Kettenreaktion
PEB: Polychemotherapie mit Cisplatin, Etoposid und Bleomycin
pERK: Phosphoryliertes Extracellular Signal-Regulated Kinases
PI: Propidiumiodid
PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase
PKA: Protein Kinase A
PKC: Protein Kinase C
PKZ: Primordiale Keimzellen
PMS: Phenazinmethosulfat
PRAS40: Proline-Rich Akt Substrate 40
P/S: Penicillin/Streptomycin
PYK2: Proline-Rich Tyrosine Kinase 2
qRT-PCR: Quantitative Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion

RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer
 RNA: Ribonukleinsäure
 Rpm: Umdrehungen pro Minute
 RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium
 RSK: Ribosomal S6 Kinase
 s.: siehe
 s. Abb.: siehe Abbildung
 s. u.: siehe unten
 SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
 SEM: Seminom
 SRC: Proto-Onkogen Tyrosin-Protein Kinase Src
 STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription
 STAT1, STAT3, STAT5: Signal Transducer and Activator of Transcription 1, 3, 5
 TCam-2, TCam-2-R: SEM-Zelllinien
 TCGA: The Cancer Genome Atlas
 TE: Tris-EDTA
 TEMED: Tetramethylethylendiamin
 TGCT: Testicular Germ Cell Tumor
 TGFB: Transforming Growth Factor Beta
 TGFB1, TGFB2, TGFB3: Transforming Growth Factor Beta 1, 2, 3
 TIN: testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN)
 TNF-R1: Tumor Necrosis Factor Receptor 1
 TNM: Tumor, Nodus, Metastasen
 Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
 USA: Vereinigte Staaten von Amerika
 VEGFA: Vascular Endothelial Growth Factor A
 WHO: World Health Organization
 WNK1: With No Lysine Kinase 1
 XTT: 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5- sulfo phenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid
 YST: Dottersacktumor
 β -HCG: beta-humanes-Choriongonadotropin
 z.B.: zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Testikuläre Keimzelltumoren	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Risikofaktoren	3
1.1.3 Histopathologische Klassifikation	3
1.1.4 Diagnostik	5
1.1.5 Stadieneinteilung	7
1.1.6 Prognose	7
1.1.7 Therapie.....	8
1.2 Die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in Tumoren.....	10
1.2.1 Die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in der Physiologie von Keimzellen	10
1.2.2 Die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in der Tumorgenese von Keimzellen	11
1.2.3 Die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse als mögliches therapeutisches Ziel in	12
der Tumorthherapie	12
1.3 Zielsetzung der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Humane Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien	14
2.1.2 Materialien der Zellkultur	15
2.1.3 Materialien für RNA-Isolation und Proteinextraktion.....	17
2.1.4 Materialien für cDNA-Synthese	19
2.1.5 Materialien für Quantitative	19
Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	19
2.1.6 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide	20
2.1.7 Materialien für BCA-Protein-Assay	20
2.1.8 Materialien für SDS-PAGE und Western Blot.....	21
2.1.9 Verwendete Antikörper	24
2.1.10 Materialien für Human Phospho-Kinase Array Kit	24
2.1.11 Materialien für XTT-Assay	25
2.1.12 Materialien für den Apoptose-Assay.....	26
2.1.13 Materialien für die durchflusszytometrische.....	27
Zellzyklus-Analyse	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Kultivierung	28
2.2.2 RNA- und Proteinisolierung	28
2.2.3 cDNA-Synthese	30
2.2.4 qRT-PCR	30
2.2.5 BCA-Protein-Assay.....	32

2.2.6 Herstellung Polyacrylamid-Gele	33
2.2.7 SDS-Page und Western Blot	33
2.2.8 Western Blot Membran-Stripping	34
2.2.9 Human Phospho Kinase Array	34
2.2.10 XTT-Assay	36
2.2.11 Bestimmung der EC ₅₀ -Werte	37
2.2.12 Zellzyklus-Analysen und Apoptose Messungen	37
2.2.13 Zellzyklusmessungen mittels Durchflusszytometrie	37
2.2.14 Apoptose-Assay mittels Durchflusszytometrie.....	38
2.2.15 Online Tools.....	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Molekulare Charakterisierung testikulärer Keimzelltumoren	39
3.1.1 Analyse der mRNA-Expression molekularer Targets in testikulären Keimzelltumoren	39
3.1.2 Analyse der Expressionsmuster identifizierter Zielgene in testikulären Keimzelltumoren nach CXCL12-Stimulation.....	40
3.1.3 Analyse der Aktivierung des MAPK-Signalwegs in CXCR4 ⁺ -und CXCR7 ⁺ -YST	43
3.1.4 ERK (MAPK)-Inhibition induziert CXCR4- und CXCR7-Expression in EC	45
3.1.5 Analyse der mRNA-Expression molekularer Targets in EC nach MAPK-Inhibition	47
3.1.6 Analyse des Human Phospho Kinase Array.....	49
3.2 CXCR4-MMAE gekoppelte Nanobodies als therapeutische Option zur Behandlung testikulärer Keimzelltumoren	52
3.2.1 CXCR4-MMAE gekoppelte Nanobodies verringern die Zellviabilität von testikulären Keimzelltumoren.....	52
3.2.2 CXCR4-MMAE gekoppelte Nanobodies induzieren Apoptose und Zellzyklusarrest in testikulären Keimzelltumoren.....	56
4. Diskussion.....	59
4.1 Die CXCL12-Wirkkaskade in testikulären Keimzelltumoren auf mRNA-Ebene ..	59
4.2 Verringerte MAPK-Signalisierung in CXCL12-stimulierten KZT	64
4.3 Die molekulare Rolle der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse auf Phospho-Proteom-Level	65
4.4 Verringerung von Zellviabilität, sowie Induktion von Apoptose und Zellzyklusveränderungen in KZT durch CXCR4-MMAE gekoppelte Nanobodies.....	69
4.5 Schlussfolgerung.....	73
Literaturverzeichnis.....	74
Anhang.....	82
Danksagung.....	87

1. Einleitung

1.1 Testikuläre Keimzelltumoren

1.1.1 Epidemiologie

Typ 2 testikuläre Keimzelltumoren (KZT) sind bei Männern im Alter von 14 bis 44 Jahren die häufigste Tumorerkrankung.¹ Der Anteil der KZT an neu-diagnostizierten Tumorerkrankungen bei Männern beträgt weltweit zwar nur ca. 1 %, jedoch zeigen sich hierbei große Unterschiede je nach Region; so beträgt die Inzidenz in großen Teilen Afrikas und Asiens < 1 betroffene Personen pro 100.000 Individuen, in Europa jedoch > 9 / 100.000.^{1,2} Eine erhöhte Inzidenz von KZT ist neben Europa auch in Nordamerika, Australien und Neuseeland zu beobachten (s. Abb. 1).² Jedoch lässt sich erkennen, dass die Inzidenz generell weltweit zunimmt.^{1,2} Im Gegensatz zur relativ hohen Inzidenz in den zuvor genannten Regionen ist die Mortalität in diesen Ländern vergleichsweise gering; schaut man dagegen auf die weniger entwickelten Länder, so zeigt sich trotz der vergleichsweise niedrigeren Inzidenz zu den Industrienationen eine erhöhte Mortalität.^{1,2} Dies lässt darauf schließen, dass in diesen Staaten eine dringende Verbesserung der Therapie nötig ist.¹

Betrachtet man die Patienten mit diagnostizierten KZT weltweit, werden ca. 50 % mit einem Seminom (SEM, s. histopathologische Klassifikation) diagnostiziert; die anderen 50 % werden mit Nicht-SEM oder Mischformen (s. histopathologische Klassifikation) diagnostiziert. Somit stellt das SEM die weitaus häufigste Form von KZT dar.¹

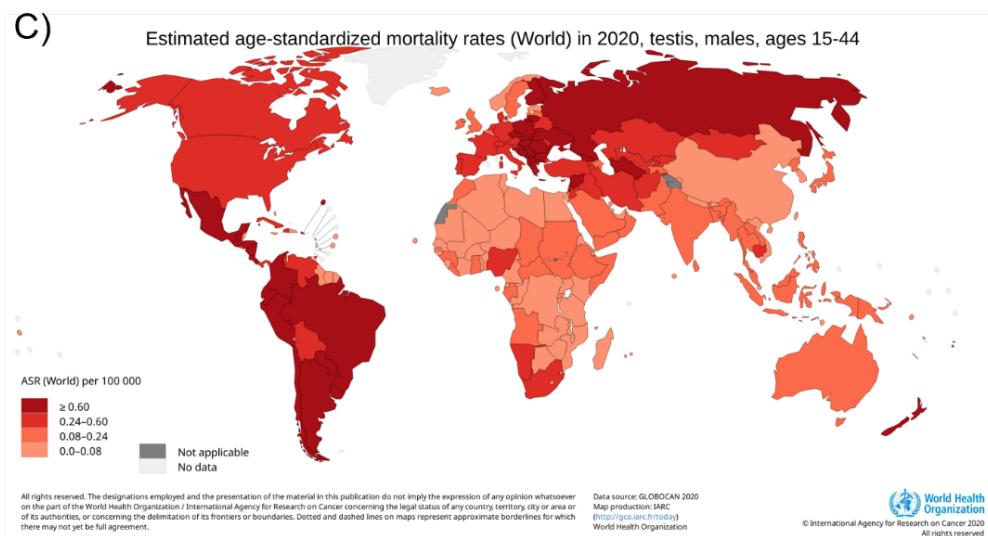
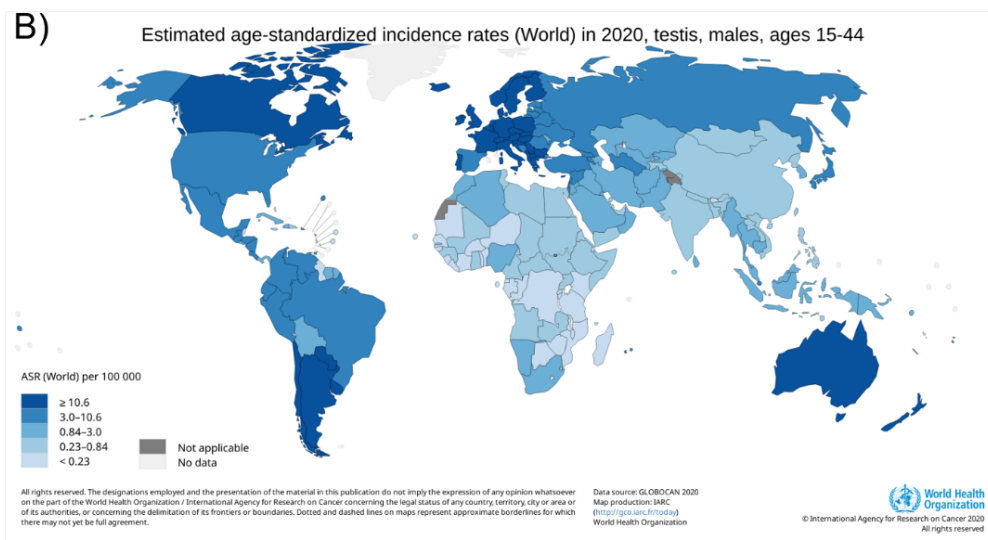
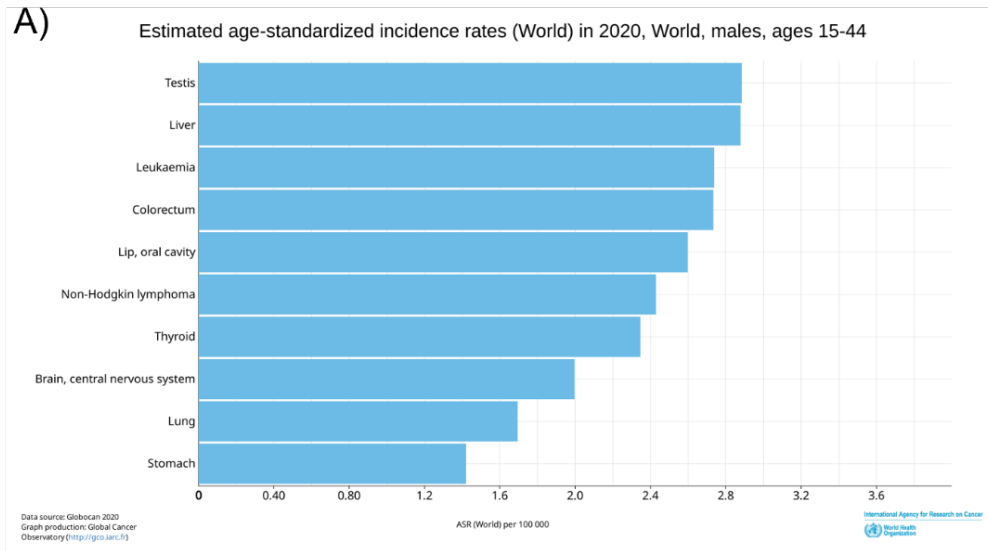


Abb 1: geschätzte, altersstandardisierte Raten an A) Anteil B) Inzidenz C) Mortalität testikulärer Keimzelltumoren bei Männern zwischen 15-44 Jahren, weltweit, 2020. ²

1.1.2 Risikofaktoren

Der bekannteste und signifikanteste Risikofaktor, der zur Ausbildung eines KZT führen kann, ist der Kryptorchismus, welcher das Risiko um das 5-fache erhöht.¹ Hierbei handelt es sich um einen angeborenen Defekt, bei dem mindestens ein Hoden im Skrotum fehlt. Normalerweise wandern die Hoden zwischen der 25. und 33. Schwangerschaftswoche durch den Leistenkanal in den Hodensack ein. Geschieht dies nicht oder nur unvollständig, spricht man vom Kryptorchismus.³ Weitere bekannte Risikofaktoren sind Hypospadie (eine kongenitale Fehlbildung, bei der die Harnröhre nicht an der Penisspitze endet), eine niedrige Spermienanzahl, Infertilität, Körpergröße > 195 cm, Mikrolithiasis, testikuläres Dysgenesie-Syndrom und Verwandte ersten Grades mit Hodentumor; ein ebenfalls erhöhtes Risiko haben Patienten mit einem kontralateralen Hodentumor oder einer Keimzellneoplasie-in-situ (GCNIS, aus dem Englischen „*germ cell neoplasia in situ*“, s.u.).^{1,4}

1.1.3 Histopathologische Klassifikation

KZT werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO, aus dem Englischen „World Health Organization“) in drei verschiedene Subtypen eingeteilt, wobei Typ 2-KZT mit einer GCNIS in Zusammenhang stehen, Typ 1-KZT (Patienten < 14 Jahren) und Typ 3-KZT (Patienten > 52 Jahren) jedoch nicht.¹ (s. Abb.2)

Typ 1-KZT manifestieren sich also in der Regel vor der Pubertät und sind typischerweise Teratome oder Dottersacktumoren (YST); ihre Pathogenese ist Gegenstand aktueller Forschung, es wird jedoch angenommen, dass die Tumoren sich aus embryonalen Stammzellen entwickeln, deren weitere Differenzierung von einem für die Differenzierung suboptimalen Mikromilieu geblockt wird.¹ Statt der normalen Entwicklung zu einer männlichen Keimzelle, entwickeln sich die embryonalen Stammzellen zu pluripotenten somatischen Stammzellen, welche letztendlich in YST oder Teratomen differenzieren.¹

Typ 3-KZT (ehemals: spermatozytische Tumoren) treten vor allem bei älteren Patienten auf und zeigen sich histopathologisch als polymorphe Zellpopulationen aus drei verschiedenen Tumorzellen (klein-, intermediär- und riesenzellig) und sind oftmals gutartig. Ursprungszellen sind hierbei spermatogene Stammzellen.¹

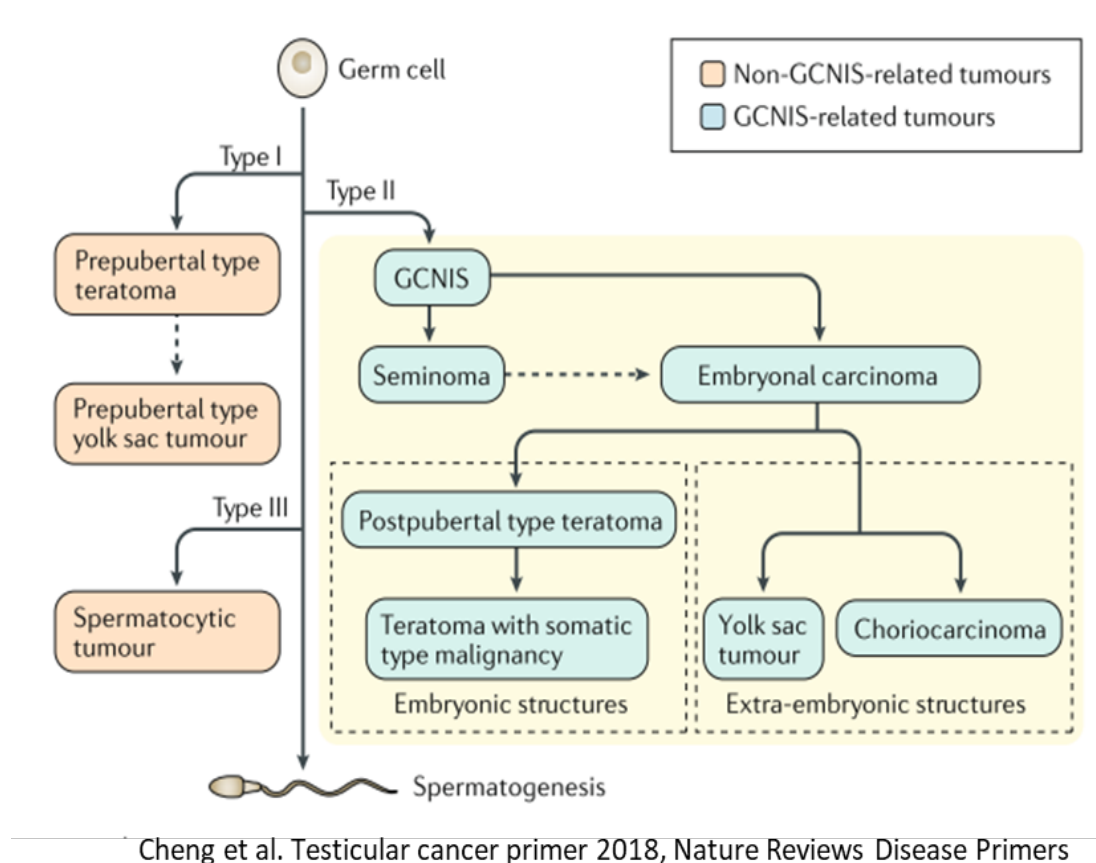


Abb.2: Die verschiedenen Subtypen testikulärer Keimzelltumoren (Lizenziert unter der Referenznummer 59025408605, Springer Verlag)

Der Fokus dieser Doktorarbeit liegt jedoch auf den Typ 2-KZT.⁵ Es wird davon ausgegangen, dass bei der Entstehung von Typ-2-KZT davon aus, dass sich primordiale Keimzellen (PKZ, auch Gonozyten genannt) während der Embryonalentwicklung nicht, wie normalerweise, weiter zu Spermatogonien differenzieren, sondern ihre Pluripotenz beibehalten; diese Zellen besitzen dann das Potential, sich in KZT zu transformieren.⁵ Die Ausbreitung der GCNIS bleibt typischerweise beschränkt auf die Tubuli seminiferi, jedoch entwickeln ca. 70 % der Patienten mit GCNIS einen testikulären KZT innerhalb von sieben Jahren.⁵ Bezüglich ihrer Klassifikation werden Typ 2-KZT in SEM oder Nicht-SEM eingeteilt.¹ Diese können weiterführend in Embryonalkarzinom (EC) als Stammzellpopulation eingeteilt werden, welche sich dann zu Teratomen, Dottersacktumoren (YST) und Chorionkarzinome (CC) entwickeln können.¹ (s. Abb. 2) Dieser Typ-2-Subtyp ist von allen KZT klinisch und histopathologisch am diversesten, da er alle Zelltypen enthalten kann; dies beruht auf der pluripotenten Eigenschaft der Zellen, welche vermutlich auf die GCNIS zurückzuführen ist.¹

1.1.4 Diagnostik

Die Grundlage der Diagnostik bilden Anamnese und die körperliche Untersuchung in Form von Inspektion und Palpation des Hodens.⁴ Bei Symptomen wie z.B. einer schmerzlosen Verhärtung und Vergrößerung des Hodens ist die Diagnose eines KZT zu erwägen.⁴ Die körperliche Untersuchung umfasst neben der Palpation des Hodens auch das Abtasten inguinaler und supraclavikulärer Lymphknoten, sowie der Brustdrüsen und des Abdomens, um eine Lymphknotenmetastasierung abzuklären.⁴ Anschließend ist die beidseitige Sonographie des Hodens als nicht-invasive, kostengünstige Methode indiziert um die Diagnose zu sichern, welche anschließend in der Regel mit einer Ablatio testis (Orchiektomie) bestätigt wird.⁴ Ist die Dignität des Tumors makroskopisch unklar, sollte eine Schnellschnittdiagnostik intraoperativ durchgeführt werden.⁴ Ist zusätzlich die Skrotalwand infiltriert oder das Wachstum des Tumors perforierend, sollte eine Hemiskrotektomie in Betracht gezogen werden.⁴ Bei Ausbildung vital bedrohlicher Metastasen sollte die Ablatio testis nicht primär vorgenommen werden, sondern erst sekundär nach erfolgter Chemotherapie; eine Blutuntersuchung der Serum-Tumormarker AFP (für „alpha-1-Fetoprotein“, ein Glykoprotein-ähnliches Molekül, welches normalerweise in der Leber des Fötus vorkommt), β -HCG (für „beta- Humanes-Choriongonadotropin“, ein Hormon, das physiologisch von der Plazenta während der Schwangerschaft produziert wird) und LDH (für „Lactatdehydrogenase“, ein Enzym, welches ubiquitär im menschlichen Gewebe vorkommt und bei Gewebsschädigungen und Tumoren vermehrt aus Zellen freigesetzt wird) wird zur Primärdiagnostik ebenfalls durchgeführt.^{1,4} Bei diesen Markern handelt es sich mit AFP und β -HCG um spezifische Tumormarker, welche neben der LDH als unspezifischer Tumormarker, zur Diagnostik und zum Monitoring von KZT herangezogen werden, da sie in KZT erhöht sein können.⁶

Laut der europäischen Gesellschaft für Urologie sollen diese Marker vor und nach einer Orchiektomie abgenommen werden, da sie die Diagnose unterstützen und ebenfalls für Staging und Prognose wichtig sein können.⁷ Bezüglich des Stagings der KZT wird des Weiteren die Durchführung einer kontrastverstärkten Computertomographie des Thorax, des Abdomens und des Beckens empfohlen,

da es zuverlässig zur Auffindung von Metastasen beiträgt.⁷ Ein routinemäßiger Einsatz der Magnetresonanztomographie wird, aufgrund ihrer hohen Kosten und hoher Verfügbarkeit der Ultraschallsonographie, nicht empfohlen; als invasives Verfahren dient die Orchiektomie sowohl als diagnostischer Standard, als auch als erste therapeutische Maßnahme testikulärer KZT.⁷ Hierbei sollte auch mit den Patienten der Einsatz einer Prothese besprochen werden, sowie die Durchführung einer kontralateralen Biopsie, zwecks Ausschlusses einer GCNIS im anderen Hoden.⁷ Eine pathologische Mitbeurteilung sollte regelhaft erfolgen.⁷ Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Diagnose von KZT ist die Fertilität der betroffenen Patienten, denn oft sind diese bereits vor Therapiebeginn subfertil und der radikale Eingriff der Orchiektomie, sowie die Chemo- und Strahlentherapie können zur Infertilität der Patienten führen; bei nicht abgeschlossener Familienplanung sollte den Patienten eine Kryokonservierung von Spermien angeboten werden.^{4,7}

1.1.5 Stadieneinteilung

Um nach der Diagnosestellung eines KZT eine mögliche Therapie und Prognose einschätzen zu können, werden verschiedene Staging-/ und Klassifikationssysteme verwendet.⁴ Um die anatomische Ausbreitung des Tumors einteilen zu können, wird die Verwendung der TNM-Klassifikation (*dient der Einteilung von malignen Tumoren in Stadien; die wichtigsten Kategorien des TNM-Systems entsprechen den drei Buchstaben: T = Tumor, Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors N = Nodus, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen, M= Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen*) laut Leitlinie empfohlen.⁴ Wichtig für die Prognose bei metastasierten KZT ist die Einteilung der Tumoren nach der IGCCCG-Klassifikation (aus dem Englischen für „International Germ Cell Cancer Cooperative Group“) von 1997.⁸

1.1.6 Prognose

Aufgrund der zuvor erwähnten Klassifikationssysteme, sowie auf Basis der klinischen Untersuchung können die Patienten mit diagnostiziertem KZT in verschiedene Stadien eingeteilt werden.⁴

Wichtig ist dabei, dass die Stadien unabhängige fünf-Jahres Überlebenswahrscheinlichkeit von KZT- Patienten bei über 95 % liegt; Stadium 1-Patienten weisen dabei sogar ein 10-Jahres-Gesamtüberleben von 95-99 % auf.⁴ Eine ebenfalls gute Prognose mit Heilungsraten von ca. 90-98 %, haben Patienten des Stadiums 2A/B; Patienten die nach IGCCCG-Kriterien in die intermediäre Prognosegruppe eingeteilt werden können liegen hier bei etwa 80 % und Patienten mit schlechter Prognose bei ca. 50 % Langzeitüberleben.⁹ Problematisch ist jedoch, dass Patienten aller Gruppen und ca. 10-15 % der Patienten mit metastasierten Tumoren nicht ausreichend auf die bestehenden Therapiemöglichkeiten ansprechen und trotz optimaler Therapie nicht geheilt werden können, diesen Patienten bleibt oft nur die Möglichkeit einer palliativen Behandlung.¹⁰ Zudem sind diese Tumoren oft resistent gegen die Erstlinientherapie mit Cisplatin und somit bisher nicht gezielt therapierbar.¹¹

1.1.7 Therapie

Grundlage der Therapie bildet die Kombination aus Operation (Orchiektomie), Cisplatin basierter Chemotherapie und in Einzelfällen die Radiotherapie.⁷ Wichtig ist dabei der individuelle Ansatz der Therapie mit differenziertem Staging und frühem Therapiebeginn auf Basis einer multidisziplinären Behandlung der Patienten.⁷ Aufgrund der individualisierten Therapie und der generellen Seltenheit der Krankheit ist es empfohlen, Patienten in spezialisierte Kliniken zu überweisen; zwar können frühe Stadien auch erfolgreich in nicht-spezialisierten Kliniken erfolgreich behandelt werden, jedoch ist hierbei die Rückfallrate höher; außerdem reduziert die Zusammenarbeit mit spezialisierten Zentren das Risiko von Über- oder Untertherapie.⁷

Zunächst sollten KZT operativ behandelt werden; eine Ausnahme bildet hier das Vorhandensein akut vitalbedrohlicher Metastasen, bei denen zunächst mit einer Chemotherapie begonnen werden sollte.⁷ Die Chemotherapie erfolgt je nach Stadium und Subtyp der KZT.⁷ Stadium 1-SEM werden mit ein bis zwei Zyklen Carboplatin (ein Platinhaltiges Zytostatikum, ähnlich Cisplatin) behandelt, sofern der Tumor das Rete testis infiltriert und die Tumorgöße größer gleich 4 cm beträgt.⁷ Stadium 1-Nicht-SEM erhalten bei festgestellter Gefäßinfiltration ein bis zwei Zyklen „PEB“ (Polychemotherapie mit Cisplatin, Etoposid und Bleomycin).⁷ Liegen die Bedingungen bei den jeweiligen Tumortypen nicht vor ist zunächst ein Abwarten mit regelmäßigen Kontrolluntersuchungen indiziert; erst bei Voranschreiten der Erkrankung ist eine aktive Therapie nötig.⁴ Stadium 2- SEM erhalten drei Zyklen PEB oder eine Radiotherapie mit 30 Gy-36 Gy.^{4,7} Stadium 2-Nicht-SEM werden bei erhöhten Tumormarkern ebenfalls mit drei Zyklen PEB behandelt.^{4,7} Sind die Marker negativ, was dafürspricht, dass bisher keine Metastasen vorliegen, kann eine radikale Lymphadenektomie zusätzlich zu 2 - 3 Zyklen PEB in Erwägung gezogen werden.^{4,7} Stadium 3-Tumoren erhalten unabhängig vom Subtyp 3-4 Zyklen PEB.⁷ Versagt die Chemotherapie, sind die Heilungschancen deutlich geringer. Cisplatin-refraktäre KZT sollten deshalb ausschließlich in spezialisierten Zentren behandelt werden.¹¹ Die bisher wirksamste Therapie bei refraktären KZT (51 % der Patienten erreichten eine Remission) besteht dabei aus der Kombinationschemotherapie aus Gemcitabin, Oxaliplatin und Paclitaxel.¹¹

Ein Nachteil sowohl der Strahlen- als auch der Chemotherapie sind vor allem die zahlreichen Nebenwirkungen, die mit dieser Therapie einhergehen: diese erstrecken sich von akuten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Immunsuppression und Anaphylaxie über langfristige Nebenwirkungen wie Unfruchtbarkeit, erektile Dysfunktion, Lungen- und Hauttoxizität, sowie dem Risiko später ein Zweit-Malignom zu entwickeln.⁴ Zusätzlich haben die Patienten ein erhöhtes Risiko für Gefäßerkrankungen, Neuro- und Ototoxizität.^{12,13} Das Risiko an Zweit-Malignomen zu erkranken ist bei diesen Patienten für einen Zeitraum von ca. 35 Jahren nach erfolgter Therapie erhöht.¹⁴ Besonders hervorzuheben ist auch, dass gerade für die in der Regel sehr jungen Patienten, Infertilität und erektile Dysfunktion einen hohen Leidensdruck bedeuten; ebenfalls spielen psychosoziale Belastungen wie Angstzustände und Depressionen einen nicht zu unterschätzenden Faktor.^{11,12} Zwar ist die operative Therapie (s.o. Ablatio testis) alleine nicht so sehr fertilitätseinschränkend, die anschließende adjuvante Chemotherapie erhöht das Risiko jedoch aufgrund zytotoxischer und neurotoxischer Effekte.¹⁵ Ein weiteres Problem der Therapie entsteht, wenn die KZT eine Resistenz gegenüber der Cisplatin-basierten-Standardtherapie entwickeln; die Ursache hierfür scheint multifaktoriell begründet zu sein.¹⁶ Dies betrifft ca. 10-15 % der metastasierten Patienten, von denen nur ca. 50 % mit einer adäquaten Therapie geheilt werden können.¹¹ Dies zeigt, dass weitere Forschung notwendig ist, um auch diesen Patienten eine Therapiemöglichkeit in Zukunft anbieten zu können. Hierbei kann die Untersuchung des Tumor-Mikromilieus in KZT neue Erkenntnisse bringen; es wird vermutet, dass das testikuläre Mikromilieu an der Entstehung von KZT beteiligt ist.¹⁷ Mehrere Daten konnten bereits einen Hinweis darauf geben, dass beispielsweise CXCR4 - Signalwege eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen könnten und somit einen Forschungsansatz für neue Therapiemöglichkeiten bieten.¹⁷ So ist bekannt, dass die Interaktion zwischen CXCL12 und CXCR4 für die Aufrechterhaltung der Nischen adulter Stammzellen verantwortlich ist und *in utero* eine wichtige Rolle bei der Migration primordialer Keimzellen spielt.¹⁸ Darüber hinaus wurde von Gilbert DC, Chandler I, McIntyre A, et al. die Hypothese aufgestellt, dass die CXCL12 / CXCR4-Achse die Invasivität von KZT-Zelllinien *in vitro* induziert und dass CXCL12-Gradienten die Migration von KZT aus den Samenkanälchen vermitteln könnten.¹⁸

1.2 Die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in Tumoren

1.2.1 Die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in der Physiologie von Keimzellen

Die Chemokin-Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR, aus dem Englischen „G protein-coupled receptor“), welche durch ihren gemeinsamen Liganden, dem aus dem Tumor-Mikromilieu (z.B. Fibroblasten) sezernierten Chemokin CXCL12, aktiviert werden.¹⁹ Auf molekularer Ebene werden nach Stimulation durch CXCL12 intrazelluläre Signalwege aktiviert.²⁰ Aus Zellen des Immunsystems (z.B. T- und B-Lymphozyten), CD34-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen, Zellen des Blutgefäß-Endothels, des Zentralnervensystems und des Magen-Darm-Trakts, welche erhöhte Level von CXCR4 und / oder CXCR7 aufweisen, ist bekannt, dass beispielsweise die MAP-Kinase, NF-kB, AKT/PKB, mTOR oder auch JAK/STAT-Signalwege durch die vermehrte Aktivität der Rezeptoren aktiviert werden können.^{19,20} Die Bedeutung der CXCL12 / CXCR4-Achse für die Physiologie und Entwicklung von Keimzellen wurde bereits nachgewiesen.²¹ Während der physiologischen, embryonalen Entwicklung sind sowohl CXCL12, als auch CXCR4 an der Migration von primordialen Keimzellen (PKZ, Vorläufer der Keimzellen, aus denen sich später die Geschlechtszellen bilden) in die Stammzellnische beteiligt.²² Die Hauptaufgabe der PKZ besteht darin, sich zu gametogenen Stammzellen zu differenzieren.²³ In der vierten Woche nach der Befruchtung beginnt die Differenzierung der noch pluripotenten PKZ unter dem Einfluss spezifischer Signalwege wie BMP2, BMP4, BMP8b und SMAD1 in Richtung Keimzellentwicklung.^{24,25} Im weiteren Verlauf konnte in humanen Zellen beobachtet werden, dass die PKZ ab Woche 6 nach Befruchtung beginnen, unter dem Einfluss von CXCR4-Rezeptoren, welche von den PKZ exprimiert werden, Richtung gonadaler Region zu wandern; einst dort angekommen werden Sie von unreifen Sertoli-Zellen eingeschlossen, welche als Teil des Mikromilieus CXCL12 exprimieren.^{21,26–28}

1.2.2 Die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in der Tumorgenese von Keimzellen

Für die Tumorgenese von KZT wird angenommen, dass sich die PKZ nicht weiter zu Spermatogonien differenzieren, sondern ihre Pluripotenz beibehalten; aus diesen Zellen können sich dann KZT entwickeln.⁵ In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass wenn PKZ aus ihrer Mikroumgebung entfernt werden, sie sich wieder zu pluripotenten embryonalen Keimzellen zurück entwickeln.²⁹ Im Gegensatz dazu können PKZ-ähnliche Zellen, welche aus *in vitro* Stammzellen gewonnen wurden, wieder zu Keimzellen werden, sobald diese in das Mikromilieu der gonadalen Region eingebracht werden.³⁰ Von daher wird angenommen, dass das Mikromilieu eine wichtige Rolle in der Entwicklung von PKZ hin zu KZT spielen könnte.²³ Insbesondere die Interaktion zwischen CXCL12 und CXCR4 scheint während der Migration von PKZ entscheidend zu sein, was zur Entwicklung von KZT aufgrund fehlgeleiteter und veränderter PKZ führen könnte.²³ Ebenfalls bekannt ist, dass die mRNA-Expression von CXCR4 / CXCR7-Rezeptoren, im Vergleich zu gesunden Zellen, in mindestens 20 verschiedenen Tumorarten erhöht ist.²⁰ Beispiele hierfür sind u.a. das Mamma-, Ovar-, Cervix-, Kolorektal-, Pankreas- und Magenkarzinom.³¹ Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der Achse im Zusammenhang mit Migration, Proliferation, Angiogenese und Progression von Tumoren steht.³² In KZT wird CXCL12 ebenfalls von Zellen des Tumormikromilieus sezerniert, wodurch die Vermutung besteht, dass die Aktivierung von CXCR4 / -7 eine Rolle bei der Zellmigration und Metastasierung von KZT spielen könnte.^{18,22} In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nettersheim wurden bereits die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12 mRNA- und Protein-Spiegel in KZT-Zellen (SEM): TCam-2, EC: 2102EP, CC: JAR, JEG-3, BeWo, YST: GCT72, EC / YST: 1411H) und Fibroblasten (HVHF2, MPAF) untersucht.³³ Hierbei wurde deutlich, dass SEM CXCR4⁺ waren, während YST sowohl CXCR4⁺ als auch CXCR7⁺ und CC nur CXCR7⁺ gewesen sind; Mischtumoren waren CXCR4⁺ und CXCR7⁺.³³ CXCL12 wurde ausschließlich in den Fibroblasten nachgewiesen.³³ Darüber hinaus ergaben erste Untersuchungen, dass mittels CXCR4-spezifischer Inhibitoren (WZ811, LY2510924) die Zellmigration nach CXCL12- Stimulation in CXCR4⁺ / CXCR7⁺ KZT-Zellen revertiert werden konnte.

1.2.3 Die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse als mögliches therapeutisches Ziel in der Tumorthherapie

In einigen der zuvor genannten Tumoren bietet die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse ein potenzielles therapeutisches Ziel; in der Therapie der Non-Hodgkin Lymphome wird beispielsweise der CXCR4-Antagonist „Plerixafor“, welcher durch die europäische und amerikanische Arzneimittelbehörde zugelassen ist, sogar bereits eingesetzt.^{34–37}

Einen neuen Ansatz in der Forschung Tumoren zu therapieren, bieten sogenannte Nanobodies.³⁸ Nanobodies sind kleine, rekombinante Antikörperfragmente, die aus einer einzelnen, stabilen Domäne der schweren Kette von Kameliden- oder Hai-Antikörpern abgeleitet werden.³⁹ Die Domäne der schweren Kette wird auch als variable Domäne bezeichnet, besteht aus ca. 110 Aminosäuren und bildet die Hauptstruktur der Nanobodies.⁴⁰ Im Vergleich zur konventionellen Antikörper-Therapie bieten sie mehrere Vorteile.³⁸ Sie sind etwa ein Zehntel so groß wie konventionelle Antikörper, wodurch Sie leichter in das Zielgewebe gelangen und besitzen strukturelle Merkmale, die sie hoch stabil und vielseitig einsetzbar machen.^{38,39} Eines dieser Merkmale ist ihre lange, flexible Schleife, auch als CDR3-Region bezeichnet, die aus ca. 18 Aminosäuren besteht.^{38,39} Diese Schleife ist in der Lage, Strukturen in Zielmolekülen zu erkunden, was eine hohe Bindungsaffinität, Spezifität, sowie ein erhöhtes Interaktionspotential im Vergleich zu Antikörpern ermöglicht.³⁸ In der konventionellen Antikörper-Therapie wird bereits mit sogenannten Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADC, aus dem Englischen „Antibody-drug-conjugates“) geforscht, wobei Antikörper mit dem Spindelgift MMAE („Monomethyl-Auristatin E“) gekoppelt werden.⁴¹ Diese Möglichkeit besteht auch für Nanobodies, an die verschiedene Wirkstoffe wie Zelltoxine, Enzyme und Radionukleotide gekoppelt werden können.³⁸ Hierbei konnte bereits gezeigt werden, dass diese Konjugate eine wirksame und tumorspezifische Therapieoption darstellen; ein weiterer Vorteil ist die gute Verträglichkeit der Medikamente.⁴¹

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die molekularbiologische Charakterisierung der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in KZT, sowie die Identifizierung von CXCR4 und CXCR7 als mögliche therapeutische Ziele für die Behandlung von KZT. Durch die molekulare Charakterisierung dieser Achse soll herausgefunden werden, welche intrazellulären Signalwege unter dem Einfluss der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in KZT stehen. Darüber hinaus soll untersucht werden, inwiefern an MMAE gekoppelte CXCR4-Nanobodies eine potenzielle therapeutische Option bei der Behandlung von KZT darstellen.

Grundsätzlich soll diese Arbeit also ermöglichen, die therapeutischen Möglichkeiten von MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies als Therapiemöglichkeit zu bewerten, um so eine Grundlage für zukünftige Forschung zu schaffen. Dies beinhaltet die Analyse der Auswirkungen auf Zellviabilität, Apoptose-Induktion und den Effekt auf den Zellzyklus der Tumorzellen nach Behandlung mit MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies. Außerdem sollen durch die molekulare Charakterisierung der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse neue potenzielle Zielmoleküle oder Signalwege identifiziert werden, welche als weitere Ansatzpunkte für Therapien relevant werden können.

2. Material und Methoden

Ein positives Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der HHU für die Kultivierung von Tumorzelllinien liegt vor und sind auf Anfrage einsehbar.
Ethikvotum: Studiennummer 2018-178-Drittmittel und 2019-412-Drittmittel.

2.1 Material

2.1.1 Humane Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien

Tabelle 1: Verwendete humane Keimzelltumor- und Kontrollzelllinien, sowie Ursprung und Herkunft der Zellen, sowie das jeweils verwendete Zellmedium und die hinzugefügten Supplemente. „-R“ steht hierbei für „resistent“.

Zelllinie	Ursprung	Medium	Supplemente	Zur Verfügung gestellt von
1411H	EC / YST	DMEM (1X) + GlutaMAX TM -I	10 % FCS 1 % P/S (10,000 U) 200 mM L-Glutamin	Dr. Matthew Murray, Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Cambridge University Hospitals, Vereinigtes Königreich
2102EP	EC	DMEM (1X) + GlutaMAX TM -I	10 % FCS 1 % P/S (10,000 U) 200 mM L-Glutamin	Dr. Christoph Oing, Abteilung für Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplant- ation mit Sektion für Pneumologie, Mildred Scheel Cancer Career Center HaTriCs4, Universitäts Krebszentrum Hamburg, Hamburg, Deutschland
BeWo	CC	F-12 (1X)	10 % FCS 1 % P/S (10,000 U) 200 mM L-Glutamin	ATCC, #CCL-98
GCT72	YST	RPMI Medium 1640 (1X)	10 % FCS 1 % P/S (10,000 U) 200 mM L-Glutamin	Dr. Thomas Müller, Medizinische Fakultät der Martin-Luther- Universität Halle- Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland

MPAF	Fibroblasten	DMEM (1X) + GlutaMAX [™] -I	10 % FCS 1 % P/S (10,000 U) 200 mM L- Glutamin NEAA 100 nM β - Mercaptoethan ol	Dr. Michael Peitz, Institut für Rekonstruktive Neurobiologie, Medizinische Fakultät der Universität Bonn und Universitätsklinikum Bonn, Bonn, Deutschland
NCCIT	EC	RPMI Medium 1640 (1X)	10 % FCS 1 % P/S (10,000 U) 200 mM L- Glutamin	Dr. Christoph Oing (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland)
NT2/D1	EC	DMEM (1X) + GlutaMAX [™] -I	10 % FCS 1 % P/S (10,000 U) 200 mM L- Glutamin	Dr. Christoph Oing (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland)
TCam-2; TCam-2-R	SEM	RPMI Medium 1640 (1X)	10 % FCS 1 % P/S (10,000 U) 200 mM L- Glutamin	Dr. Janet Shipley, Abteilung für Molekularpathologie, The Institute of Cancer Research, London, Vereinigtes Königreich Dr. Michal Mego, Translational Research Unit, Medizinische Fakultät, Comenius Universität, Nationales Krebsinstitut, Bratislava, Slowakei

2.1.2 Materialien der Zellkultur

Tabelle 2: Übersicht über die in der Zellkultur verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
Automatischer Zellzähler TC20TM	BioRad	Hercules, USA
CnT-Prime-Medium	CELLnTEC	Bern, Schweiz
CO2-Inkubator HeraCell 150i	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Collagen IV-Lyophilisat	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
DMEM Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco	Schwerte, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland

(D)PBS (Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung)	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
F-12	Gibco	Schwerte, Deutschland
FCS (Fetales Kälberserum)	MERCK	Darmstadt, Deutschland
Glas-Pasteur-Pipetten	Brand	Wertheim, Deutschland
Kühlzentrifuge Allegra 2IR Centrifuge	Beckman Coulter	Brea, USA
L-Glutamin	Gibco	Schwerte, Deutschland
Mikroskop Ts2, TE2000-S	Nikon Eclipse	Tokyo, Japan
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
NIS Elements Software (Mikroskop)	Nikon	Tokyo, Japan
1 % P/S (Penicillin/Streptomycin) (10.000 U)	Gibco	Schwerte, Deutschland
Pipetten 0,5 -, 20 -, 100 -, 1000 µl	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 mL	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Röhrchen 15 mL/50 mL	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	Gibco	Schwerte, Deutschland
Sterile Pipetten 5 -, 10 -, 25 mL	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
T-75 Zellkultur-Flaschen	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Tryptanblau 0,4 %	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco	Schwerte, Deutschland
Vortex Mixer	Scientific Industries	Bohemia, USA
Zählkammern	BioRad	Hercules, USA
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.1.3 Materialien für RNA-Isolation und Proteinextraktion

Tabelle 3: Übersicht über die zur RNA-Isolation und Proteinextraktion verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
β-Mercaptoethanol	Bichrom/MERCK	Darmstadt, Deutschland
6-Well-Platten	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Allegra ^{TM2} 2IR Zentrifuge	Beckman Coulter	Brea, USA
Rekombinantes humanes SDF-1a (CXCL12)-Protein	abcam	Cambridge, Vereinigtes Königreich
Rekombinantes humanes SDF-1a (CXCL12)-Protein	Peprotech/Thermo Fisher Scientific	Cranbury, USA
PBS (phosphathaltige Pufferlösung)	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Phosphatase-Inhibitor	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Protease-Inhibitor	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
QIAzol® Lysis Reagent	QIAGEN	Hilden, Deutschland
RNeasy®Mini Kit	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Röhrchen 15 mL	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
SCH772984 ERK 1/2 Inhibitor	Selleckchem Chemicals LLC	Houston, USA
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Tabelle 4: Übersicht über die für den RIPA-Puffer verwendeten Materialien

Chemikalien für RIPA-Puffer			
DOC (Sodium Deoxycholat, $C_{24}H_{39}NaO_4$)	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland	
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals	Radnor, USA	
SDS ultra-pure (Dodecylsulfat, $C_{12}H_{25}NaO_4S$)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland	
Tris (Trisaminomethan, $NH_2C(CH_2OH)_3$)	VWR Chemicals	Radnor, USA	
Triton X-100	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland	

2.1.4 Materialien für cDNA-Synthese

Tabelle 5: Übersicht über die zur cDNA-Synthese verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
dNTP-Mix (10mM)	Thermo Fisher Scientific	Rockford, USA
Maxima H Minus Reverse Transcriptase (200U/μL)	Thermo Fisher Scientific	Rockford, USA
NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific	Rockford, USA
Oligo(dT)18Primer(0,5μg/μL)	Thermo Fisher Scientific	Rockford, USA
RiboLock RNase Inhibitor (40U/μL)	Thermo Fisher Scientific	Rockford, USA
RNase freies Wasser	QIAGEN	Hilden
RT Puffer (5x)	Thermo Fisher Scientific	Rockford, USA
S1000™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA

2.1.5 Materialien für Quantitative

Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Tabelle 6: Übersicht über die für die qRT-PCR verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
CFX Maestro Software	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
CFX384 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Fluorostar control program V 1.26	Bio-Rad Laboratories	Feldkirchen, Deutschland
Framestar 384 Well Skirted PCR Plate	4titude von Brooks Life Sciences	Griesheim, Deutschland
Luna Universal qPCR Master Mix	New England Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
RNase-freies Wasser	QIAGEN	Hilden, Deutschland

2.1.6 Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Tabelle 7: Übersicht der Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Gen	Oligonukleotid-Sequenz 5' – 3' Komplementär	Oligonukleotid-Sequenz 5' – 3' Revers
<i>ACTB</i>	TCTTGCCCATCTGATCCATT	CCAACAAAGGAGCCACCAC
<i>BCL2</i>	CCTGTGGATGACTGAGTACCTG	CAGAGGCCGCATGCTGGG
<i>CD44</i>	TGCCGCTTTGCAGGTGTAT	GGCCTCCGTCCGAGAGA
<i>COL3A1</i>	GGAGCTGGCTACTTCTCGC	GGGAACATCCTCCTTCAACAG
<i>CCND1</i>	TACTACCGCCTCACACGCTTC	TTCGATCTGCTCCTGGCAG
<i>CFOS</i>	GAGAGCTGGTAGTTAGTAGCATGTTGA	AATTCCAATAATGAACCCAATAGATTAGTTA
<i>EGFR</i>	CCCACCTCATGCTCTACAACCC	TCGCACTTCTTACACTTGCGG
<i>GAPDH</i>	TGCCAAATATGATGACATCAAGAA	GAGTGGGTGTCGCTGTTG
<i>IL6</i>	ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG	CCATCTTTGGAAGGTTCAAGTTG
<i>ITGA4</i>	AGCCCTAATGGAGAACCTTGST	CCAGTGGGGAGCTTATTTTCAT
<i>MMP1</i>	GGGGCTTTGATGTACCCTAGC	TGTCACACGCTTTTGGGGTTT
<i>MMP2</i>	TACAGGATCATTGGCTACACACC	GGTCACATCGCTCCAGACT
<i>MMP3</i>	CTGGGAAGAGGTGACTCCAC	TTTCCAGGTCCATCAAAAGG
<i>SRC</i>	TCGTGCGAGAAAGTGAGACC	GCTTGCGGATCTTGTAGTGC
<i>TGFB1</i>	ACCCGTGTTGCTCTCCCG	CAACCACTGCCGCACAAC
<i>TGFB2</i>	AGGGATCTAGGGTGGAATGGA	GCAGCAAGGAGAAGCAGATG
<i>TGFB3</i>	ATGTCACACCTTTCAGCCCA	AGATGAGGGTTGTGGTGATCC
<i>VEGFA</i>	AGGGCAGAATCATCACGAAGT	AGGGTCTCGATTGGATGGCA

2.1.7 Materialien für BCA-Protein-Assay

Tabelle 8: Übersicht über die für den BCA-Protein-Assay verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
96-Well-Platte	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Albumin Standard	Thermo Scientific	Rockford, USA
Bio-Rad's iMark™ microplate absorbance reader	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Bio-Rad's MicroplateManager Software 6	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A/B	Thermo Scientific	Rockford, USA

ROTI®Load 1, 40 mL, 4 x 10 mL, Gelladepuffer für Proteine	CARL ROTH GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mini Spin	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Tabelle 9: Übersicht über die für den RIPA-Puffer verwendeten Materialien

Chemikalien für den RIPA-Puffer		
Material	Hersteller	Hauptsitz
DOC (Sodium Deoxycholat, $C_{24}H_{39}NaO_4$)	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals	Radnor, USA
SDS ultra-pure (Dodecylsulfat, $C_{12}H_{25}NaO_4S$)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tris (Trisaminomethan, $NH_2C(CH_2OH)_3$)	VWR Chemicals	Radnor, USA
Triton X-100	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland

2.1.8 Materialien für SDS-PAGE und Western Blot

Tabelle 10: Übersicht über die für SDS-Page und Western-Blot verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
β-Mercaptoethanol	Bichrom/MERCK	Darmstadt, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin)	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
ChemiDoc™ Imaging System Version 2.3.0.07	BioRad	Hercules, USA
Clarity Max™ Western ECL Substrate	BioRad	Hercules, USA
Clarity™ Western ECL Substrate	BioRad	Hercules, USA
Immobilon®-P Transfer Membranes	Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland

Isopropanol	VWR Chemicals	Radnor, USA
Methanol	VWR Chemicals	Radnor, USA
Milchpulver	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad	Hercules, USA
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	Rockford, USA
Ponceau S Solution	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
PowerPac™ Basic Netzteil	BioRad	Hercules, USA
ROTI®Load 1, 40 mL, 4 x 10 mL	CARL ROTH GmbH + Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BioRad	Hercules, USA
Whatman™ Gel Blot Paper	GE Healthcare	Chicago, USA
Wippschüttler ST 5	Ingenieurbüro CAT, Zipperer	Ballrechten-Dottingen, Deutschland
Chemikalien für Polyacrylamid-Gele (sowohl Trenn- und Sammelgel)		
Acrylamid (C ₃ H ₅ NO)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
APS (Ammoniumperoxodisulfat, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
SDS ultra-pure (Dodecylsulfat, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin, C ₆ H ₁₆ N ₂)	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Tris (Trisaminomethan, NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	VWR Chemicals	Radnor, USA
Chemikalien für Elektrophorese-Puffer		
10x Tris/Glycine/SDS Puffer	BioRad	Hercules, USA
Chemikalien für Blotting-Puffer (5x Puffer)		
Glycin	VWR Chemicals	Radnor, SA
Tris (Trisaminomethan, NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	VWR Chemicals	Radnor, USA
Chemikalien für PBS-T-Waschlösung		
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals	Radnor, USA
Tris (Trisaminomethan, NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	VWR Chemicals	Radnor, USA

Tween	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Chemikalien für Stripping-Puffer		
Glycin	VWR Chemicals	Radnor, USA
SDS ultra-pure (Dodecylsulfat, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	CARL ROTH GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Tris (Trisaminomethan, NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	VWR Chemicals	Radnor, USA

<u>Komponenten 12 %ige Trenngele (2 Gele)</u>	
H ₂ O	3,3 mL
Acrylamide 30 %	4 mL
1.5 M Tris pH 8.8	2, 5 mL
10 % SDS pH 7.2	0, 1 mL
10 % APS	0, 1 mL
TEMED (Tetramethylethylendiamin, C ₆ H ₁₆ N ₂)	0,005 mL
<u>Komponenten 2 Sammelgele</u>	
H ₂ O	3,4 mL
Acrylamide 30 %	0,83 mL
1.5 M Tris pH 6.8	0,63 mL
10 % SDS pH 7.2	0,05 mL
10 % APS	0,05 mL
TEMED (Tetramethylethylendiamin, C ₆ H ₁₆ N ₂)	0,005 mL

2.1.9 Verwendete Antikörper

Tabelle 11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller/Ort	Blocking-Puffer	Konzentration
Primäre Antikörper			
ERK1/2 (MAP kinase 1/2)	UPState USA Inc. Lake Placid, USA	5 %ige Milch	1: 5000
phospho ERK1 (T202/Y204) / ERK2 (T185/Y187)	R&D Systems, USA	5 %ige Milch	1:1000
Vinculin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	5 %ige Milch	1:2000
Sekundäre Antikörper			
Rabbit-Anti-Mouse HRP (horseradish peroxidase) (P0260)	Dako/Agilent, Frankfurt am Main	1 %iges BSA 1 %ige Milch	1:1000
Goat-Anti-Rabbit HRP (P0448)	Dako/Agilent, Frankfurt am Main	1 %iges BSA 1 %ige Milch	1:2000

2.1.10 Materialien für Human Phospho-Kinase Array Kit

Tabelle 12: Übersicht über die für den Human Phospho-Kinase Array verwendeten Materialien

Material	Beschreibung	Aufbewahrung
Human Phospho-Kinase Array	8 Nitrocellulose Membranen (4x PartA; 4x Part B) - jede Membran beinhaltet 43 verschiedene Antikörper, die in Duplikaten abgebildet sind	Kann für bis zu 3 Monate bei 2-8°C aufbewahrt werden
Array Buffer 1	21 mL einer gepufferten Proteinbasis mit Konservierungsstoffen	
Array Buffer 2 (5x Konzentrat)	21 mL einer konzentrierten gepufferten Proteinbasis mit Konservierungsstoffen.	
Array Buffer 3	21 mL einer gepufferten Proteinbasis mit Konservierungsstoffen	
Lysis Buffer 6	21 mL einer denaturierten gepufferten Lösung	

Waschpuffer-Konzentrat	2 Flaschen (21 mL/Flaschen) einer 25-fach konzentrierten Lösung eines gepufferten Tensids mit Konservierungsmittel	
Detektionsantikörper-Cocktail A	1 Flasche mit biotinyliertem Antikörpercocktail (lyophilisiert)	
Detektionsantikörper-Cocktail B	1 Flasche mit biotinyliertem Antikörpercocktail (lyophilisiert)	
Streptavidin-Horseradishperoxidase (HRP)	200 µL Streptavidin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase.	
Chemisches Reagenz 1	2,5 mL stabilisiertes Wasserstoffperoxid mit Konservierungsmittel.	
Wippschüttler ST 5	Ingenieurbüro CAT, Zipperer	Ballrechten-Dottingen, Deutschland

2.1.11 Materialien für XTT-Assay

Tabelle 13: Übersicht über die für den XTT-Assay verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
96-Well-Platte	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Costar® Reagenzreservoir, 50 mL	Corning	Corning, USA
Bio-Rad's iMark™ microplate absorbance reader mit Software Microplate Manager Software 6 Version 6.3	Bio-Rad Laboratories, Inc.	Hercules, USA
GraphPad Prism Software	GraphPad Software LLC	Boston, USA
Multipette® stream	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate) (1,25 mM in PBS gelöst)	Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
XTT (Triphenyltetrazoliumchlorid) (1 mg/mL gelöst in RPMI-Medium)	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA

VUN401-CXCR4-Nanobody	QVQ Holding BV	Utrecht, Niederlande
VUN401-MMAE-CXCR4-Nanobody	QVQ Holding BV	Utrecht, Niederlande

2.1.12 Materialien für den Apoptose-Assay

Tabelle 14: Übersicht über die für den Apoptose-Assay verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
6-Well-Platten	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
AnnexinV-FITC-Konjugat	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
AnnexinV-Bindungspuffer 20x	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant® und MACSQuant Analyzer 10, Version 2.13.0 Durchflusszytometer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuantify Software Version 2.11 zur Datenauswertung	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
PBS	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Propidiumiodid	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Polystyrene-Röhrchen	Bichrom/MERCK	Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Vortex Mixer	Scientific Industries	Bohemia, USA
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.1.13 Materialien für die durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse

Tabelle 15: Übersicht über die für die Zellzyklus-Analysen verwendeten Materialien

Material	Hersteller	Hauptsitz
6-Well-Platten	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Ethanol absolut	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
MACSQuant Analyser 10	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuantify V 2.11	Miltenyi Biotec	Miltenyi Biotec
PBS	Merck / Sigma-Aldrich	Darmstadt, Deutschland
Polystyrene-Röhrchen	Bichrom/MERCK	Darmstadt, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich/MERCK	Taufkirchen, Deutschland
RNase A (100 mg/mL)	QIAGEN	Hilden, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,05 % Phenolrot	Gibco, Thermo Fisher Scientific	Schwerte, Deutschland
Vortex Mixer	Scientific Industries	Bohemia, USA
Zentrifuge 5810	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung

Die humanen adhärenenten KZT- und Kontrollzelllinien wurden in DMEM-, RPMI- oder F-12-Medium mit entsprechenden Supplementen bei 37°C und 7,5 % CO₂-Gehalt kultiviert (siehe 2.1.1). Je nach Zelllinie wurden diese 1-2-Mal die Woche bei einer Konfluenz von 70-90 % passagiert. Zuerst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin bei 37 °C und 7,5 % CO₂ dissoziiert und die enzymatische Verdauung durch Zugabe der doppelten Menge von FCS-haltigem Medium gestoppt. Mittels einer 1 : 2 Verdünnung aus Zellsuspension und Trypanblau (0,4 %) wurde die Zellzahl mit Hilfe des automatischen Zellzählers (TC20TM, BioRad) bestimmt.

2.2.2 RNA- und Proteinisolierung

Für die Isolierung von RNA und Proteinen wurden Zelllinien in einer 6-Well-Platte ausgesät und je nach Fragestellung spezifisch behandelt. Die Aussaat und Behandlung der Zellen mit CXCL12 sowie dem Erk-Inhibitor SCH772984 erfolgten nach gleichen Protokollen, wobei die RNA- und Proteinextraktion aufeinander abgestimmte Methoden umfasste (s. Tabelle 1-4).

Zur RNA-Isolation und Proteinextraktion wurden pro Well eine definierte Zellzahl ($1,5 \times 10^5$ Zellen; $0,9 \times 10^5$) ausgesät und 24 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, und die adhärenenten Zellen wurden im Verhältnis 1 : 2 mit PBS gewaschen, wobei pro Well eine angemessene Menge an PBS entsprechend der Zellzahl und Fläche der Wells verwendet wurde.

Die Stimulation der Zellen mit CXCL12 erfolgte in einem definierten Verhältnis, abhängig von der Zielkonzentration (z.B. 100 ng / mL, 250ng / mL und 500 ng / mL CXCL12 ad 2mL Serum für RNA-Isolierung oder 250 ng / mL, 500 ng / mL und 1.000 ng / mL ad 2 mL serumfreiem Medium / Well zur Proteinextraktion). Die Kontrollgruppen erhielten ausschließlich Medium im gleichen Verhältnis. Die Inkubationszeiten bei 37° C betrugen für die RNA-Isolation acht, 24 und 48 h und für die Proteinextraktion zwei und 24 h. Die Behandlung mit dem Erk-Inhibitor SCH772984 erfolgte einer 100nM entsprechenden Konzentration und die Zellen

wurden für 48 bzw. 96 h täglich mit einer frischen Inhibitorlösung, ebenfalls bei 37° C, behandelt.

Nach der festgelegten Inkubationszeit und -temperatur wurden die Zellen erneut im Verhältnis 1 : 2 mit PBS gewaschen, dann durch Trypsinisierung im Verhältnis 1 : 4 (Trypsin zu Medium) gelöst und für drei bis fünf Minuten im Inkubator bei 37° C behandelt. Die Trypsin-Reaktion wurde im Verhältnis 1 : 4 mit FBS-haltigem Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in Röhrchen überführt und für die weitere Bearbeitung für 5 min bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut für 5 min bei 700 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen

Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß dem „RNeasy® Minikit-Quick-Start Protocol, Part 1“. Dabei wurden die Proben zunächst mit dem RLT-Puffer aus dem Kit lysiert und anschließend homogenisiert. Vorher wurde dem Puffer pro Milliliter 10 µL β-Mercaptoethanol zugesetzt. Anschließend wurde 70 %iger Ethanol dem Lysat zugegeben, um optimale Bindungsbedingungen zu gewährleisten. Danach wurden 700 µL des Zell-Lysats in die mitgelieferten Eppendorf-Röhrchen auf die RNeasy-Silicamembran aufgebracht, sodass die RNA an diese Silicamembran binden konnte. Die Lysate wurden anschließend für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, und das Sammelröhrchen wurde verworfen.

Im folgenden Schritt wurde das „RNeasy® Mini Kit, Part 2, Quick-Start-Protocol, on-column DNase digestion, Step 1-4“ angewendet. Pro Aliquot wurden zunächst 350 µL des RW1-Puffers aus dem Kit zugegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, danach wurde das Sammelröhrchen verworfen. Anschließend wurden je Aliquot 10 µL der DNase 1 stock solution mit 70 µL des RDD-Puffers aus dem Kit gemischt, das Gemisch zu den Proben gegeben und diese für 15 Minuten bei 20-30°C inkubiert. Danach wurde pro Aliquot erneut 350 µL des RW1-Puffers zugegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde Schritt 4 des „RNeasy® Mini Kit-Quick-Start Protocol, Part 1“ wiederholt, indem 700 µL RW1-Puffer zu den Lysaten gegeben und erneut für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert wurden.

Daraufhin folgte derselbe Schritt mit 500 µL RPE-Puffer, mit der Ausnahme, dass in diesem Fall für 2 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert wurde. Schließlich wurde

die RNeasy-Silicamembran in ein frisches, mitgeliefertes 1,5 mL-Röhrchen überführt, und zur Elution wurden 30-50 µL RNase-freies Wasser hinzugefügt, woraufhin eine letzte Zentrifugation für 1 Minute bei 10.000 rpm erfolgte. Die Silicamembran wurde anschließend entsorgt, und die RNA-haltigen 1,5 mL-Röhrchen wurden bei -20°C zur späteren Verwendung eingefroren.

Die Proteinisolation folgte nach der Zellbehandlung analog zur RNA-Isolierung. Nach PBS-Waschung und Trypsinisierung der Zellen, die ebenfalls im Verhältnis 1 : 4 (Trypsin zu FBS-haltigem Medium) abgelöst und gestoppt wurde, erfolgten die Zentrifugationsschritte zur Zellernte. Die Zellen wurden dann im Verhältnis 1 : 30 in RIPA-Puffer mit 1 %igem Phosphatase- und 1 %igem Protease-Inhibitor aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis gelagert.

Vor der Verwendung wurden die Proben in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und im gleichen Verhältnis für den BCA-Protein-Assay vorbereitet (s. 2.2.5).

2.2.3 cDNA-Synthese

Die cDNA (komplementäre DNA, aus dem Englischen „complementary DNA“) - Synthese ist ein Verfahren, bei der mittels des Enzyms Reverse Transkriptase, DNA aus RNA hergestellt wird (Material s. Tabelle 5). Zur Synthese wurden 1000 ng RNA eingesetzt und das Volumen mit RNase freien Wasser auf 12.5 µL aufgefüllt. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Pro Ansatz wurden 1 µL dNTP Mix (10 mM), 1 µL Oligo(dT)18-Primer (0.5 µg / µL), 4 µL 5x RT Puffer, 0.5 µL RiboLock RNase (40 U / µL) und 1 µL Maxima H Minus Reverse Transcriptase (200 U / µL) für ein Gesamtvolumen von 20 µL hinzugefügt (s. Tabelle 5). Anschließend wurden die Proben im ThermalCycler für je einen Zyklus (30 min bei 50°C) und einen Zyklus (5min bei 85°C) behandelt und anschließend für unbestimmte Zeit auf 4°C im Gerät behandelt. 19 µL des Ansatzes wurden mit 304 µL RNase freien Wasser für Verdünnung (1 : 19), zwecks einfacher Handhabung, versetzt und anschließend bei -20°C gelagert.

2.2.4 qRT-PCR

Für die Analyse der Genexpression wurde die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR, aus dem Englischen

„quantitative reverse transcription polymerase chain reaction“) verwendet (s. Tabelle 6-7). Diese Methode quantifiziert die Genexpression mithilfe eines DNA-interkalierenden Farbstoffs. Der für diese qRT-PCR verwendete Mastermix enthält zusätzlich zu den üblichen Komponenten (dNTPs, Puffer, Polymerase) den Farbstoff SybrGreen. Nach jedem Zyklus wird die Fluoreszenzemission der Farbstoffmoleküle gemessen, was die Bestimmung der Menge des amplifizierten Produkts ermöglicht. Die cDNA der folgenden Transkripte wurde mittels Oligonukleotiden amplifiziert (s. Tabelle 7): Dazu wurden 8,5 µL der verdünnten cDNA, 7,5 µL Luna Universal qPCR Master Mix, 0,5 µL der komplementären Oligonukleotid-Sequenz und 0,5 µL der reversen Oligonukleotid-Sequenz verwendet. Die Proben wurden in Triplikaten (5 µL / Well) auf eine 384-Well-Platte pipettiert. Nachdem alle Proben auf die Platte übertragen worden waren, wurde diese in den CFX384 Touch Thermal Cycler eingesetzt und die qRT-PCR durchgeführt.

Tabelle 16 Laufeinstellungen des CFX384 Touch Thermal Cycler

	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 Grad Celsius	2 Minuten
Amplifikationszyklus (40 Zyklen) mit Fluoreszenzmessung nach jedem Annealing/Extension-Schritt		
- Davon Denaturierung	95 Grad Celsius	15 Sekunden
- Davon Annealing und Extension	60 Grad Celsius	30 Sekunden
Schmelzkurvenanalyse mit Fluoreszenzmessung kontinuierlich während der Temperaturerhöhung	65-95 Grad Celsius	Erhöhung um 0,5 Grad Celsius alle 5 Sekunden

Auswertung der Genexpression:

Zur Auswertung wurden pro Zelllinie und Behandlung zwei Haushaltsgene (ACTB, GAPDH) amplifiziert und der Durchschnitt der Ct-Werte berechnet.

Dieser Durchschnittswert diene als Referenz für die Berechnung des ΔCt -Wertes. Um die Expressionsunterschiede zu ermitteln, wurde auf die DMSO-Kontrolle normalisiert ($\Delta\Delta Ct$ -Wert), und der sogenannte „fold change“ wurde berechnet.⁴²

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Haushaltsgen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Behandlung}) - \Delta Ct (\text{DMSO-Kontrolle})$$

$$\text{„fold change“} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

2.2.5 BCA-Protein-Assay

Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Protein-Assays bestimmt (s. Tabelle 8-9). Auf einer 96-Well-Platte wurden 10 μL jeder Probe in Duplikaten pipettiert. Zunächst wurden 10 μL der Albumin-Standardverdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 1500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 250 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ und 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ in Duplikaten in die Platte gegeben. Dann wurden im Verhältnis 9:1, 22,5 μL RIPA-Puffer mit jeweils 2,5 μL der Proben gemischt und davon ebenfalls 10 μL in Duplikaten in die Platte pipettiert. Das Pierce™ BCA Protein Assay Reagent A wurde im Verhältnis 50 : 1 mit Reagent B gemischt, und von dieser Mischung wurden jeweils 200 μL auf jede Probe, die Standardkonzentrationen und den Blank gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Absorption mit dem „Bio-Rad's iMark™ microplate absorbance reader“ gemessen. Aus den Standardwerten wurde eine Eichgerade erstellt, und die Konzentrationen der Proben wurden mit Hilfe der Geradengleichung berechnet. Die Mittelwerte der gemessenen Absorptionen wurden in die Gleichung eingesetzt, um die Proteinmengen ($\mu\text{g Protein} / \mu\text{L}$) zu bestimmen. Die notwendige Menge jeder Probe, um ein Lysat mit 20 $\mu\text{g Protein}$ zu erhalten, wurde berechnet. Entsprechend wurde Wasser hinzugefügt, um das Gesamtvolumen auf 12,5 μL zu bringen. Nach Zugabe von 4 μL „ROTI®Load 1“ wurden die Proteinlysate mit einem Endvolumen von 16,5 μL bei 95°C für 5 Minuten denaturiert, dann zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.6 Herstellung Polyacrylamid-Gele

In dieser Arbeit wurden 12 %ige Polyacrylamid-Trenngele und ein Polyacrylamid-Sammelgel genutzt.

Komponenten 12 %ige Trenngele (2 Gele)

H ₂ O	3, 3 mL
Acrylamide 30 %	4 mL
1.5 M Tris pH 8.8	2, 5 mL
10 % SDS pH 7.2	0, 1 mL
10 % APS	0, 1 mL
TEMED	0,005 mL

Nachdem das Polycramid-Trenngel polymerisiert war, wurde das Sammelgel gegossen.

Komponenten 2 Sammelgele

H ₂ O	3,4 mL
Acrylamide 30 %	0,83 mL
1.5 M Tris pH 6.8	0,63 mL
10 % SDS pH 7.2	0,05 mL
10 % APS	0,05 mL
TEMED	0,005 mL

2.2.7 SDS-Page und Western Blot

Die Gele wurden zunächst bei 70 V für 15 Minuten betrieben, bis die Proben vollständig das Sammelgel durchwandert hatten (Materialien s. Tabelle 10-11). Danach wurde die Spannung auf 99 V erhöht, und die Gele liefen für etwa 1,5 h weiter, bis eine vollständige Auftrennung der Proteine erreicht war. Für das Blotting wurde Whatman™-Papier in Blotting-Puffer getränkt und die Transfer-Membran vorbereitet, indem sie für 2 Minuten in 100 % Methanol, dann für 2 Minuten in Wasser und anschließend mindestens 5 Minuten in Blotting-Puffer gelegt wurde. Die Transfer-Kammern wurden mit einer Lage Whatman™-Papier, dem Gel, der Membran und einer weiteren Lage Whatman™-Papier bestückt. Das Blotting erfolgte bei 25 Volt und 2,5 A für 20 Minuten. Um die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen, wurde die Membran

für 5 Minuten in Ponceau-Lösung unter ständigem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde sie mit destilliertem Wasser entfärbt, bis der Hintergrund weiß und die Proteinbänder rosa sichtbar waren. Danach erfolgte eine Reinigung der Membran mit PBS-T, bis keine Färbung mehr zu erkennen war.

Je nach eingesetztem Antikörper wurden die Membranen in 5 mL 5 %iger Milchlösung für zwei h unter Rotation bei Raumtemperatur blockiert. Der erste Antikörper wurde entweder für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter Rotation aufgetragen, wobei ebenfalls 5 mL 5 %ige Milchlösung verwendet wurden. Nach der Inkubation wurden die Membranen dreimal für jeweils 5 Minuten in einem großen Volumen PBS-T gewaschen. Der zweite Antikörper wurde in 5 mL 5 %iger Milchlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Rotation aufgetragen. Im Anschluss wurden die Membranen erneut dreimal für 5 Minuten in PBS-T gewaschen. Zur Detektion wurden jeweils 1.500 µl der Lösungen A und B des Clarity™ Western ECL Substrats auf die Membran aufgetragen und für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ChemiDoc™ Imaging System (Version 2.3.0.07).

2.2.8 Western Blot Membran-Stripping

Um die Membranen zu reinigen und nochmals zur Detektion anderer Proteine zu nutzen, wurde ein Stripping-Puffer genutzt.

Die Membranen wurden mit 20 mL des Stripping-Puffers für 27 Minuten bei 60°C im Wasserbad unter Rotation inkubiert, dann zweimal für 10 Minuten in PBS-T gewaschen. Hiernach wurden die Membranen in 5 mL 5 %iger Milch geblockt (s. Tabelle 10).

2.2.9 Human Phospho Kinase Array

Um den Einfluss von CXCL12 auf die Phosphorylierung von Proteinen in KZT zu untersuchen, wurde der Human Phospho Kinase Array von R&D Systems, USA verwendet und dem entsprechenden Protokoll gefolgt (s. Tabelle 12). Dieser ermöglicht die Erkennung von Phosphorylierungsereignissen in einer einzigen Probe.

Das Aussäen und Behandeln der Zelllinien mit CXCL12 für die Proteinextraktion erfolgte in einer geeigneten Zellkultur-Flasche. Für jede Zelllinie wurden vier

Flaschen (zwei zur Kontrolle und zwei zur Behandlung) verwendet und für 24 h bei 37° C inkubiert. Am Tag zwei wurde das Medium abgesaugt und die adhären Zellen mit 1 mL PBS / Well gewaschen und anschließend mit FBS-haltigem Zellmedium behandelt. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit CXCL12-Protein behandelt. Hierfür wurde das Protein in Konzentrationen von 250ng / mL ad 12 mL FBS-haltigem Zellmedium / Well zu den Zellen gegeben. Die Kontrollzelllinien wurden entsprechend nur mit FBS-haltigem Medium behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 48 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeiträume wurden die Wells zunächst abgesaugt und die Zellen mit 1 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis mittels Zellschaber abgelöst, in 15mL-Greiner-Röhrchen überführt und bei 700 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und das verbleibende Zellpellet in je 150 µL Lyse Buffer 6 gelöst, in ein 1,5 mL Eppiröhrchen überführt und für 30 min auf Eis auf einem Wippschüttler geschüttelt. Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 14.000 rpm, bei 4 ° Celsius für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppiröhrchen überführt und auf -80 °Celsius über Nacht gefroren. Am dritten Tag wurde zunächst der Array Buffer 1 auf Raumtemperatur gebracht und die Proben aufgetaut. Mittels BCA-Assay wurden die Proben quantifiziert (Zielmenge 400 µg Protein, maximales Volumen laut Hersteller 334 µL). Die berechnete Proteinmenge wurde anschließend mit Array Buffer 1 ad 2mL aufgefüllt. Währenddessen wurden die Nitrocellulose-Membranen in ein 8-Well-Multidish gegeben und mit je 1mL Array Buffer 1 für eine Stunde auf dem Wippschüttler inkubiert. Nach Fertigstellung der Proben wurde der Puffer wieder abgesaugt und je 1 mL der Proben wurde auf die Membran A und B gegeben. Schließlich wurden die Proben über Nacht bei 2-8 ° Celsius auf dem Wippschüttler inkubiert. Am Tag 4 wurde zunächst der Wash Buffer vorbereitet (40 mL in 960 mL Millipore-Wasser, je 2-mal) und anschließend 8 Container mit je 20 mL befüllt. Danach wurden die Membranen A und B gemeinsam in je einen Container gegeben und für 10 Minuten insgesamt dreimal auf einem Wippschüttler gewaschen. Im nächsten Schritt wurde jeweils für Membran A und B der Array Buffer 2 / 3 hergestellt. Dazu wurden 2 mL von Buffer 2 mit 8 mL Buffer 3 pipettiert und in jeweils 2 Greinerröhrchen zu je 4,5 mL überführt. Anschließend wurde die Detektions-Antikörper-Cocktails A und B zum entsprechenden Puffer hinzugefügt

(je 90µL). Die Antikörper-Arraybuffer 2 / 3 Lösung wurde dann mit je 1mL in 8 Container gegeben und die Membranen dort für 2 h auf einem Wippschüttler inkubiert.

Ab dem nächsten Arbeitsschritt wurden die Membranen dreimal jeweils getrennt im Wash Buffer gewaschen. Dazu wurden wieder 16 Container mit je 20 mL befüllt und die Membranen dreimal 10 Minuten gewaschen. Währenddessen wurde erneut Array Buffer 2 / 3 hergestellt (s.o.) und diesmal mit je 5 µL Streptavidin-HRP gemischt und in ein 8-Well-Multidish mit jeweils 1mL gegeben. Erneut wurden dann die Membranen einzeln für 30 min im Multidish auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Membranen wieder gemeinsam für je dreimal 10 Minuten in 20 mL Washbuffer gewaschen. Währenddessen wurde das ChemiReagent im Verhältnis 1:1 zur Detektion hergestellt. Zur Detektion wurden die Membranen auf einen Plastiksheets gelegt und mittels BioRad ChemiDoc™ Imaging System detektiert. Die Signalintensitäten wurden mittels ImageJ-Software (National Institutes of Health, USA) analysiert.

2.2.10 XTT-Assay

Um die Zellviabilität der verwendeten Zelllinien und die Zelltoxizität der Nanobodies auf die Zellen messen zu können, wurden XTT-Assays durchgeführt (s. Tabelle 13).

Für den XTT-Assay wurden auf einer 96-Well-Platte 3000 Zellen pro Well in jeweils 50 µl Zellmedium ausgesät. Dabei wurde die 96-Well-Platte in vier Quadranten aufgeteilt um je eine Messung nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h zu ermöglichen. Die Zelllinien wurden mit den Nanobodies VUN401 und VUN401-MMAE in den Konzentrationen 100 nM, 250 nM und 500 nM behandelt. Die Behandlung der Zellen erfolgte 24 h nach der Aussaat auf die 96-Well-Platte. Pro Tag wurden zusätzlich drei Kontrollreihen mit PBS in Medium gelöst (jeweils in der gleichen Menge der jeweiligen Nanobodies).

Am Tag der Messung wurde zu jedem Well 50 µL XTT mit 0,5 µl PMS (1.25 mM) -Aktivierungsreagenz hinzugegeben (100 : 1), sodass ein Gesamtvolumen von 150 µL pro Well vorlag. Anschließend wurden die 96-Well-Platten bei 37 °C für 4 h inkubiert. Die dann folgende Absorptionsmessung per „Bio-Rad's iMark™ microplate absorbance reader“ erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm

(Wellenbereich des orangenen Formazans) und von 655 nm (Hintergrundabsorption der Proben) in Quadruplikaten.

Der gemittelte Lösemittelkontrollwert wurden anschließend von jedem Probenwert rechnerisch subtrahiert. Die so normalisierten Probenwerte wurden nochmals gemittelt und anschließend grafisch ausgewertet. Somit konnte jedem Zeitpunkt und jeder Konzentration ein Datenpunkt zugeordnet werden.

2.2.11 Bestimmung der EC₅₀-Werte

Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) beschreibt die Konzentration der Nanobodies, bei der die Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu 50 % letal vorliegen. Die EC₅₀-Werte wurden aus den 72- h -Werten der XTT-Assay-Messungen mit Hilfe des Computerprogrammes „GraphPad Prism“ berechnet (s. Tabelle 13).

2.2.12 Zellzyklus-Analysen und Apoptose Messungen

Für diese Assays wurden die zu untersuchenden Zellen in eine 6-Well-Platte ausgesät. Die Zellzahl pro Well betrug 90.000 und es wurden je 2 mL des Zellgemisches in jedes Well pipettiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit den jeweiligen Nanobodies behandelt. Dafür wurde die Konzentration des EC₅₀-Werts nach 72 h verwendet, die zuvor bei XTT-Analysen berechnet wurden. Nach 48 h wurden dann die Zellen für die Analyse durch Trypsinieren geerntet.

Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen in PBS aufgenommen und resuspendiert. Jede Zellsuspension wurde dann auf zwei Röhrchen aufgeteilt, sodass das jeweilige Duplikat für den jeweiligen Assay (Apoptose-Assay und Zellzyklus-Analyse) genutzt werden konnte, welche sich ab diesem Schritt voneinander unterscheiden (siehe 2.2.13 und 2.2.14; Material s. Tabelle 14-15)

2.2.13 Zellzyklusmessungen mittels Durchflusszytometrie

In Anknüpfung an die Schritte aus Abschnitt 2.2.12 wurden die Röhrchen für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes folgte ein weiterer Waschschrift mit 1 mL PBS und eine erneute Zentrifugierung für 5 Minuten bei 1000 rpm. Der Überstand wurde bis zum Zellpellet abgesaugt. Unter ständigem Vortexen wurden dann langsam 700 µL Ethanol (100 %) hinzugefügt, um die Zellen zu fixieren. Nach einer weiteren Zentrifugation und einem

Waschschritt mit PBS wurden die Zellen in FACS-Zellzykluspuffer resuspendiert. Dieser Puffer besteht aus 2 µg / mL Propidiumiodid (PI) und 200 µg / mL RNaseA (Qiagen, 100 mg / mL). Die Zellpellets wurden in jeweils 500 µL dieses Puffers resuspendiert und kurz im Vortex-Mixer vermengt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert, dann bis zur Messung auf Eis gelagert und vor jeder Messung nochmals kurz im Vortex-Mixer vermengt. Die Messung der Proben, bei der mindestens 5×10^4 Zellen gezählt wurden, erfolgte mit dem MACSQuant® Analyzer 10 (Version 2.13.0) Durchflusszytometer. Die Auswertung wurde mit der MACSQuantify Software Version 2.11 durchgeführt.

2.2.14 Apoptose-Assay mittels Durchflusszytometrie

In Anknüpfung an die Schritte aus Abschnitt 2.2.16 wurden die Röhrchen für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugierung wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 1 mL Annexin V-Bindepuffer gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Pro Röhrchen wurde ein Mastermix bestehend aus 70 µl Annexin V-Bindepuffer, 5 µl Annexin V-FITC-Konjugat und 7,5 µl Propidiumiodid (PI) angesetzt (insgesamt 82,5 µL). Das jeweilige Zellpellet wurde darin resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden pro Probe nochmals 500 µL Annexin V-Bindepuffer hinzugefügt, gut im Vortex-Mixer vermengt und die Proben bis zur Messung auf Eis gelagert. Die Messung der Proben, bei der mindestens 5×10^4 Zellen gezählt wurden, erfolgte mit dem MACSQuant® Analyzer 10 (Version 2.13.0) Durchflusszytometer. Die Auswertung wurde mit der MACSQuantify Software Version 2.11 durchgeführt.

2.2.15 Online Tools

Die Genexpressionslevel in Tumor- und Normalgewebe sowie der verschiedenen Subtypen von KZT aus der TCGA-Kohorte wurde mit Hilfe des Online Tools *cBioPortal for Cancer Genomics* (<https://www.cbioportal.org>) analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Molekulare Charakterisierung testikulärer Keimzelltumoren

3.1.1 Analyse der mRNA-Expression molekularer Targets in testikulären Keimzelltumoren

Es wurden in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nettersheim bereits die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12 Genexpressions- und Protein-Level in KZT-Zelllinien und -gewebe (SEM: TCam-2, EC: 2102EP, CC: JAR, JEG-3, BeWo, YST: GCT72, EC / YST: 1411H) sowie Fibroblasten (HVHF2, MPAF) untersucht. Hierbei waren SEM positiv für CXCR4 / CXCR4, EC negativ für CXCR4 / CXCR4 und negativ bis schwach positiv für CXCR7 / CXCR7, YST doppelt-positiv für CXCR4 / CXCR4 und CXCR7 / CXCR7, CC nur CXCR7 / CXCR7-positiv und letztlich wiesen Mischtumoren CXCR4 / CXCR4 und CXCR7 / CXCR7 auf.³³

Repräsentativ wurde die Genexpression von CXCR4 / 7 in KZT der TCGA (‘The Cancer Genome Atlas’) -Kohorte mittels cBioPortal-Analyse in Abbildung 3 dargestellt. Hier konnten die Expressionsmuster von CXCR4 und CXCR7 in KZT weitestgehend bestätigt werden: Aus der Abbildung lässt sich erkennen, dass SEM eine verstärkte CXCR4⁺- Expression aufwiesen, jedoch CXCR7⁻ waren. EC waren CXCR4⁻ und CXCR7⁺, YST CXCR4⁺ und CXCR7⁺ und Mischtumoren sowohl CXCR4⁺ als auch CXCR7⁺.

Um den molekularen Einfluss des Liganden CXCL12 auf die CXCR4 / CXCR7-Achse in KZT charakterisieren zu können, wurden zunächst in einem Screening einzelne Ziele möglicher Signalwege ausgewählt, die in anderen Tumorarten im Zusammenhang mit der Aktivierung über die CXCR4 / CXCR7-Rezeptoren stehen. Die Genexpression der identifizierten Zielgene (*BCL2*^{43,44}, *CFOS*^{45,46}, *CD44*^{47–49}, *COL3A1*^{50,51}, *CCND1*^{43,44}, *EGFR*^{52,53}, *IL6*^{54,55}, *ITGA4*⁵⁵, *MMP1*^{56,57}, *MMP3*^{56,57}, *SRC*^{43,58}, *TGFB1*^{52,59,60}, *-2*^{59,61}, *-3*^{59,61}, *VEGFA*^{53,62}) wurde ebenfalls in der TCGA-Kohorte in KZT untersucht. In SEM wurde eine erhöhte Expression von *CD44*, *IL6*, *ITGA4*, *MMP2* und *TGFB1* beschrieben. EC zeigten eine erhöhte Expression bei *CFOS*, *COL3A1*, *CCND1*, *IL6*, *MMP1* und *VEGFA*. In YST waren vor allem *CCND1*, *SRC*, *TGFB2* und *VEGFA* erhöht. In den gemischten KZT, zu denen auch die CC gehören, zeigt sich eine erhöhte Expression nahezu aller identifizierten Zielgene. Lediglich *IL6* und *MMP3* wiesen keine verstärkte Expression auf.

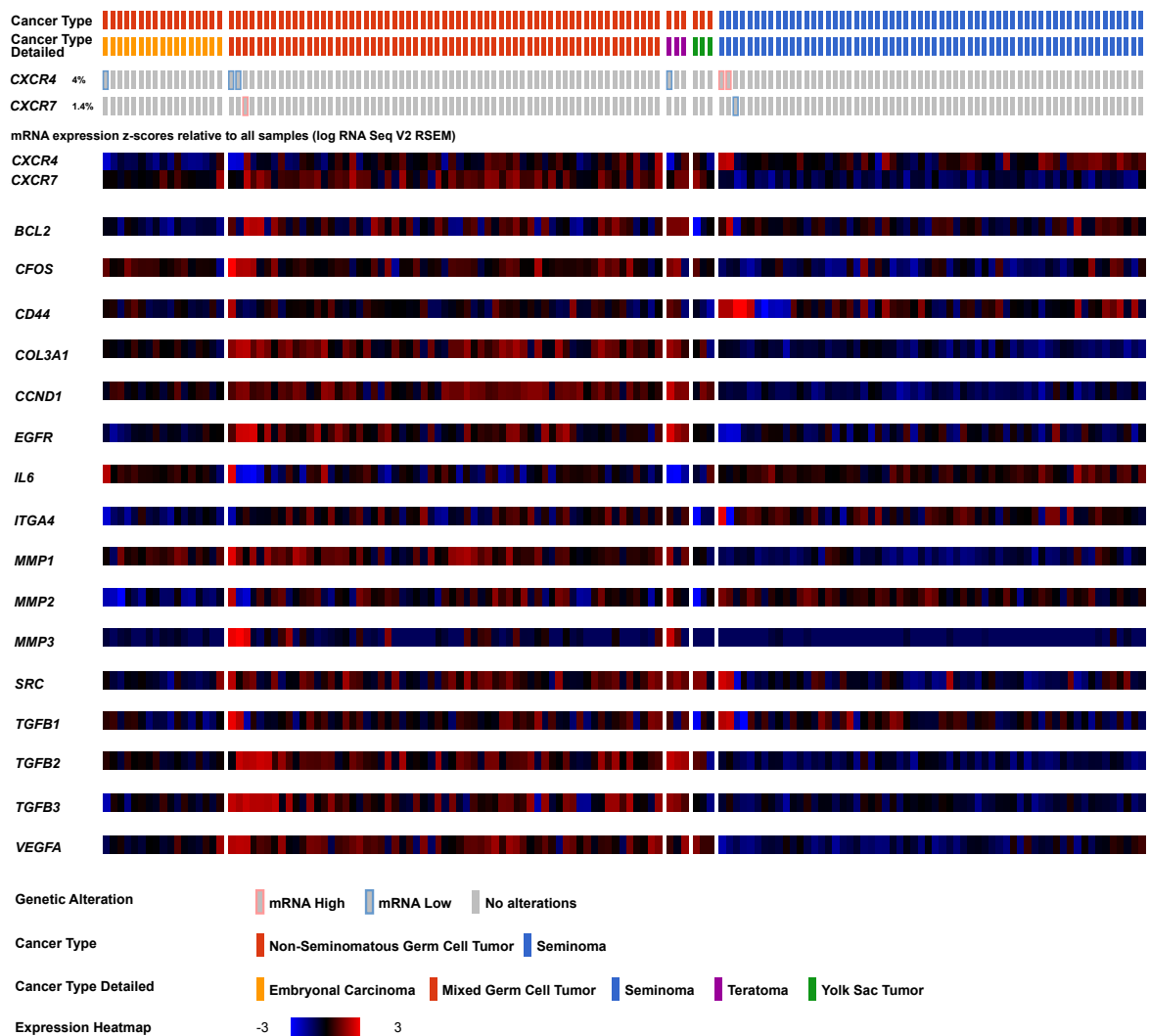


Abbildung 3: cBioPortal-Analysen der Genexpressionsmuster von *CXCR4* und *CXCR7* in SEM (blau, erste Zeile) und Nicht-SEM (rot, erste Zeile), sowie potentieller *CXCR4* / 7 / *CXCL12*-Achse nachgeschalteter Zielgene in KZT in der TCGA-Kohorte⁶³. Adaptiert aus Wakileh et al.⁶⁴

3.1.2 Analyse der Expressionsmuster identifizierter Zielgene in testikulären Keimzelltumoren nach *CXCL12*-Stimulation

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, inwiefern die identifizierten Targets, welche in die *CXCR4* / *CXCR7*-Kaskade involviert sind, unter dem Einfluss einer *CXCL12*-Stimulation in KZT stehen. Dazu wurden aus den Tumorsubtypen diejenigen ausgewählt, welche mindestens *CXCR4*⁺ oder *CXCR7*⁺ oder beides waren. Mittels qRT-PCR wurde anschließend die Genexpression der einzelnen Zielgene nach *CXCL12*-Stimulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht; in Abbildung 4 dargestellt, sind

diejenigen Targets, welche mindestens einen Unterschied im Grenzwert von 2 aufwiesen, bei einer Dosis von 250 ng / mL. *FOS* zeigte in allen Zellreihen ein verstärktes Expressionsmuster, insbesondere nach 8 h war die Expression des Gens signifikant erhöht. Darüber hinaus zeigte sich ein sehr heterogener Effekt der CXCL12-Stimulation auf die verschiedenen Zelllinien hinsichtlich der untersuchten Targets. *CD44* zeigte eine zeitabhängige Verstärkung der Expression in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} auf. Kein Unterschied zur Kontrolle wurde in TCam-2^{CXCR4+}-Zellen (in SEM ist *CD44* jedoch bereits erhöht), BeWo^{CXCR4- / CXCR7+} (ebenfalls erhöhte Expressionsmuster im TCGA) und 1411H^{CXCR4+ / CXCR7+} beobachtet. Ähnlich wie bei *CD44* wurde auch bei *COL3A1* ein erhöhtes Expressionsmuster in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} festgestellt, während in den anderen Zelllinien kein signifikanter Effekt beobachtet wurde. Diese Beobachtung gilt auch für die Gene *ITGA4*, *MMP3* und *TGFB2*, bei denen eine isolierte Steigerung der Expression in GCT72 beobachtet werden konnte. Zusammenfassend zeigte sich vor allem bei *FOS* eine erhöhte Expression in allen Zelllinien; ebenso scheint *IL6* durch die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse verstärkt exprimiert zu werden, da bis auf in 1411H in allen Zelllinien *in vitro* eine verstärkte Expression beobachtet wurde. *BCL2* zeigte sich in den CXCR4⁺ / CXCR7⁺-Zellen GCT72 und 1411H erhöht.

Auf die Zelllinien bezogen lässt sich folgendes zusammenfassend feststellen: in BeWo^{CXCR7+} konnte eine erhöhte Expression von *CD44*, *COL3A1*, *IL6*, *ITGA4*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *TGFB1*, -2 und -3 zeit- und dosisabhängig beobachtet werden (s. Anhang 1). In GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} waren *BCL2*, *CD44*, *COL3A1*, *CCND1*, *EGFR*, *IL6*, *ITGA4*, *MMP2* und -3, *TGFB2* und *VEGFA* zeit- und dosisabhängig erhöht; in TCam-2^{CXCR4+} zeigte sich eine verstärkte zeit- und dosisabhängige Expression von *IL6*, *SRC* und *VEGFA*, in 1411H eine zeit- und dosisabhängige Erhöhung von *BCL2*, *CCND1*, *ITGA4*, sowie *MMP1*, -2 und -3 (s. Anhang 1).

Eine weitere interessante Beobachtung ist schlussendlich, dass sich die Effekte der CXCL12-Stimulation in KZT auf mRNA-Ebene über die Zeit gesehen verringern.

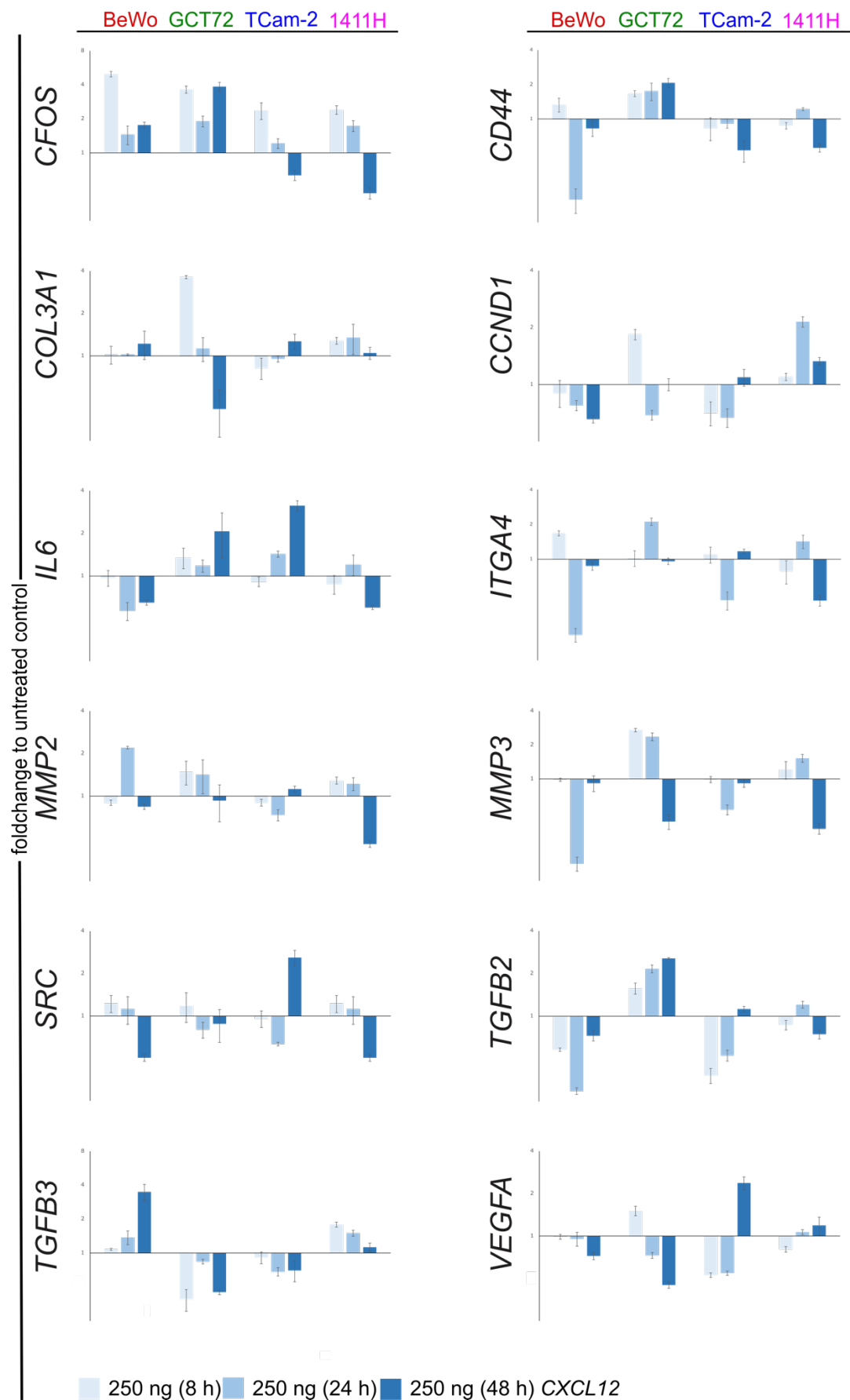


Abbildung 4: qRT-PCR-Daten der mRNA-Expression einzelner Gene in KZT nach Applikation von 250 ng CXCL12 nach 8 h, 24 h und 48 h. Foldchange im Vergleich zur Kontrolle ohne CXCL12-Applikation.

3.1.3 Analyse der Aktivierung des MAPK-Signalwegs in CXCR4⁺-und CXCR7⁺-YST

Bei dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der in anderen Forschungsarbeiten beschriebene CXCL12- abhängige MAPK-Signalweg auch in KZT durch CXCL12-Stimulation aktiviert wird.^{32,37,65}

Hierzu wurden Analysen mittels Western-Blot durchgeführt, um die Proteinlevel von phosphoryliertem ERK nach CXCL12-Stimulation nach je 2 h und 24 h zu untersuchen. Abbildung 5 zeigt dabei die Proteinniveaus von pERK (Thr202 / Tyr204) in der YST-Zelllinie GCT72^{CXCR4⁺ / CXCR7⁺}. Es konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zur Kontrolle zu keiner relevanten Steigerung der Proteinlevel von pERK (Thr202 / Tyr204) kommt, was dafürspricht, dass CXCL12 in KZT, im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten, seine Wirkung über andere Signalwege vermittelt.

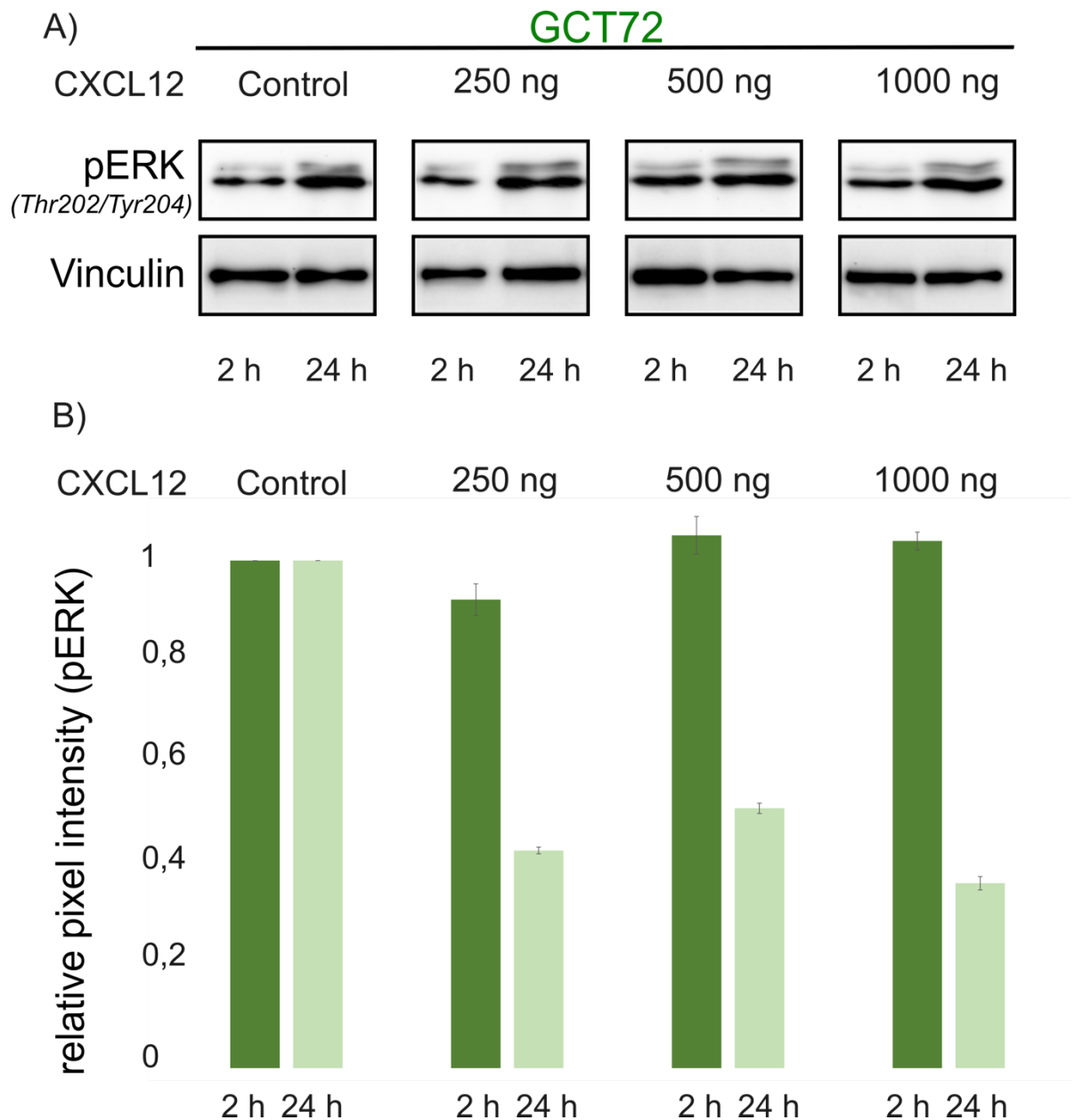


Abbildung 5: A) Western-Blot Analysen von pERK (Thr202/Tyr204) in der YST-Zelllinie GCT72 nach Behandlung mit rekombinantem CXCL12-Protein (250 ng, 500 ng und 1000 ng) für je 2 h und 24 h, sowie einer Lösemittelkontrolle ohne Behandlung. Als Ladekontrolle wurde Vinculin gewählt. B) Densiometrische Auswertung der in A) dargestellten Western-Blot Analysen mit Angabe der relativen Pixelintensität von pERK normalisiert zur Ladekontrolle (Vinculin) im Vergleich zur Lösemittelkontrolle ohne Behandlung.

3.1.4 ERK (MAPK)-Inhibition induziert

CXCR4- und CXCR7-Expression in EC

In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass CXCL12 über CXCR4 / CXCR7 zu einer Aktivierung der ERK1 / 2 Signalkaskade führt.³⁷ Da EC CXCR4 / CXCR7-negativ sind, sollte getestet werden, ob es mittels ERK-Inhibition zu vermehrten CXCR4 und CXCR7-Proteinleveln kommen kann. Dafür wurden drei EC-Zelllinien (2102EP, NT2/D1 und NCCIT^{CXCR4- / CXCR7-}) mit einem ERK1 / 2-Inhibitor (SCH772984) täglich für insgesamt 96 h behandelt. Anschließend wurde mittels Western Blot untersucht, ob die Behandlung mit dem Inhibitor im Vergleich zur Kontrolle zu einer Verminderung der ERK1 / 2-Phosphorylierung (T202 / Y204-T185 / Y187) führte. In 2102EP^{CXCR4- / CXCR7-} führte die Behandlung mit SCH772984 zu einer verringerten Aktivität sowohl von pERK als auch tERK. Dies konnte ebenfalls in NT2/D1^{CXCR4- / CXCR7-} beobachtet werden. In NCCIT^{CXCR4- / CXCR7-} zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kein Unterschied in pERK, allerdings waren ebenfalls die Proteinspiegel von tERK reduziert. Somit konnte gezeigt werden, dass SCH772984 zu einer effektiven Inhibition von ERK in EC führte.

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob die ERK-Inhibition einen Effekt auf die CXCR4 / CXCR7-Expression in den EC hat. Hierzu wurden die Zelllinien für je 48 h und 96 h mit dem Inhibitor behandelt, anschließend wurde der Effekt auf die Expression von CXCR4 / CXCR7 mittels qRT-PCR getestet. In Bezug auf die CXCR4-Expression konnte in 2102EP kein Unterschied beobachtet werden. NT2/D1 zeigte insbesondere nach 96 h ein erhöhtes Expressionsniveau auf, wohingegen NCCIT keinen Unterschied in der Expression von CXCR4 im Vergleich zur Kontrolle aufwies. Bemerkenswert ist, dass bei der Testung auf CXCR7, alle Zelllinien ein erhöhtes Expressionsmuster zeigten. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der MAP-Kinase (Abbildung 6 A und B) zu einer teilweise verstärkten Expression von CXCR4 und zu einer verstärkten Expression von CXCR7 in allen diesen Tumor-Subtypen führte (Abbildung 6 C). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der ERK-Signalweg die CXCR7-Expression in EC *in vitro* inhibiert; zusätzlich scheint dies in der NT2/D1-Zelllinie auch bei CXCR4 der Fall zu sein.

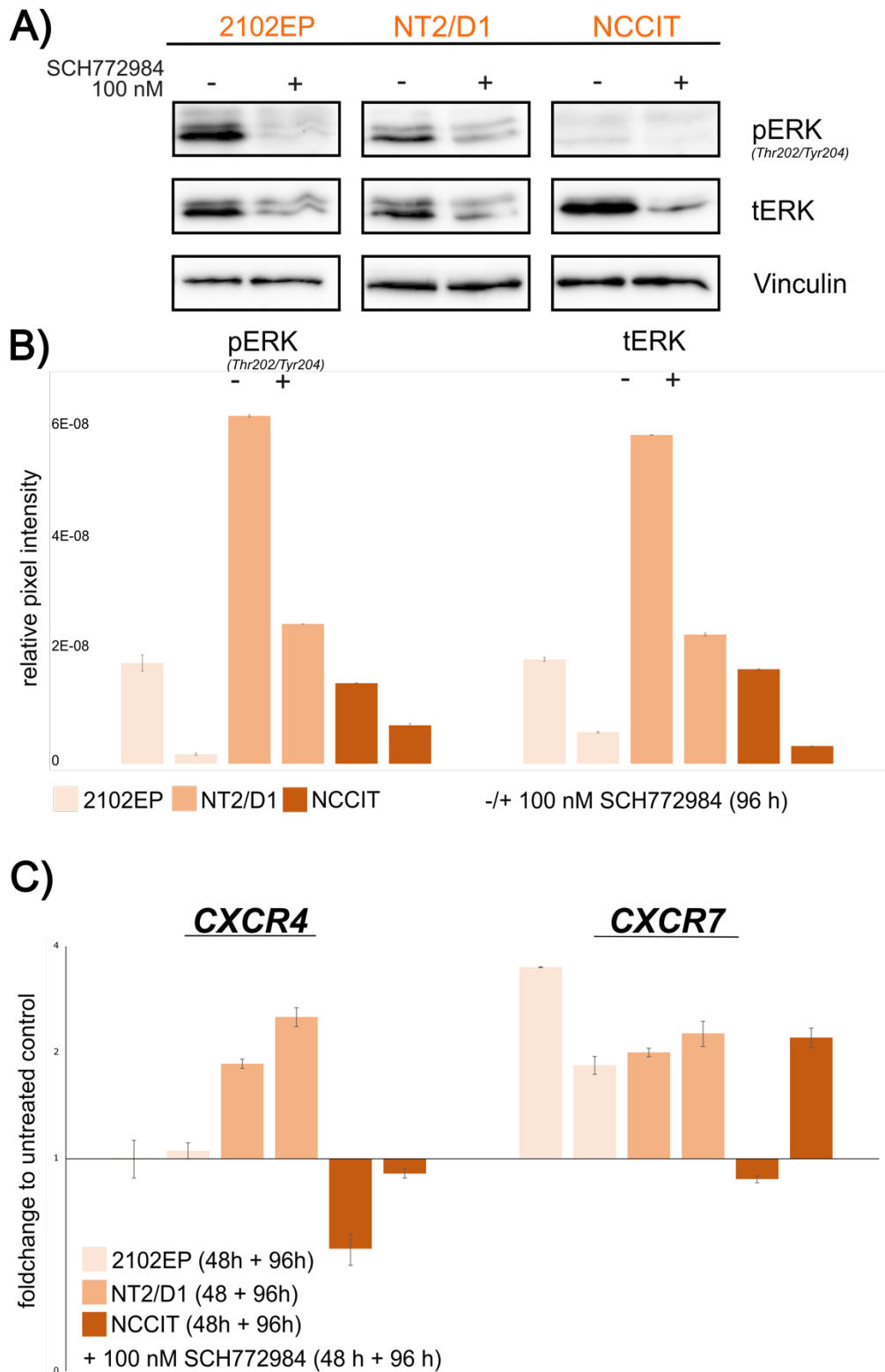


Abbildung 6: A) Western-Blot-Analysen von pERK (Thr202 / Tyr204) und gesamtem ERK der Embryonalkarzinom-Zellen (2102EP, NCCIT, NT2 / D1), die täglich für 96 h mit 100 nM ERK-Inhibitor SCH772984 behandelt wurden. Vinculin wurde als Referenzprotein verwendet B) Densiometrische Auswertung der in A) dargestellten Western-Blot Analysen mit Angabe der relativen Pixelintensität von pERK und tERK normalisiert zur Ladekontrolle (Vinculin).C) Relative Expression von CXCR4 und CXCR7 in den EC-Zelllinien (2102EP, NCCIT, NT2/D1), die täglich für 48 und 96 h mit 100 nM SCH772984 behandelt wurden. ACTB und GAPDH wurden als Referenzgene verwendet.

3.1.5 Analyse der mRNA-Expression molekularer Targets in EC nach MAPK-Inhibition

Anschließend sollten die mit dem MAPK-Inhibitor behandelten EC-Zelllinien mittel qRT-PCR ebenfalls auf unterschiedliche CXCR4- und CXCR7-Targets getestet werden, um einen möglichen Einfluss der Rezeptoren auf die Signalwege in EC zu untersuchen. 2102EP zeigte sich CXCR4⁻ / CXCR7⁺, NCCIT zeigte sich nach 96h CXCR4⁻ / CXCR7⁺ und NT2/D1 zeigte nach 96 h eine CXCR4⁺ / CXCR7⁺-Expression auf. Wie in Abbildung 7 deutlich wird, war die Expression einiger Gene in den verwendeten Zelllinien erhöht (dargestellt sind die Targets, welche einen erhöhten Grenzwert mit einem Foldchange >2 im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen, vgl. Anhang 2); interessanterweise zeigt sich hierbei ein sehr ähnliches Muster in der Expression wie zuvor in den nach CXCL12-Stimulation getesteten Zellreihen TCam-2, GCT72, 1411H und BeWo. *BCL2* zeigte, ebenso wie *CCND1* eine signifikant erhöhte Expression in 2102EP und NCCIT, während in NT2/D1 kein Unterschied zur Kontrolle beobachtet werden konnte. *CFOS*, *COL3A1* und *IL6* waren in allen Zellreihen der EC erhöht exprimiert. Interessanterweise war die erhöhte Expression von *CFOS* auch schon in den zuvor getesteten Zellreihen (s. Abb.4) zu beobachten, während *IL6* in BeWo, GCT72 und TCam-2 eine erhöhte Expression zeigte (s. Anhang 1). Weiterhin zu beachten ist, dass *COL3A1* in den CXCR4⁺ / CXCR7⁺-Zellreihen (GCT72, NT2/D1) und in den CXCR4⁻ / CXCR7⁺-Zelllinien (BeWo, 2012EP, NCCIT) erhöht erschien, während in der CXCR4⁺ / CXCR7⁻-Zellreihe TCam-2 kein Effekt beobachtet werden konnte.

Ansonsten zeigten sich wieder sehr heterogene Ergebnisse in den PCR-Analysen. So zeigte sich bei *EGFR* eine isolierte Erhöhung nach 48 h in 2102EP, während *MMP2* ausschließlich in NCCIT nach 96h erhöht war. *SRC* zeigte eine verstärkte Expression nach MAPK-Inhibitor-Behandlung nach 48 h in NT2/D1 und nach 96 h in NCCIT. Des Weiteren war *TGFB3* in den beiden genannten Zelllinien nach 96 h erhöht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nach MAPK-Inhibition vor allem die Gene *CFOS*, *COL3A1*, *IL6* und *BCL2* über die CXCR4 / CXCR7- Rezeptoren in EC in vitro aktiviert wurden.

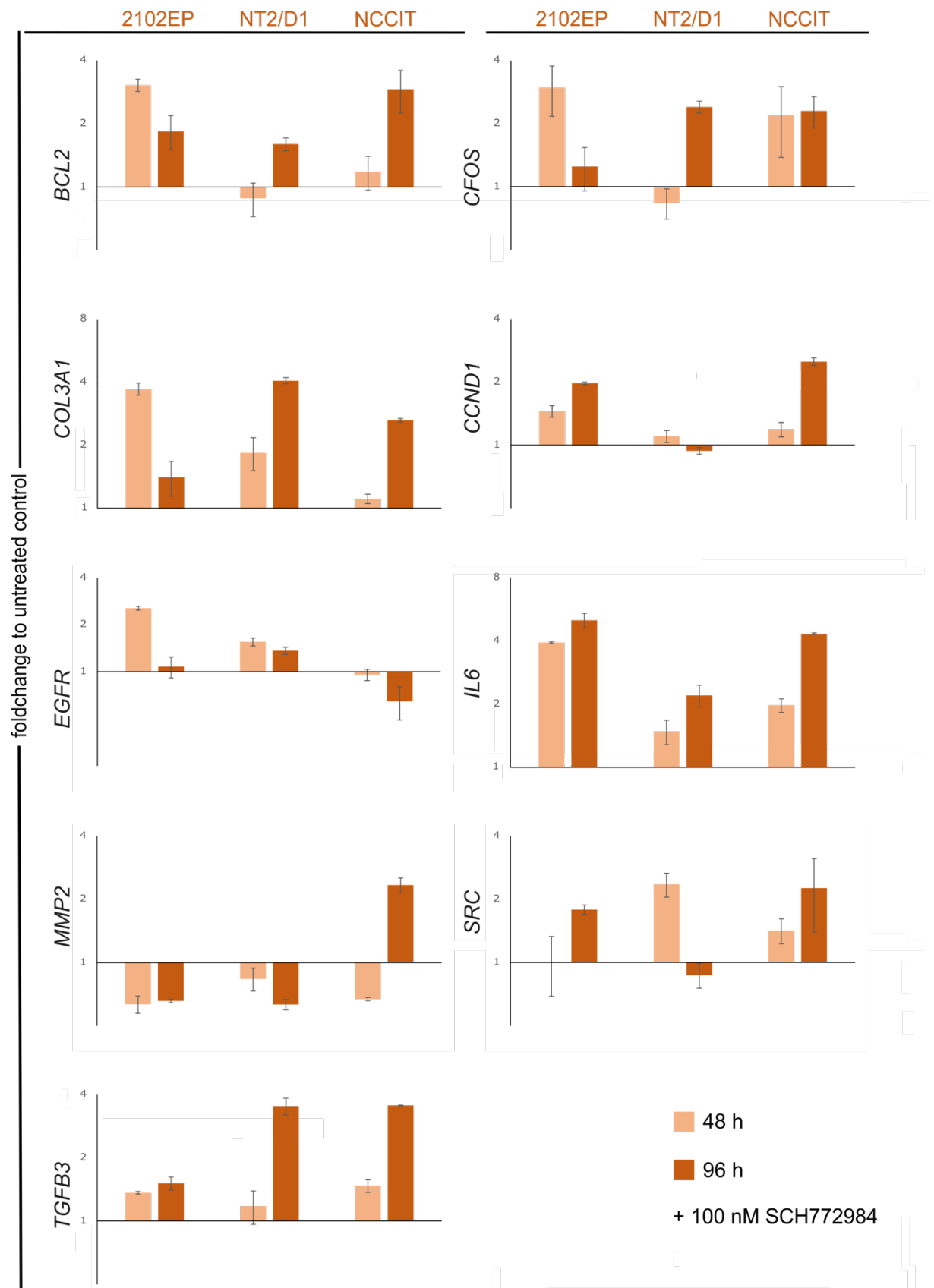


Abbildung 7: qRT-PCR-Daten der relativen Expression einzelner Gene in EC-Zelllinien (2102EP, NCCIT, NT2/D1), die täglich für 48 und 96 h mit 100 nM SCH772984 behandelt wurden. ACTB und GAPDH wurden als Referenzgene verwendet.

3.1.6 Analyse des Human Phospho Kinase Array

Der Effekt von CXCL12 auf die Subtypen der KZT wurde mittels Human-Phospho-Kinase-Array, einem Test zur Identifikation von relativen ortsspezifischen Phosphorylierungen von 43 Kinasen, durchgeführt. Dazu wurden KZT-Zellen für 24 h mit jeweils 250 ng / mL rekombinanten CXCL12-Protein behandelt. Abbildung 8 zeigt dabei die densitometrische Auswertung der entsprechenden Phosphorylierungsstellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der Übersicht wegen wurden nur die Phosphorylierungen dargestellt, bei denen im Vergleich zur Kontrolle mindestens eine Differenz in der Pixeldichte von 1000 auftrat. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit rekombinanten CXCL12 in einer Dosis von 250 ng / mL für 24 h zu einer erhöhten Phosphorylierung von Akt 1 / 2 / 3 (S473), Akt 1 / 2 / 3 (T308) und Chk-2 in 1411H führte, allerdings nicht in den anderen Zelllinien (TCam-2, GCT72 und BeWo). Des Weiteren wurde in einigen Phosphorylierungsstellen eine Verringerung der Aktivität ausschließlich in der GCT72-Zelllinie beobachtet, während es in den anderen Zellen zu keiner signifikanten Aktivitätsveränderung im Vergleich zur Kontrolle kam; dies war bei c-Jun, p70 S6 Kinase (T389), p70 S6 Kinase (T421 / S424), PYK2, RSK 1 / 2 / 3 und STAT1 der Fall. CREB war ausschließlich in GCT72 und die Phosphorylierung von HSP60 war ausschließlich in 1411H und GCT72 verringert; kein Effekt konnte bei TCam-2 und BeWo beobachtet werden. Die Behandlung mit CXCL12 führte zu erhöhter Aktivität von GSK-3 α / β (S21 / S9) und GSK-3 β (S9) in 1411H und BeWo; im Gegensatz dazu war die Aktivität dieser zwei Kinasen in GCT72 herabgesetzt. Außerdem konnte in TCam-2 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Einige Phosphorylierungsstellen zeigten ausschließlich einen Unterschied zur Kontrolle in BeWo und GCT72. So war die Aktivität von PRAS40 und RSK 1 / 2 in BeWo erhöht, in GCT72 jedoch verringert. Dieser entgegengesetzte Effekt konnte auch in STAT3 (S727) gezeigt werden. Ein gesteigerter Effekt der Aktivität bei der Tyrosinkinase Yes konnte ausschließlich in BeWo beobachtet werden. Ebenfalls erhöhte Phosphorylierung in BeWo wurde in Src beobachtet, zusätzlich war dies auch bei 1411H der Fall. Signifikante Effekte in zwei von vier Zelllinien konnten in ERK 1 / 2 und STAT5 α / β beobachtet werden. Dabei war bei ERK 1 / 2 die Aktivität in 1411H und GCT72 vermindert; in BeWo wurde kein Effekt im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. In STAT5 α / β (Y694/Y699) wiesen 1411H, BeWo und TCam-2 eine erhöhte

Phosphorylierung auf. Interessanterweise konnte bei β -Catenin und WNK1 eine Veränderung in der Phosphorylierungsaktivität in allen vier Zelllinien beobachtet werden. GCT72 verhielt sich wieder gegensätzlich zu den anderen Zelllinien, indem eine Verringerung der Aktivität beobachtet werden konnte. TCam-2, 1411H und BeWo zeigten eine Erhöhung auf. Letztlich ist noch zu nennen, dass in p53 (S15), p53 (S392) und p53 (S46) ebenfalls Aktivitätsunterschiede in der Phosphorylierung gezeigt werden konnten. So war diese in 1411H lediglich in p53 (S392) erhöht, in BeWo in p53 (S392) und p53 (S46), in GCT72 war sie interessanterweise in p53 (S392) erhöht, während p53 (S15) und p53 (S46) verringert waren. TCam-2 zeigte in allen drei Phosphorylierungsstellen von p53 verringerte Aktivität auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vor allem in GCT72 in nahezu allen oben genannten Proteinen eine verringerte Phosphorylierung nach CXCL12-Behandlung beobachtet werden konnte. Lediglich in p53 (S392) zeigte sich eine erhöhte Aktivität, während p53 (S15 / S46) verringert waren. Ebenfalls zu bemerken ist, dass in BeWo zwar im Vergleich ein geringerer Effekt gezeigt werden konnte, es jedoch in 12 von 25 getesteten Proteinen zu einer Verstärkung der Phosphorylierung kam. 1411H zeigte einen heterogenen Effekt hinsichtlich der Phosphorylierung im Unterschied zur Kontrolle. Auch hier konnte ein Effekt in 13 von 25 getesteten Proteinen beobachtet werden; 11 zeigten eine Verstärkung der Phosphorylierung, zwei zeigten einen entgegengesetzten Effekt. In der SEM-Zelllinie TCam-2 wurde bei 6 Proteinen ein signifikanter Aktivitätsunterschied gezeigt. In vier Fällen kam es zu einer Erhöhung, in drei Fällen (allesamt p53- Phosphorylierungsstellen) zu einer Verringerung. Somit bestätigte sich in diesem Versuch ebenfalls die Vermutung, dass in KZT die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12 -Achse ihre Wirkung scheinbar nicht über Erk vermittelt. Zusätzlich scheint p53 (S392) in CXCR7⁺-Zelllinien *in vitro* verstärkt phosphoryliert, während es in TCam-2 (CXCR4⁺) verringert phosphoryliert wird.

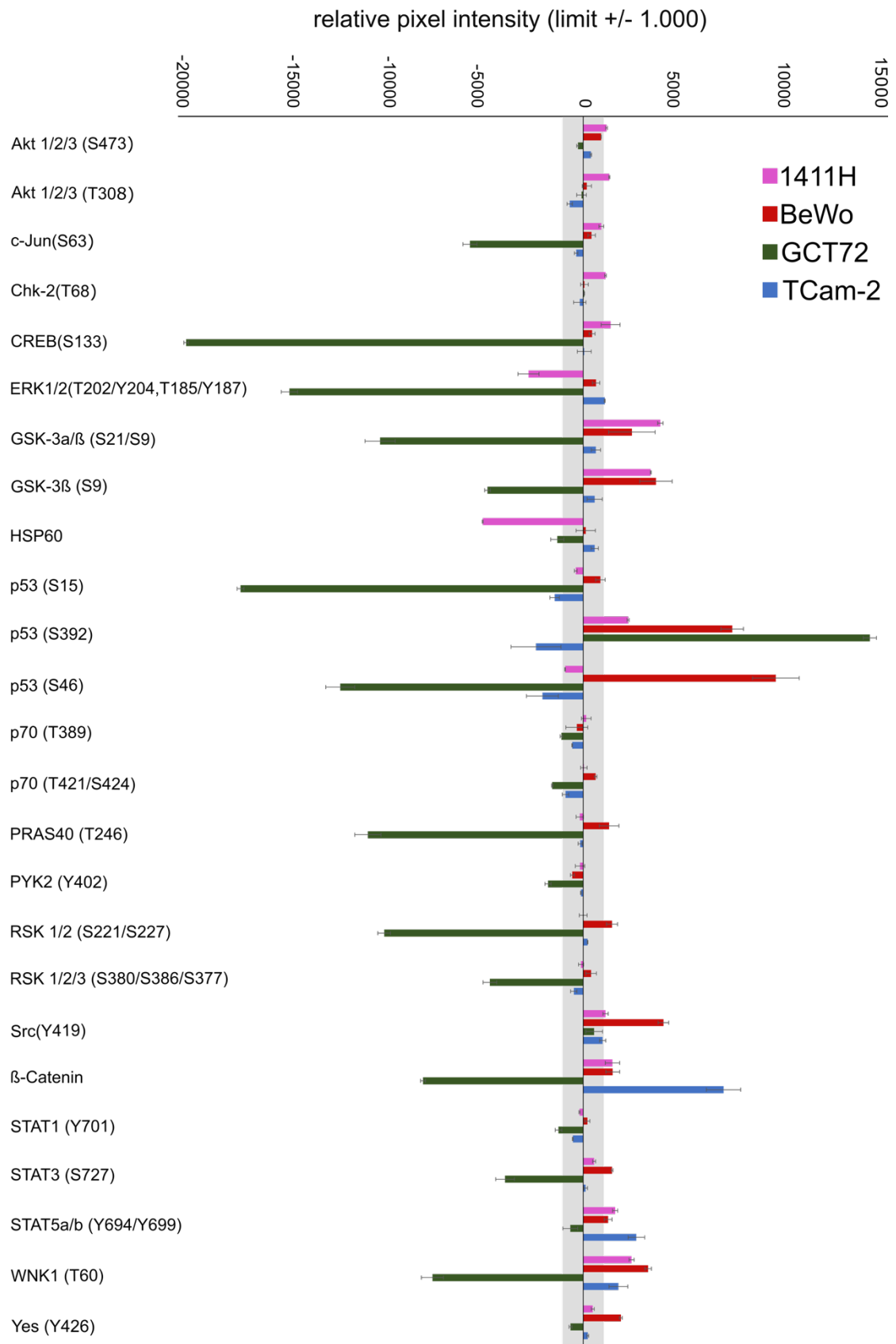


Abbildung 8: Mittels humanen Phospho-Kinase-Arrays gemessene densitometrische Auswertung der relativen Pixelintensitäten (normalisiert auf unbehandelte Kontrollen) der angegebenen Phosphorylierungsstellen in Zelllysaten von 1411H, BeWo, GCT72 und TCam-2, die mit rekombinantem CXCL12 (250 ng / mL) für 24 h behandelt wurden.

3.2 CXCR4-MMAE gekoppelte Nanobodies als therapeutische Option zur Behandlung testikulärer Keimzelltumoren

Es konnte gezeigt werden, dass die molekulare Charakterisierung der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse eine wichtige Rolle bei der Erforschung von KZT spielt. Die nach CXCL12-Stimulation beobachteten Ergebnisse in Teil 3.1. lassen darauf schließen, dass die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse an einer verstärkten Förderung der Tumorprogression in KZT beteiligt ist. Angesichts dessen und der beschriebenen Resistenzmechanismen von KZT gegenüber etablierten Therapien über diese Achse, ist die Erforschung zusätzlicher Therapieoptionen, die auf die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse abzielen, von großer Bedeutung.

3.2.1 CXCR4-MMAE gekoppelte Nanobodies verringern die Zellviabilität von testikulären Keimzelltumoren

Die Wirksamkeit der CXCR4-MMAE gekoppelten Nanobodies im Vergleich zu CXCR4-Nanobodies ohne gekoppeltes Spindelgift in KZT wurde mittels XTT getestet; hierfür wurde pro KZT-Subtyp mindestens eine Zelllinie ausgewählt (SEM: TCam-2, TCam-2-R, EC: 2102EP, CC: BeWo, YST: GCT72, EC / YST 1411H). Als Kontrollzelllinie dienten Fibroblasten (MPAF) (s. Abbildung 9 A). Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die MMAE-gekoppelten Nanobodies nach bis zu 96 h zu einer Verringerung der Zellviabilität der KZT-Zelllinien führten, wohingegen der CXCR4-Nanobody auf alle Zelllinien (inklusive Kontrollzelllinie) wenig bis teilweise gar keinen Einfluss auf die Zellviabilität zeigte. Der Effekt der MMAE-gekoppelten Nanobodies auf die Kontrollzelllinie viel im Vergleich zu den KZT ebenfalls deutlich geringer aus. In Bezug auf die einzelnen Zelllinien wurden Unterschiede in Bezug auf die Toxinsensitivität festgestellt. TCam-2 und TCam-2-R zeigten eine konzentrations- und zeitabhängige signifikante Verminderung der Zellviabilität in allen Konzentrationen. Der CXCR4-Nanobody führte in beiden Zelllinien hingegen zu keiner relevanten Verringerung der Zellviabilität, selbst bei der höchsten Konzentration von 500 nM nach 96 h. 2102EP zeigte bei 100 nM im Vergleich zu SEM eine geringere Sensitivität, sprach jedoch bei 250 nM und 500 nM effektiver an. Auch hier zeigte der CXCR4-Nanobody keine relevante Reduktion der Viabilität. 1411H und GCT72 zeigten ein ähnlich effektives

Ansprechen auf die CXCR4-MMAE gekoppelten Nanobodies nach 96 h. Besonders 1411H wies bei 100 nM eine stärkere Reduktion der Zellviabilität auf. Der CXCR4-Nanobody allein zeigte keinen relevanten Effekt bei 100 nM und 250 nM, nur bei 500 nM nach 72 h. In GCT72 wurde in allen drei Konzentrationen des CXCR4-MMAE-Nanobody eine zeitabhängige Reduktion der Viabilität beobachtet, während der CXCR4-NB keine relevante Verringerung brachte. Die stärkste Verminderung der Zellviabilität in allen Konzentrationen wurde bei der BeWo-Zelllinie beobachtet, während der CXCR4-Nanobody keine effektive Verminderung bei 100 nM und 250 nM zeigte. Bei 500 nM wurde nach 72 h eine beginnende Reduktion der Zellviabilität beobachtet. In der Kontrollzelllinie zeigten beide Nanobodies, MMAE-gekoppelt und ungekoppelt, eine geringe Wirkung auf die Viabilität. Im ungekoppelten Nanobody wurde nur nach 96 h bei der höchsten Dosis eine geringe Reduktion der Viabilität beobachtet, während der MMAE-Nanobody im Vergleich zu den KZT-Zelllinien über die Zeit eine deutlich geringere Reduktion der Viabilität zeigte. Anschließend wurde die EC_{50} nach 72 h der CXCR4-MMAE-Konjugate in den Zelllinien berechnet (s. Abbildung 9 B). Die höchste Potenz zeigte das Toxin in der BeWo-Zellreihe ($EC_{50} < 100$ nM), die geringste in der MPAF-Kontrollzelllinie. Die restlichen Zelllinien zeigten einen vergleichbaren Wert hinsichtlich relativer Potenz des Toxins. So konnte in den SEM-Zelllinien beobachtet werden, dass die resistenten TCam-2-R-Zellen eine höhere Konzentration benötigen (243,1 nM) als die nicht-resistenten SEM (186,5 nM) um 50 % der maximal beobachteten Wirkung zu erreichen. Mit einer EC_{50} von 171,1 nM konnte bei 2102EP eine ähnliche Wirkung wie bei TCam-2 beobachtet werden. Die ähnlichen effektiven Konzentrationen der CXCR4-MMAE-Nanobodies bei 1411H (209,9 nM) und GCT72 (204,4 nM) lagen unter der von TCam-2-R, jedoch höher als die von TCam-2 und 2102EP. Die Kontrollzelllinie wies mit einer EC_{50} von > 500 nM, im Vergleich zu den Tumorzellreihen, eine mindestens doppelt so hoch benötigte Dosis auf.

Zusammenfassend konnte also beobachtet werden, dass die CXCR4-MMAE-Nanobodies eine Möglichkeit zur Reduktion der Zellviabilität von CXCR4⁺-KZT-Zelllinien *in vitro* darstellen könnten; insbesondere für SEM und YST. Es zeigte sich in allen KZT-Zelllinien eine Verringerung über die Zeit und Konzentration, wohingegen die Kontrollzelllinien weitestgehend vital blieben; die deutlich höhere EC_{50} in den Fibroblasten könnte dabei die Möglichkeit einer therapeutischen

Dosis eröffnen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die CXCR4-spezifischen Nanobodies ohne MMAE, zu keiner relevanten Viabilitätsreduktion führten, was auf einen günstigen Effekt hinsichtlich der Toxizität von Nanobodies in KZT deuten lässt.

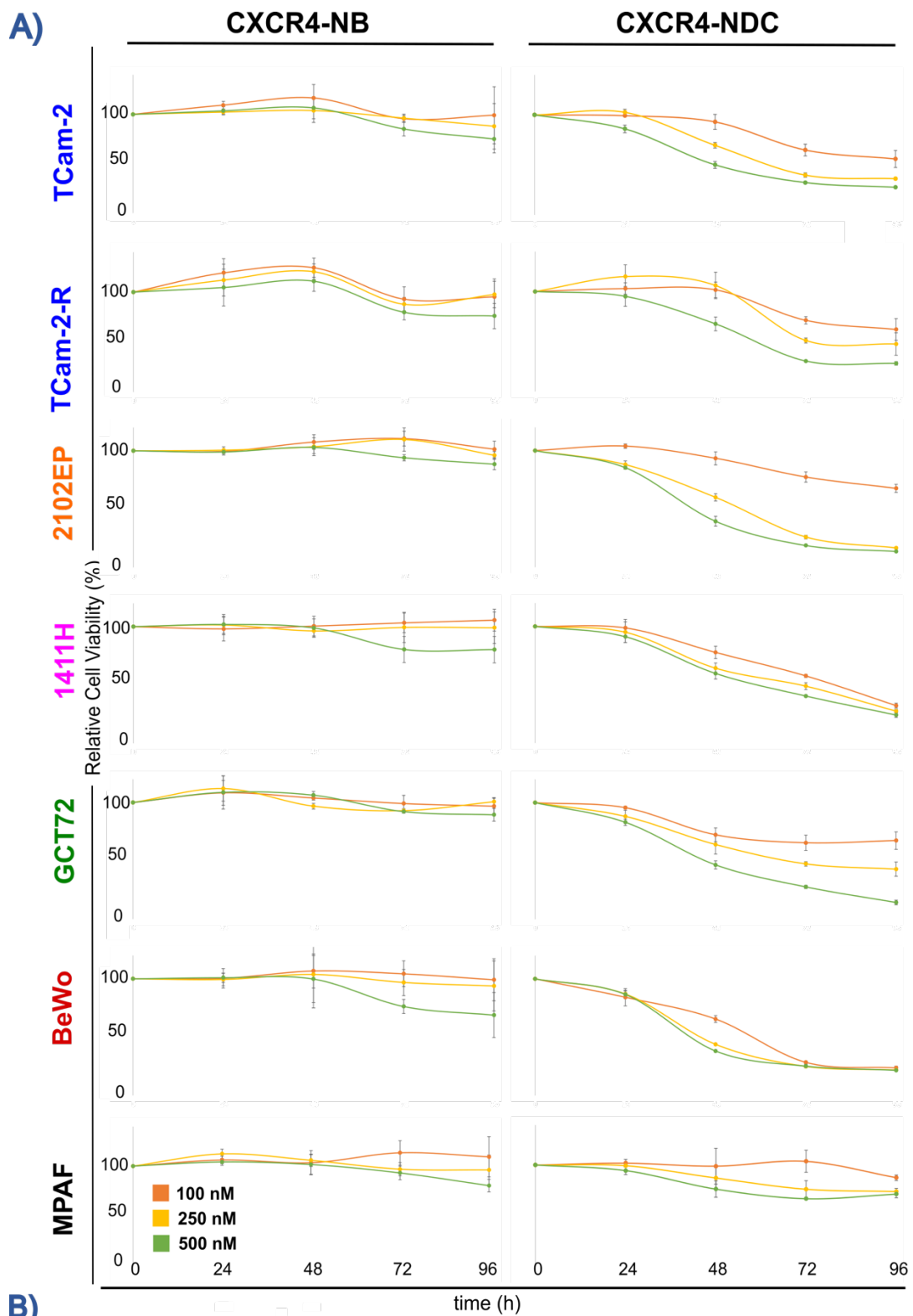


Abbildung 9: A) XTT-Zellviabilitätsassays von Keimzelltumor-Zelllinien und Fibroblasten (MPAF), die 24, 48, 72 und 96 h lang mit CXCR4-NDC (CXCR4+MMAE) oder CXCR4-NB allein behandelt wurden B) LD50-Werte (nM), gemessen durch XTT-Zellviabilitätsassays 72 h nach der Behandlung mit CXCR4-MMAE-Nanobodies.

3.2.2 CXCR4-MMAE gekoppelte Nanobodies induzieren Apoptose und Zellzyklusarrest in testikulären Keimzelltumoren

Anschließend wurde untersucht, welchen zellulären Effekt die MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies haben und ob es hierbei zu Veränderungen im Vergleich zum CXCR4-Nanobodies ohne MMAE kommt. Hierzu wurden die Zelllinien mit den ermittelten EC_{50} jeweils mit den MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies und den CXCR4-Nanobodies für 48 h behandelt und anschließend mittels durchflusszytometrischen Analysen auf ihren Apoptosestatus und Zellzyklus hin ausgewertet. In allen KZT-Zelllinien zeigte sich nach 48-stündiger Behandlung eine stärkere Apoptoserate (s. Abbildung 10) in den mit MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies behandelten Zellen als mit den ungekoppelten CXCR4-Nanobodies. Der stärkste Effekt konnte, wie bereits bei der Zellviabilität, in der BeWo-Zellreihe beobachtet werden. Bei den Zelllinien TCam-2, TCam-2-R, 2102EP und 1411H zeigte sich ein moderater Anstieg apoptotischer Zellen, die im Vergleich zum CXCR4-Nanobody jedoch allesamt deutlich höher lagen. Lediglich bei GCT72 konnte nur ein geringer Anstieg der Apoptoserate im Verhältnis zum reinen CXCR4-Nanobody beobachtet werden. Im Vergleich dazu zeigte sich in der Anzahl apoptotischer Zellen in den Fibroblasten-Kontrollzellen kein relevanter Unterschied zwischen den verwendeten CXCR4+MMAE- und CXCR4-Nanobodies.

In den Zellzyklus-Analysen zeigten TCam-2, TCam-2-R, 2102EP und BeWo eine Arretierung in der G2 / M- und S-Phase, wohingegen in den 1411H Zellen ein Arrest in der G1 / G0-Phase zu beobachten war (s. Abbildung 11). Lediglich die YST-Zelllinie (GCT72) zeigte kaum eine signifikante Veränderung im Zellzyklus. Bei den Kontrollzelllinien (MPAF) konnte ebenfalls kaum ein Effekt beobachtet werden. Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine Behandlung mit MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies im Vergleich zum CXCR4-Nanobody zu einer deutlichen Veränderung im Zellzyklus in den meisten KZT führte; dieser Effekt ist zusätzlich deutlich ausgeprägter in den meisten KZT-Zelllinien als in den Kontrollzelllinien. Die Behandlung der Zelllinien führt dabei zur Induktion von Apoptose und zur mitotischen Katastrophe in vor allem CXCR4⁺-KZT *in vitro* (s. Anhang 4).

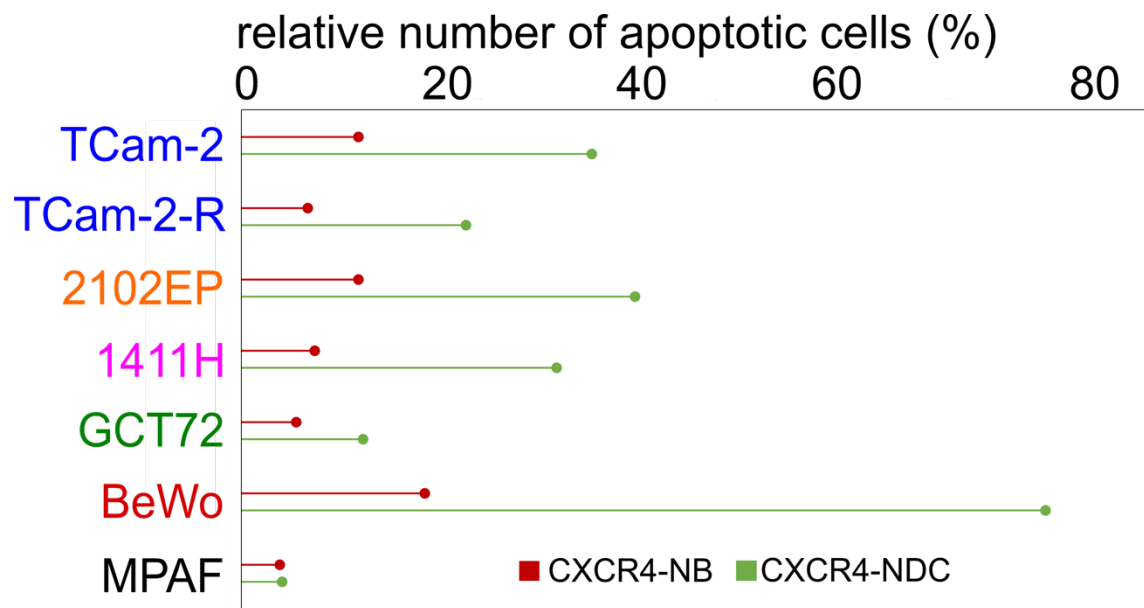


Abbildung 10: Zusammenfassung der relativen Anzahl apoptotischer Zellen in KZT-Zelllinien und MPAF-Zelllinie nach Behandlung für 48 h mit entweder CXCR4-MMAE-Nanobodies oder CXCR4-NB allein.

Cell Cycle - CXCR4-NDC

Change compared to CXCR4-NB (%)

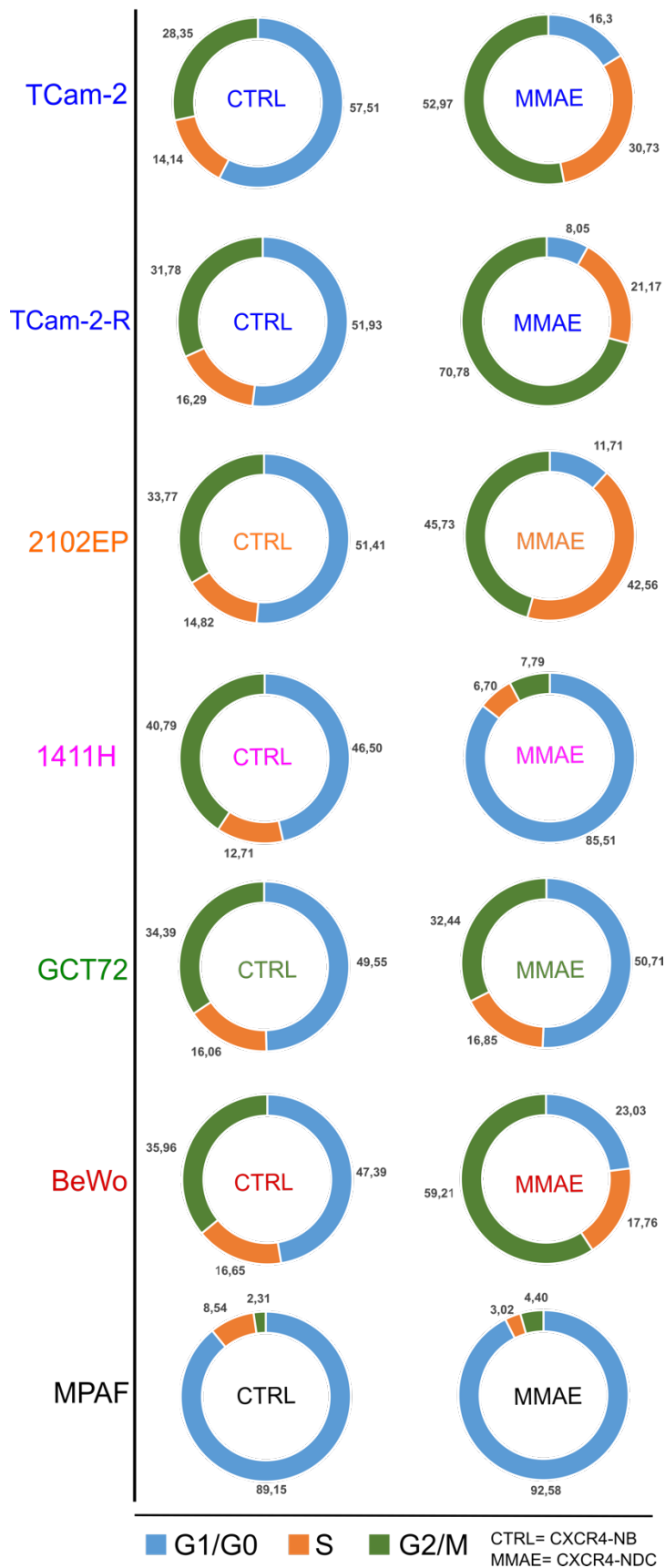


Abbildung 11: Veränderungen im Zellzyklus in KZT-Zelllinien und CXCR4-MPAF-Zelllinie nach Behandlung für 48 h mit CXCR4-MMAE-Nanobodies im Vergleich mit CXCR4-NB allein.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in KZT molekularbiologisch zu charakterisieren und CXCR4 als potenzielles therapeutisches Ziel für die KZT-Behandlung zu identifizieren. Der Fokus lag auf der Erforschung der intrazellulären Signalwege, die durch die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse beeinflusst werden. Zusätzlich wurde die mögliche therapeutische Anwendung von MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies bei der KZT-Behandlung untersucht. Die Arbeit zielte darauf ab, die therapeutischen Potenziale dieser Nanobodies durch die Analyse von Zellviabilität, Apoptose-Induktion und Auswirkungen auf den Zellzyklus zu bewerten. Die molekulare Charakterisierung der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse sollte auch dazu dienen, potenzielle Zielmoleküle oder Signalwege zu identifizieren, die als Ansatzpunkte für zukünftige Therapien von Bedeutung sein könnten. Insgesamt sollte die Arbeit eine Grundlage für weitere Forschung im Bereich der KZT-Therapie schaffen.

4.1 Die CXCL12-Wirkkaskade in testikulären Keimzelltumoren auf mRNA-Ebene

Es konnte nachgewiesen werden, dass die *CFOS*-Genexpressionshöhe nach CXCL12-Stimulation in allen getesteten KZT-Zelllinien erhöht war. *CFOS* ist ein Protoonkogen, welches an der Förderung der Zellproliferation, der Zellmigration und der Neoangiogenese in Tumorzellen beteiligt ist; es gehört zu den sogenannten „*Immediate Early*“-Genen und wird schnell nach einer zellulären Stimulation aktiviert.^{66,67} Die beobachtete frühe Aktivierung nach CXCL12-Stimulation in den getesteten KZT-Zelllinien spricht dafür, dass die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse an einer verstärkten Förderung der Zellproliferation, der Zellmigration und der Neoangiogenese in KZT beteiligt sein könnte; es wäre interessant, weitere Experimente durchzuführen, welche dies untersuchen. Die Diskrepanz, zwischen der in der TCGA-KZT-Kohorte beschriebenen verringerten mRNA-Expression von *CFOS* und der von uns beobachteten, erhöhten Expression nach CXCL12-Stimulation in SEM, spricht zusätzlich für eine CXCL12-abhängige Aktivierung des *FOS*-Signalwegs und deutet auf einen möglichen Mechanismus in der Tumorprogression in KZT hin. Neuartige

Wirkstoffe, welche die *CFOS*-Genexpressionshöhe reduzieren und somit ihre Aktivität hemmen, könnten einen vielversprechenden Ansatz für die Anwendung gezielter Therapien in KZT darstellen.

IL6, dessen Bedeutung in der Tumorbilogie bereits vielfach beschrieben wurde, wies in $\text{BeWo}^{\text{CXCR7}+}$, $\text{GCT72}^{\text{CXCR4}+ / \text{CXCR7}+}$ und $\text{TCam-2}^{\text{CXCR4}+}$ eine verstärkte mRNA-Expression nach CXCL12-Stimulation auf. Außerdem zeigten die erhöhten Expressionsniveaus von *IL6* in EC nach MAPK-Inhibition, dass MAPK *IL6* in EC möglicherweise unterdrückt. Zu erwähnen ist außerdem, dass in der KZT-Kohorte des TCGA, *IL6* im Vergleich zu anderen KZT-Subtypen in SEM konstant erhöht exprimiert erschien. In CXCR4^+ -SEM spielt das Zytokin *IL6* möglicherweise eine wichtige Rolle im Immunescape-Mechanismus durch lokale Immunsuppression.⁶⁸ Die erhöhten Genexpressionsspiegel von *IL6* nach CXCL12-Stimulation in $\text{GCT72}^{\text{CXCR4}+ / \text{CXCR7}+}$ und $\text{BeWo}^{\text{CXCR7}+}$ könnten dafürsprechen, dass auch in CXCR7^+ -KZT eine *IL6* vermittelte Immunsuppression zur Tumorprogression führt. Funktionelle Analysen könnten hierüber weiteren Aufschluss bringen, um von den in dieser Arbeit erhöhten Genexpressionsniveaus auch auf eine mögliche Funktion Rückschlüsse ziehen zu können. Außerdem konnte bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass *IL6* die Entstehung von KZT fördern könnte; zum einen könnte ein pro-inflammatorisches Mikromilieu die Tumorgenese fördern, da das umliegende Mikromilieu von KZT vermehrt *IL6* ausschüttet, zum anderen konnten in GCNIS erhöhte *IL6*-Genexpression nachgewiesen werden.^{69–71} Daher eröffnet *IL6* als Zielmolekül in KZT nicht nur Möglichkeiten, als früher Biomarker in der Tumordiagnostik zu fungieren, sondern bietet auch durch den Zugang über die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse die Chance, neue Therapien zu etablieren.

In $\text{GCT72}^{\text{CXCR4}+ / \text{CXCR7}+}$ (YST) und $1411\text{H}^{\text{CXCR4}+ / \text{CXCR7}+}$ (EC / YST) zeigte sich nach CXCL12-Behandlung ein erhöhtes Genexpressionslevel von *BCL2*. Eine erhöhte Expression des anti-apoptotischen Gens *BCL2* in Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe ist bekannt für eine schlechte Reaktion auf systemische Krebsbehandlungen, da es die chemotherapeutisch induzierte Apoptose inhibiert; die Herunterregulierung der *BCL2*-Expression mithilfe von Antisense-Oligonukleotiden hatte in klinischen Phase-I- bis -III-Studien bei verschiedenen

Krebsarten, wie z.B. der chronisch-lymphatischen Leukämie, dem multiplen Myelom, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und dem Prostatakarzinom, gezeigt, dass die Chemosensitivität effektiv erhöht werden konnte.^{72,73} In Typ-2-KZT war *BCL2* an der Ausbildung einer Cisplatin-Resistenz beteiligt.⁷⁴ Die Stimulation mit einem rekombinanten CXCL12-Protein könnte dazu führen, dass die Aktivität der apoptotischen Kaskade in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} (YST) und 1411H^{CXCR4+ / CXCR7+} (EC / YST) *BCL2*-vermittelt abnimmt und somit zur hohen Resistenz dieser Tumorentitäten gegenüber Cisplatin beiträgt. *BCL2* könnte somit ein potentes Target für neue Therapieansätze spielen, insbesondere in diesen oftmals hochresistenten Tumorentitäten (YST und Mischtumoren).

In den Zelllinien BeWo^{CXCR7+} und GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} konnte nach CXCL12-Stimulation eine verstärkte Genexpressionshöhe von *CD44* festgestellt werden. *CD44* ist ein multifunktionales Zelloberflächenmolekül, das an der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration, der Angiogenese, der Präsentation von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren an den entsprechenden Rezeptoren und dem Andocken von Proteasen an der Zellmembran sowie an der Signalübertragung für das Zellüberleben beteiligt ist; es steht auch mit den pathologischen Aktivitäten von Krebszellen in Verbindung, welche sich hierfür die beschriebenen Eigenschaften zunutze machen.⁴⁷ Es steht darüber hinaus im Zusammenhang mit den ebenfalls untersuchten Targets *TGFB1*, *EGFR*, welche zusammen Zelldifferenzierung vermitteln und *SRC*, mit dem es zusammen die Migration von Ovarialtumoren fördert.^{48,49}

COL3A1, welches in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} erhöhte mRNA-Expression zeigte, ist ein Gen, welches für Typ-III-Kollagen kodiert und an der Vermittlung von Cisplatin-Resistenzen in verschiedenen Tumorarten, wie z.B. Lungenkrebs, beteiligt ist, indem es Zellwachstum fördert und Apoptose vermindert.⁵¹ Die initial erhöhte Expression von *COL3A1* nach 8 h in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} deutet auf eine frühe CXCL12-abhängige Aktivierung in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} hin, welche in anderen Tumorarten wie z.B. Plattenepithel-Karzinomen Proliferation, Migration und Invasion fördert und den NF-κB-Signalweg aktiviert.⁵⁰ Darauf deutet auch der Vergleich mit der TCGA-KZT-Kohorte hin, in denen YST keine erhöhte Expression von *COL3A1* aufweisen. In den Zellreihen BeWo^{CXCR7+}, TCam-

2^{CXCR4+} und 1411H^{CXCR4+ / CXCR7+} hingegen scheint die Expression von *COL3A1* nicht im Zusammenhang mit einer CXCL12-Stimulation zu stehen.

Interessanterweise führte die CXCL12-Stimulation in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} auch zu einer höheren Genexpression von *ITGA4*, welches in YST generell nicht erhöht exprimiert erscheint. In SEM (TCam-2^{CXCR4+}), in denen gezeigt werden konnte, dass *ITGA4* verstärkt exprimiert wird, scheint CXCL12 keinen Einfluss auf die Genexpressionshöhe zu haben.⁶⁸ Dies gilt scheinbar auch für BeWo^{CXCR7+} und 1411H^{CXCR4+ / CXCR7+}. *ITGA4* ist in der chronisch lymphatischen Leukämie ein prognostischer Marker, der mit *CXCR4*-Expression assoziiert ist.⁷⁵

Es konnte in CXCR7-positiven Brustkrebszellen gezeigt werden, dass bei Anwesenheit von CXCL12 und vermehrter Expression von *TGFB*, die Metastasierung von Tumorzellen in Abhängigkeit von *TGFB* gefördert wird, indem *TGFB* die in Brustkrebszellen beobachtete CXCL12-vermittelte, metastasenhemmende Wirkung inhibiert.⁷⁶ Auf mRNA-Ebene konnte beobachtet werden, dass in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} nach CXCL12-Stimulation ebenfalls *TGFB2* über die Zeit verstärkt exprimiert wird, was für einen ähnlichen Mechanismus der Metastasierung wie in Brustkrebs sprechen könnte. Zusätzlich zeigte BeWo^{CXCR7+} (CC) ebenfalls eine Steigerung der Expression von *TGFB3* über die Zeit. Wie in Abb. 3 deutlich wird, sind basale Genexpressionsniveaus von *CXCR7* und *TGFB* in CC verstärkt exprimiert; die erfolgte Stimulation mit CXCL12 sowie die anschließend verstärkte Genexpressionshöhe von *TGFB3* könnte auch hier für eine Aktivierung über den CXCL12 / CXCR7-Signalweg sprechen, der letztlich in der Metastasierung von CC mündet. Um diese Hypothese zu bestätigen sind die beobachteten Effekte in der Genexpressionshöhe weiter zu untersuchen um funktionelle Rückschlüsse zuzulassen.

Die getesteten Matrix-Metallo-Proteasen zeigten erhöhte CXCL12-abhängige Genexpressionsniveaus in BeWo^{CXCR7+} (*MMP2*) und in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} (*MMP3*); sie spielen oftmals eine entscheidende Rolle in der Tumorprogression, indem sie z.B. die extrazelluläre Matrix abbauen und so Invasion und Metastasierung fördern; beispielsweise wird in Pankreas-Karzinomen *MMP2*

CXCL12-abhängig hochreguliert und in Brustkrebs korreliert eine erhöhte CXCR7-Expression mit gesteigertem *MMP3-Niveau*.^{32,77,78}

1411H^{CXCR4+ / CXCR7+} und GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} zeigten nach CXCL12-Stimulation eine erhöhtes Genexpressionsniveau von *CCND1*, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1411H^{CXCR4+ / CXCR7+} nach 24 h, GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} nach 8 h). In Blasentumoren konnte gezeigt werden, dass CXCR7 einen funktionellen Komplex mit dem *EGF-Rezeptor* bildet, welcher die Phosphorylierung von PI3-Kinase / Akt, Erk und Src induzierte und ebenfalls die Hochregulierung von *CCND1* induzierte.⁷⁹ Zwar konnte nach CXCL12-Stimulation in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} eine zeitlich und dosisabhängige erhöhte Genexpression von *EGFR* und *CCND1* gezeigt werden, ein ähnlicher Effekt blieb in der 1411H^{CXCR4+ / CXCR7+}-Zelllinie jedoch aus, zumal *SRC* ausschließlich in TCam-2^{CXCR4+} eine verstärkte Expression nach CXCL12-Stimulation aufwies. Somit könnte die Funktion von *CCND1*, welches häufig in Tumoren, z.B. Plattenepithelkarzinomen, vermehrt exprimiert wird und dessen Wirkung klassischerweise durch den *EGF-Rezeptor* vermittelt wird, auch in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} untersucht werden.⁸⁰

Die ausschließlich in TCam-2^{CXCR4+} beobachtete CXCL12-abhängig erhöhten Genexpressionsspiegel von *SRC* könnten für eine mögliche Aktivierung der Metastasierung durch CXCL12 / CXCR4 in SEM sprechen, zumal *SRC* in SEM generell niedrig exprimiert wird (s. Abb. 3); funktionelle Analysen könnten hierüber mehr Aufschluss bringen. In der Lymphknotenmetastasierung von Brustkrebs bei Mäusen führte die CXCL12 / CXCR4-Achse-vermittelte Aktivierung des *SRC* / NF-κB-Signalwegs in Tumorzellen zur Metastasierung.³⁷

Die Genexpressionshöhe der untersuchten Targets wurde in unterschiedlicher Weise durch CXCL12-Stimulation beeinflusst; welche funktionellen Konsequenzen sich daraus, etwa im Hinblick auf eine tumorprogressive Wirkung der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse, ergeben, stellt einen vielversprechenden Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen dar, insbesondere mit Hinblick einer zielgerichteten Target-Therapie.

Dabei stellt sich die Frage, wieso es zu so einem so unterschiedlichen mRNA-Expressionsmuster in den verschiedenen Tumorentitäten kommen konnte, obwohl alle Zellen CXCR4 und / oder CXCR7 exprimierten; beispielsweise zeigten ausschließlich die CXCR4⁺ / CXCR7⁺ - Zelllinien GCT72 und 1411H eine erhöhte Expression von *BCL2*. Zusätzlich ist zu klären, wieso die Effekte je nach CXCL12-Dosis so unterschiedlich ausfielen; es zeigte sich lediglich ein über die Zeit abnehmender Effekt in den KZT nach CXCL12-Stimulation. Da vor allem *CFOS*, *IL6* und *BCL2* CXCL12-abhängig in Korrelation mit mehreren KZT-Subtypen gleichzeitig standen, könnten Sie Gegenstand weiterer Forschung und Versuche sein, um neue Perspektiven für gezielte Therapieansätze in der Behandlung von KZT zu eröffnen. Genauer gesagt ist vor allem zu klären, welche spezifischen Mechanismen hinter der erhöhten *CFOS*-Expression nach CXCL12-Stimulation in KZT-Zelllinien stecken, und ob diese zur Zellproliferation, Zellmigration und Neoangiogenese in KZT beitragen. Des Weiteren besteht die Frage, welche Rolle *IL6* in der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse spielt, insbesondere in Bezug auf Immunsuppression und Tumorprogression in KZT, und ob *IL6* als Zielmolekül für Diagnostik und Therapie genutzt werden kann.

4.2 Verringerte MAPK-Signalisierung in CXCL12-stimulierten KZT

In YST (GCT72^{CXCR4+} / CXCR7⁺) konnte die CXCR4 / CXCR7-Signalkaskade unabhängig von der MAPK (ERK 1 / 2) -Phosphorylierung aktiviert werden. In EC-Zellen führte die ERK 1 / 2-Inhibition hingegen zu einer Hochregulation von CXCR7 und in NT2/D1 zusätzlich von CXCR4, was darauf hinweist, dass die MAPK-Signalisierung die Expression dieser Rezeptoren unterdrückt. Im Gegensatz dazu scheint in YST eine verringerte MAPK-Aktivität Voraussetzung für die CXCR7-Expression zu sein.

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die MAPK-Wirkkaskade eine entscheidende Rolle bei der Modulation dieser Expression in verschiedenen Zelltypen spielt. Kritisch zu betrachten ist hierbei der Gegensatz zur zuvor beschriebenen CXCL12-abhängigen Aktivierung der MAPK aus anderen Studien.^{32,37,65} Woher diese Diskrepanz kommt, sollte weiter untersucht werden. Eine wichtige Rolle spielt dabei, dass die CXCL12-abhängige Aktivierung der MAPK in anderen Arbeiten entweder nicht in KZT getestet wurde, oder die

Zeitpunkte der Beobachtung anders gewählt wurden; im Vergleich wurden beispielsweise HEK293-Zellen (Abkürzung aus dem Englischen für „Human Embryonic Kidney“-Zellen), welche sich von humanen embryonalen Nierengewebezellen ableiten, verwendet.⁸¹ Ein weiteres Beispiel zeigt zwar die Verwendung von TCam-2-Zellen, allerdings wurde die erfolgte Stimulation durch 100 ng / mL CXCL12 bereits nach fünf Minuten ausgewertet.⁸² Die Ergebnisse deuten also zum einen auf eine tumorsubtypspezifische Regulation hin, zum anderen auf eine zeitliche Dynamik der Signalantwort. Interessant wären also Zeitverlaufsanalysen der MAPK-Signalisierung in den einzelnen KZT-Subtypen, insbesondere mit Hinblick auf z.B. eine gezielte Kombination von MAPK-Inhibitoren mit CXCR4 / CXCR7-Antagonisten als möglicher therapeutischer Ansatz.

4.3 Die molekulare Rolle der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse auf Phospho-Proteom-Level

In der Zelllinie 1411H^{CXCR4+ / CXCR7+} war die Phosphorylierung nach CXCL12-Stimulation in p53 (S392) erhöht. In BeWo^{CXCR7+} zeigte sich eine Erhöhung der Phosphorylierung nach CXCL12-Stimulation in p53 (S392) und p53 (S46), während in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} die Phosphorylierung in p53 (S392) erhöht war, jedoch in p53 (S15) und p53 (S46) verringert. TCam-2^{CXCR4+} zeigte eine generelle Verringerung der Aktivität in allen drei Phosphorylierungsstellen von p53. Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung an S392 p53 stabilisiert, die mitochondriale Translokation beeinflusst und eine pro-apoptotische Funktion hat.^{64,83,84} Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von p53 an der Position S15 die Stabilität von p53 erhöht, indem sie die Affinität von p53 für seinen primären negativen Regulator Hdm2 und die Rekrutierung von Transkriptions-Koaktivatoren fördert.^{64,85,86} Bei DNA-Schädigung initiiert die Phosphorylierung an S46 die p53-vermittelte Apoptose durch die Induktion pro-apoptotischer Gene wie *p53AIP1*.^{64,84} CXCL12-stimulierte GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+}-Zellen zeigten ein Phosphorylierungsmuster mit verminderter S15- und S46-Phosphorylierung von p53. Somit könnte eine verminderte Phosphorylierung von p53 (S15 / S46) nach CXCL12-Stimulation die pro-apoptotische Wirkung von p53 in YST verringern. Darüber hinaus zeigte sich eine verminderte Phosphorylierung nach CXCL12-

Stimulation aller p53-Phosphorylierungsstellen in TCam-2^{CXCR4+}. In SEM ist generell ein geringes p53-Proteinlevel im Vergleich zu anderen KZT beschrieben.⁸⁷ Die festgestellte verringerte Phosphorylierung von p53 nach CXCL12-Stimulation könnte zusätzlich die pro-apoptotische Wirkung von p53 in SEM vermindern; zusätzlich stellt der Differenzierungs-Prozess von KZT hin zu YST-Zellen einen bekannten Mechanismus der Resistenzbildung dar, was die Frage aufwirft, inwiefern CXCL12 an diesem Prozess beteiligt sein könnte.^{88,89} Des Weiteren könnte in CXCL12-stimulierten KZT die Phosphorylierung von p53 an S392 (1411H^{CXCR4+} / CXCR7+, BeWo^{CXCR7+}) und S46 (BeWo^{CXCR7+}) auf eine verstärkte und stabilisierte pro-apoptotische p53-Signalkaskade hinweisen.

In GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} zeigten sich zusätzlich verringerte Phosphorylierungen im Vergleich zur Kontrolle in c-Jun (S63), CREB (S133), ERK1 / 2 (T202 / Y204, T185 / Y187), GSK-3α/β (S21 / S9), GSK-3β (S9), PRAS40 (T246), RSK1 / 2 S221 / S227, RSK 1 / 2 / 3 S380 / S386 / S377, β-Catenin (-) und WNK1 (T60). C-Jun ist ein Onkogen welches normalerweise als Komponente des Transkriptionsfaktors AP-1 anti-apoptotisch wirkt und in verschiedenen Tumorarten erhöhte Proteinspiegel aufweist.⁹⁰ Somit stellt sich die Frage, wieso in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} die Aktivität von c-Jun nach CXCL12-Stimulation herunterreguliert wurde. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass einige Proteine der JUN-Familie die Tumorbildung unterdrücken können; die Entscheidung, ob AP-1 onkogen oder anti-onkogen ist, hängt vom Zelltyp und seinem Differenzierungszustand, dem Tumorstadium und dem genetischen Hintergrund des Tumors ab.⁹¹ So verhindert c-Jun beispielsweise die Methylierung des *p16^{INK4a}*-Promotors, einem Tumorsuppressor. Daher kann c-Jun die Genabschaltung des Gens *CDKN2A* verhindern.⁹⁰

GSK-3α / β (S21 / S9) und GSK-3β (S9), Mitglieder der GSK-3-Serin / Threonin-Protein-Kinasen, zeigen ein ähnlich paradoxes Verhalten: Sie fördern den Zelltod durch den mitochondrialen intrinsischen apoptotischen Signalweg, während sie gleichzeitig den durch die Familie der Todesrezeptoren (wie z.B. TNF-R1, Fas, DR4 und DR5) vermittelten extrinsischen apoptotischen Signalweg hemmen.⁹² Phosphorylierungen an den Aminosäureresten S21 / S9 bei GSK-3α und S9 bei GSK-3β führen zur Inaktivierung dieser Kinasen; insbesondere die

Phosphorylierung von GSK-3 β an S9 löst eine zelluläre Reaktion aus, die zur proteasomalen Degradation dieser Kinase führt.⁹³ Dieser Prozess ist von besonderer Bedeutung in Bezug auf die Tumorgenese, da er die Regulation von Signalwegen beeinflusst, die an der Kontrolle von Zellwachstum und -überleben beteiligt sind.⁹³ Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass in BeWo^{CXCR7+} und 1411H^{CXCR4+ / CXCR7+} durch vermehrte Phosphorylierung von GSK-3 α / β (S21 / S9) und GSK-3 β (S9) (vgl. Abb. 8) nach CXCL12-Stimulation der pro-apoptotische intrinsische Signalweg herunterreguliert wird und so letztlich tumorfördernd wirkt. Im Gegensatz dazu steht die verringerte Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle von GSK-3 α / β (S21 / S9) und GSK-3 β (S9) in YST (GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+}). Dies lässt den Rückschluss zu, dass die beiden Kinasen durch verringerte Phosphorylierung nach CXCL12-Stimulation in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} vermehrt aktiv sind und somit ihre tumorfördernde Wirkung insbesondere über die Hemmung des durch die Familie der Todesrezeptoren (wie z.B. TNF-R1, Fas, DR4 und DR5) vermittelten extrinsischen apoptotischen Signalweg entfalten könnten. Des Weiteren lässt sich hierbei eine rein CXCR7-vermittelte Wirkung von CXCL12 vermuten, da GSK-3 α / β (S21 / S9) und GSK-3 β (S9) nach CXCL12-Stimulation in CXCR7⁺-Zellen verringert oder vermehrt phosphoryliert wurde, eine ähnliche Beobachtung in TCam-2^{CXCR4+} jedoch nicht gemacht werden konnte.

β -Catenin und WNK1 zeigten sich nach CXCL12-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle in 1411H^{CXCR4+ / CXCR7+}, BeWo^{CXCR7+} und TCam-2^{CXCR4+} erhöht und in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} verringert phosphoryliert. β -Catenin fördert das Fortschreiten von Tumoren, indem es die T-Zell-Antworten unterdrückt.⁹⁴ Frühere Studien konnten zeigen, dass der Wnt / β -Catenin-Signalweg an der Cisplatin-Resistenz von KZT, beteiligt sein könnte und dass der Wnt / β -Catenin-Signalweg in Zelllinien von Cisplatin-resistenten KZT verändert ist.^{95,96} Interessanterweise wird β -Catenin durch GSK-3-Kinasen reguliert, was die verringerte Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} erklären könnte.⁹⁷

Eine erhöhte WNK1-Expression in KZT konnte bereits gezeigt werden.⁹⁸ Neue Studien konnten außerdem zeigen, dass die Protein-Level von WNK-Kinasen in

verschiedenen Krebsarten, wie z.B. dem Kolonkarzinom, dereguliert sind und diese Kinasen eine Rolle bei der Regulation von Tumorwachstum, Metastasenbildung und Angiogenese spielen.⁹⁹ Ein möglicher Einfluss der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse auf die WNK1-Phosphorylierung in KZT konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

CREB (S133) zeigte sich in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} nach CXCL12-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle vermindert phosphoryliert. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, welcher in zahlreichen Tumorarten, wie z.B. dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, verstärkt phosphoryliert vorliegt.¹⁰⁰ Die Wirkung dieser Phosphorylierung erstreckt sich auf verschiedene Signalwege wie ERK1 / 2, MAPK, PI3K / AKT, CaMK, PKC und PKA; bisher konnten jedoch nur Inhibitoren von CREB identifiziert werden, welche an der Stelle Ser133 wirken. Inwieweit CXCL12 an einer verminderten Phosphorylierung von CREB (S133) in YST-Tumoren beteiligt ist, könnte Gegenstand weiterer Versuche sein. Ein möglicher Ansatz könnte dabei die Überlappung mit anderen Signalwegen sein, welche ebenfalls unter dem Einfluss einer CXCL12-Stimulation stehen und die Phosphorylierung von CREB (S133) beeinflussen; so existieren einige Phosphatasen, wie z.B. die Proteinphosphatase 2A oder die Proteinphosphatase 1, die nach Aktivierung zur Inaktivierung von CREB führen.¹⁰¹

Dass der ERK / MAPK-Signalweg in YST nach CXCL12-Stimulation nicht aktiviert wird, bestätigte sich auch durch eine geringere Phosphorylierung von ERK1 / 2 bei GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+}. Dazu passt auch die beobachtete verringerte Phosphorylierung von RSK1 / 2 und RSK1 / 2 / 3 bei GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+}, welche eine Gruppe von Kinasen darstellen, die als ERK / MAPK-Effektoren bekannt sind.¹⁰²

STAT-Proteine (insbesondere STAT3, aber auch STAT5, STAT1) regulieren sowohl direkt als auch indirekt verschiedene mit dem Stoffwechsel verbundene Prozesse in Krebszellen, darunter aerobe Glykolyse, oxidative Phosphorylierung, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, mitochondriale Energieerzeugung, Regulation der mitochondrialen Membranintegrität, Glutamin-Metabolismus, Lipidsynthese und Lipidkatabolismus; eine entscheidende Rolle der

umprogrammierten Stoffwechselprozesse in der Immunsuppression wird ebenfalls zunehmend deutlich.¹⁰³ STAT scheint dabei eine tumorsuppressive Wirkung zu haben, die sich aus der Regulation von reaktiven Sauerstoffspezies ableitet; aufgrund der konstitutiven Aktivierung des JAK2 / STAT1-Signalwegs hat es jedoch auch tumorfördernde Effekte.¹⁰³ In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass STAT1 und STAT3 (S727) in GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+} nach CXCL12-Stimulation geringer aktiviert wurden, was für eine Umgehung der beschriebenen tumorsuppressiven Wirkung von STAT sprechen könnte. Im Gegensatz dazu zeigten BeWo^{CXCR7+}, 1411H^{CXCR4+ / CXCR7+} und TCam-2^{CXCR4+} eine verstärkte Phosphorylierung in STAT5a / b und STAT3 (S727; nur BeWo^{CXCR7+}), wodurch, CXCL12-bedingt, die zuvor beschriebene Wirkung in KZT vermittelt werden könnte.

Insgesamt konnten in dieser Versuchsreihe mehrere Signalwege die unter dem Einfluss der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse stehen identifiziert werden. Dadurch wurden neue Erkenntnisse über die Rolle der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in KZT und den Einfluss auf das Mikromilieu gewonnen. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind hin Hinblick auf mögliche therapeutische Optionen vielversprechend, da viele der untersuchten Proteine in anderen Tumorarten gut erforscht sind und bereits aktuell neue Ansatzpunkte in der Tumorthherapie darstellen. Da allerdings nur eine Dosis und ein Zeitpunkt gewählt wurde, sollten die Tests um mehrere Zeitpunkte und verschiedene Dosierungen erweitert werden, um den gemachten Beobachtungen eine stärkere Aussagekraft zu verleihen. Wichtig wird dabei die Frage sein, wie die in dieser Studie identifizierten Signalwege gezielt für therapeutische Interventionen genutzt werden können, und welche Rolle dabei unterschiedliche Dosierungen und Zeitpunkte bei der Regulation dieser Signalwege spielen.

4.4 Verringerung von Zellviabilität, sowie Induktion von Apoptose und Zellzyklusveränderungen in KZT durch CXCR4-MMAE gekoppelte Nanobodies

In den durchgeführten Versuchen konnte eine zeit- und dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit CXCR4-MMAE gekoppelten

Nanobodies in KZT beobachtet werden; Kontrollzellen blieben größtenteils vital. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die CXCR4-spezifischen Nanobodies ohne MMAE keine signifikante Verringerung der Zellviabilität bewirkten, was auf eine günstige Wirkung bezüglich der Toxizität von Nanobodies in der zielgerichteten Tumorthherapie von KZT hinweist. Die LD₅₀-Konzentrationen für CXCR4-NDC lagen zwischen <100 und 310,6 nM für KZT und für Fibroblasten bei >500 nM wodurch sich ein therapeutisches Fenster für diese Wirkstoffe bei CXCR4⁺-KZT ergeben könnte.

Die nachgewiesene Apoptose-Induktion und die Beobachtung von mitotischen Katastrophen sind nicht die einzigen Effekte, die im Zusammenhang mit der Behandlung von CXCR4-NDC festgestellt wurden. In Übereinstimmung mit anderen Studien konnte vorwiegend ein Arrest im Zellzyklus in der G2 / M-Phase nachgewiesen werden.¹⁰⁴

MMAE, welches häufig in aktuellen klinischen Studien als zytotoxischer Wirkstoff verwendet wird, weist dabei ein akzeptables Nebenwirkungsprofil auf und ist z.B. mit Brentuximab Vedotin (BV) bereits als Medikament zur Therapie des Hodgkin-Lymphoms durch die Europäische Arzneimittel-Agentur zugelassen.^{41,105} Izutsu et al. berichteten über eine Überwachungsstudie zur BV-Monotherapie bei 284 japanischen Patienten mit rezidiertem oder refraktärem Hodgkin-Lymphom: Die Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 60,5 Jahren und erhielten 5,5 Behandlungszyklen. Die Gesamthäufigkeit von Nebenwirkungen betrug 76,4 %, und 5,5 % der Patienten hatten tödliche Lungentoxizität, einschließlich interstitieller Lungenerkrankung, Atemversagen und akutem Atemnotsyndrom.¹⁰⁶ Somit weisen MMAE-gekoppelte-Wirkstoffe also durchaus relevante Nebenwirkungen auf, inwiefern dies auf CXCR4-Nanobody-MMAE-Konjugate zutrifft, gilt es z.B. in *in-vivo-Versuchen* herauszufinden. Dabei könnten auch weitere zytotoxische Wirkstoffe als Payload zur Kopplung mit einem CXCR4-Nanobody verwendet werden. Es gibt verschiedene Arten von Payloads, die mit Antikörpern / Nanobodies gekoppelt werden, darunter solche, die die Mikrotubuli der Zelle angreifen (wie MMAE), solche, die auf die DNA-Zerstörung abzielen (wie Topoisomerase-1-Inhibitoren), solche mit RNA als Zielstruktur (wie Thailanstatin), und solche, die das Immunsystem ansprechen (wie Toll-like-Rezeptor-Agonisten); Immunstimulierende Antikörper-Konjugate zeichnen sich

dabei durch die Verbindung von präzisiertem antikörpergesteuertem Targeting mit der Fähigkeit aus, das angeborene und adaptive Immunsystem mithilfe kleiner Moleküle zu modulieren, um die Immunantwort zu verstärken, während gleichzeitig, durch die Ausrichtung auf den Tumor, die Toxizität dieser Moleküle verringert wird.¹⁰⁷ Ebenfalls spannend sind RNA-Inhibitoren als Antikörper-Wirkstoff-Konjugate; diese können sowohl teilende als auch ruhende Tumorzellen abtöten und werden erwartet, das Problem der Tumoresistenz und der Rezidive durch inaktive Tumorzellen zu lösen.¹⁰⁸ Es gibt derzeit zwei Haupttypen von RNA-Inhibitoren als Payloads: RNA-Spleißinhibitoren (wie Thailanstatin und seine Analoga) und RNA-Polymerase-II-Inhibitoren (wie Amatoxine).¹⁰⁷ Dadurch bieten sich neue, individuellere Möglichkeiten, wie z.B. die Kombination verschiedener Arten von Wirkstoffen über einen Antikörper zu kombinieren und beim Patienten tumorspezifisch zu therapieren.¹⁰⁷ Bezieht man diese Erkenntnisse auf diese Arbeit, so gilt es zu berücksichtigen, dass Nanobodies gegenüber herkömmlichen Antikörpern bereits genannte Vorteile in Hinblick auf die Toxizität und Wirksamkeit mit sich bringen. Die Herstellung von NDC und deren Kombination mit den oben genannten Payloads bleibt ein spannendes Feld der Forschung. Folglich könnte nicht nur das CXCR4-spezifische Nanobody-Wirkstoff-Konjugat, das in dieser Arbeit als therapeutische Option identifiziert wurde, in Zukunft Anwendung finden, sondern es wäre auch sinnvoll, weitere Payload-Typen in KZT zu erforschen und ihre Kombination mit CXCR4-Nanobodies in Betracht zu ziehen. Kritisch ist dabei zu betrachten, dass in klinischen Studien CXCR4-gerichtete Therapien zwar insgesamt ein gutes Toxizitäts-Profil aufwiesen, jedoch teilweise schwere hämatotoxische Nebenwirkungen auftraten.^{109,110} Gerade für andere CXCR4-exprimierende Zellen, wie Zellen des Immunsystems (z.B. T- und B-Lymphozyten) oder CD34-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen könnte die Verwendung eines CXCR4-MMAE gekoppelten Nanobody hochtoxisch sein. Dazu kommt, dass auch Nanobodies, obwohl ebenfalls sehr günstig im Nebenwirkungsprofil, eine relevante Nierentoxizität aufweisen, bei der die unerwünschte Nierenretention zum Teil auf die Wechselwirkung zwischen geladenen Aminosäuren der Nanobodies und dem geladenen Lumen der Nieren-Glomeruli zurückzuführen war.^{38,111}

Die in den vorherigen Versuchen beobachtete Aktivierung CXCL12-abhängiger Signalwege als möglicher Mechanismus der Ausbildung von Resistenzen gegenüber etablierter Therapiemöglichkeiten in KZT verdeutlicht die Bedeutung dieser spezifischen Targets in der Tumorthherapie, welche einen möglichen Ansatz in der Therapie resistenter KZT bietet. Diese Arbeit konnte nachweisen, dass ein CXCR4-spezifisches Nanobody-Wirkstoff-Konjugat eine mögliche therapeutische Option für KZT darstellt. Es ist jedoch notwendig, die mögliche Toxizität in weiteren Studien zu untersuchen, obwohl günstige Wirkungsprofile zu erwarten sind, insbesondere vor dem Hintergrund, dass die aktuelle Cisplatin-basierte Systemtherapie bereits schwerwiegende Nebenwirkungen aufweist. Gerade für oftmals junge Patienten bietet eine zielgerichtete Targettherapie einen nicht zu unterschätzenden Vorteil, da womöglich irreversible Langzeitfolgen einer systemischen Therapie in Zukunft umgangen werden könnten.

4.5 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigt die Arbeit, dass die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse in verschiedenen KZT-Typen vielfältige Auswirkungen auf die Expression von Genen und Proteinen hat, die mit Tumorprogression, Resistenz gegenüber Therapien und anderen relevanten Prozessen in Verbindung stehen. Dies könnte potenzielle Ansatzpunkte für zukünftige Therapien in der Behandlung von KZT darstellen; insbesondere CFOS, IL6 und BCL2 bieten dabei in KZT Ansatzpunkte für weitere Forschung, da z.B. die erhöhten CFOS-Genexpressionsspiegel nach CXCL12-Stimulation zeigten, dass die CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse an einer verstärkten Förderung der Zellproliferation, der Zellmigration und der Neoangiogenese in KZT beteiligt sein könnte.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit auf Phospho-Proteom-Level mehrere Signalwege die unter dem Einfluss der CXCR4 / CXCR7 / CXCL12-Achse stehen identifiziert werden. Auffällig ist dabei vor allem, dass die oftmals Cisplatin-resistenten YST (GCT72^{CXCR4+ / CXCR7+}) sich gegensätzlich zu den anderen getesteten Tumorentitäten verhielten. Insbesondere die Umgehung von pro-apoptotischen Signalwegen (z.B. p53) oder Aktivierung Apoptose-hemmender Effekte (z.B. GSK-3) nach CXCL12-Stimulation könnten somit zur hohen Resistenz von dieser Tumorentität gegenüber Cisplatin beitragen.

Diese Arbeit konnte außerdem nachweisen, dass ein CXCR4-spezifisches Nanobody-Wirkstoff-Konjugat eine mögliche therapeutische Option für KZT darstellt. Die Verwendung von einem solchen Konjugat in Kombination mit CXCR7-NDC könnte in Zukunft von großem Interesse sein, da insbesondere YST für die Mehrheit KZT-bedingter Todesfälle verantwortlich sind.

Literaturverzeichnis

1. Cheng L, Albers P, Berney DM, et al. Testicular cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):29. doi:10.1038/s41572-018-0029-0
2. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-1953. doi:<https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
3. Shin J, Jeon GW. Comparison of diagnostic and treatment guidelines for undescended testis. *Korean J Pediatr*. 2020;63(11):415-421. doi:10.3345/cep.2019.01438
4. Ruf C. Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Keimzelltumoren des Hodens. *Uro-News*. 2019;23(12):38-44. doi:10.1007/s00092-019-3019-y
5. Spiller CM, Bowles J. Germ cell neoplasia in situ: The precursor cell for invasive germ cell tumors of the testis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2017;86:22-25. doi:10.1016/j.biocel.2017.03.004
6. Pedrazzoli P, Rosti G, Soresini E, Ciani S, Secondino S. Serum tumour markers in germ cell tumours: From diagnosis to cure. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;159:103224. doi:10.1016/J.CRITREVONC.2021.103224
7. Laguna MP, Albers P, Algaba F, et al. EAU Guidelines on Testicular Cancer 2020. *European Association of Urology Guidelines 2020 Edition*. 2020;presented. <http://uroweb.org/guideline/testicular-cancer/> LK - Testicular Cancer Uroweb%7C<http://uroweb.org/guideline/testicular-cancer/%7C> FG - 0
8. Mead GM. International germ cell consensus classification: A prognostic factor- based staging system for metastatic germ cell cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 1997;15(2):594-603. doi:10.1200/JCO.1997.15.2.594
9. Kollmannsberger C, Oechsle K, Honecker F, Mayer F, Bokemeyer C. Behandlung von Patienten mit metastasierten Keimzelltumoren. *Onkologe*. 2008;14(6):593-601. doi:10.1007/s00761-008-1366-5
10. Beyer J, Bokemeyer C. Chemotherapie von Keimzelltumoren. *Urologe - Ausgabe A*. 2004;43(12):1507-1513. doi:10.1007/s00120-004-0704-5
11. Bokemeyer C, Skowron MA, Peters MC, Nettersheim D, Oing C. Cisplatin-refractory germ cell tumours—molecular background and clinical concepts. *Onkologe*. 2021;27(1):46-53. doi:10.1007/s00761-020-00881-9
12. Maroto P, Anguera G, Martin C. Long-term toxicity of the treatment for germ cell-cancer. A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;121:62-67. doi:10.1016/J.CRITREVONC.2017.11.015
13. Stelwagen J, Lubberts S, Steggink LC, et al. Vascular aging in long-term survivors of testicular cancer more than 20 years after treatment with cisplatin-based chemotherapy. *Br J Cancer*. 2020;123(11):1599-1607. doi:10.1038/s41416-020-01049-3
14. Travis LB, Fosså SD, Schonfeld SJ, et al. Second cancers among 40 576 testicular cancer patients: Focus on long-term survivors. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(18):1354-1365. doi:10.1093/jnci/dji278
15. Bandak M, Lauritsen J, Johansen C, et al. Sexual Function in a Nationwide Cohort of 2,260 Survivors of Testicular Cancer after 17 Years

- of Followup. *J Urol*. 2018;200(4):794-800.
doi:10.1016/J.JURO.2018.04.077
16. Lobo J, Jerónimo C, Henrique R. Cisplatin resistance in testicular germ cell tumors: Current challenges from various perspectives. *Cancers (Basel)*. MDPI AG. 2020;12(6):1-26. doi:10.3390/cancers12061601
 17. Díez-Torre A, Silván U, Díaz-Núñez M, Arechaga J. The role of microenvironment in testicular germ cell tumors. Published online 2010. doi:10.4161/cbt.10.6.13227
 18. Gilbert DC, Chandler I, McIntyre A, et al. Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents. *J Pathol*. 2009;217(1):94-102. doi:https://doi.org/10.1002/path.2436
 19. Scala S. Molecular pathways: Targeting the CXCR4-CXCL12 Axis-Untapped potential in the tumor microenvironment. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(19):4278-4285. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0914
 20. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010;16(11):2927-2931. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2329
 21. Richardson BE, Lehmann R. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(1):37-49. doi:10.1038/nrm2815
 22. McIver SC, Loveland KL, Roman SD, Nixon B, Kitazawa R, McLaughlin EA. The chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 are implicated in human seminoma metastasis. *Andrology*. 2013;1(3):517-529. doi:https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00081.x
 23. Müller MR, Skowron MA, Albers P, Nettersheim D. Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors. *Asian J Urol. Editorial Office of Asian Journal of Urology*. 2021;8(2):144-154. doi:10.1016/j.ajur.2020.05.009
 24. Oosterhuis JW, Looijenga LHJ. Human germ cell tumours from a developmental perspective. *Nat Rev Cancer*. 2019;19(9):522-537. doi:10.1038/s41568-019-0178-9
 25. Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, Shigeta M, Yamanaka K, Saitou M. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev*. 2008;22(12):1617-1635. doi:10.1101/gad.1649908
 26. Kristensen DG, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Almstrup K. Epigenetic features of testicular germ cell tumours in relation to epigenetic characteristics of foetal germ cells. *International Journal of Developmental Biology*. 2013;57(2-4):309-317. doi:10.1387/ijdb.130142ka
 27. Baroni T, Arato I, Mancuso F, Calafiore R, Luca G. On the origin of testicular germ cell tumors: From gonocytes to testicular cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. Frontiers Media S.A. 2019;10(JUN). doi:10.3389/fendo.2019.00343
 28. Molyneaux KA, Zinszner H, Kunwar PS, et al. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development*. 2003;130(18):4279-4286. doi:10.1242/dev.00640
 29. Oliveros-Etter M, Li Z, Nee K, et al. PGC Reversion to Pluripotency Involves Erasure of DNA Methylation from Imprinting Control Centers

- followed by Locus-Specific Re-methylation. *Stem Cell Reports*. 2015;5(3):337-349. doi:10.1016/j.stemcr.2015.07.006
30. Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. 2011;146(4):519-532. doi:10.1016/j.cell.2011.06.052
 31. Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W. CXCL12/CXCR4: A symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. *Oncogene*. 2016;35(7):816-826. doi:10.1038/onc.2015.139
 32. Shi Y, Riese DJ, Shen J. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Front Pharmacol*. 2020;11(December). doi:10.3389/fphar.2020.574667
 33. Skowron MA, Becker TK, Kurz L, et al. The signal transducer CD24 suppresses the germ cell program and promotes an ectodermal rather than mesodermal cell fate in embryonal carcinomas. *Mol Oncol*. 2022;16(4):982-1008. doi:10.1002/1878-0261.13066
 34. Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, et al. *Expression of Stromal Cell-Derived Factor 1 and CXCR4 Ligand Receptor System in Pancreatic Cancer: A Possible Role for Tumor Progression*. 2000. <http://aacrjournals.org/clincancerres/article-pdf/6/9/3530/2076789/df090003530.pdf>
 35. Mori T, Doi R, Koizumi M, et al. CXCR4 antagonist inhibits stromal cell-derived factor 1-induced migration and invasion of human pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(1):29-37. doi:10.1158/1535-7163.29.3.1
 36. Hübel K, Ostermann H, Glaß B, et al. Plerixafor in non-Hodgkin's lymphoma patients: a German analysis of time, effort and costs. *Bone Marrow Transplant*. 2019;54(1):123-129. doi:10.1038/s41409-018-0228-z
 37. Santagata S, Ieranò C, Trotta AM, et al. CXCR4 and CXCR7 Signaling Pathways: A Focus on the Cross-Talk Between Cancer Cells and Tumor Microenvironment. *Front Oncol*. 2021;11(April):1-11. doi:10.3389/fonc.2021.591386
 38. Kang W, Ding C, Zheng D, et al. Nanobody Conjugates for Targeted Cancer Therapy and Imaging. *Technol Cancer Res Treat*. 2021;20. doi:10.1177/15330338211010117
 39. Gholamreza Hassanzadeh-Ghassabeh , Nick Devoogdt, Pieter De Pauw, Cécile Vincke SM. Nanobodies and their potential applications P erspective. *Nanomedicine (Lond)* . 2013;8(6):1013-1026.
 40. Bao G, Tang M, Zhao J, Zhu X. Nanobody: a promising toolkit for molecular imaging and disease therapy. *EJNMMI Res. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. 2021;11(1). doi:10.1186/s13550-021-00750-5
 41. Johansson MP, Maaheimo H, Ekholm FS. New insight on the structural features of the cytotoxic auristatins MMAE and MMAF revealed by combined NMR spectroscopy and quantum chemical modelling. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-10. doi:10.1038/s41598-017-15674-1
 42. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/METH.2001.1262

43. Yates TJ, Knapp J, Gosalbez M, et al. C-X-C chemokine receptor 7: a functionally associated molecular marker for bladder cancer. *Cancer*. 2013;119(1):61-71. doi:10.1002/CNCR.27661
44. Liu TJ, Guo JL, Xu X. CXCR7 chemokine-7 inhibits growth and migration of oral tongue squamous cell carcinoma cells, mediated by the epithelial-mesenchymal transition signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):6896-6903. doi:10.3892/MMR.2017.7441/HTML
45. Skowron MA, Kotthoff M, Bremmer F, et al. Targeting CLDN6 in germ cell tumors by an antibody-drug-conjugate and studying therapy resistance of yolk-sac tumors to identify and screen specific therapeutic options. *Molecular Medicine*. 2023;29(1). doi:10.1186/s10020-023-00636-3
46. Tsiambas E, Mastronikolis N, Fotiades PP, et al. SPECIAL MOLECULAR REVIEW c-Jun/c-Fos complex in laryngeal squamous cell carcinoma. *JBUON*. 2020;25(2):618-620.
47. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2002;39(6):527-579. doi:10.1080/10408360290795574
48. Bourguignon LYW, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 Interaction with c-Src Kinase Promotes Cortactin-mediated Cytoskeleton Function and Hyaluronic Acid-dependent Ovarian Tumor Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(10):7327-7336. doi:10.1074/jbc.M006498200
49. Midgley AC, Rogers M, Hallett MB, et al. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(21):14824-14838. doi:10.1074/jbc.M113.451336
50. Zhou J, Yang Y, Zhang H, et al. Overexpressed COL3A1 has prognostic value in human esophageal squamous cell carcinoma and promotes the aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma by activating the NF- κ B pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022;613:193-200. doi:10.1016/j.bbrc.2022.05.029
51. Wang L, Sun Y, Guo Z, Liu H. COL3A1 Overexpression Associates with Poor Prognosis and Cisplatin Resistance in Lung Cancer. *Balkan Medical Journal*. 2022;39(6):393-400. doi:10.4274/balkanmedj.galenos.2022.2022-6-16
52. Midgley AC, Rogers M, Hallett MB, et al. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *Journal of Biological Chemistry*. 2013;288(21):14824-14838. doi:10.1074/jbc.M113.451336
53. Lin L, Han MM, Xu LL, Yu HX, Yang PY. CXCR7 stimulates MAPK signaling to regulate hepatocellular carcinoma progression. *Cell Death Dis*. 2014;5(10). doi:10.1038/cddis.2014.392
54. Klein B, Schuppe HC, Bergmann M, Hedger MP, Loveland BE, Loveland KL. An in vitro model demonstrates the potential of neoplastic human germ cells to influence the tumour microenvironment. *Andrology*. 2017;5(4):763-770. doi:10.1111/andr.12365

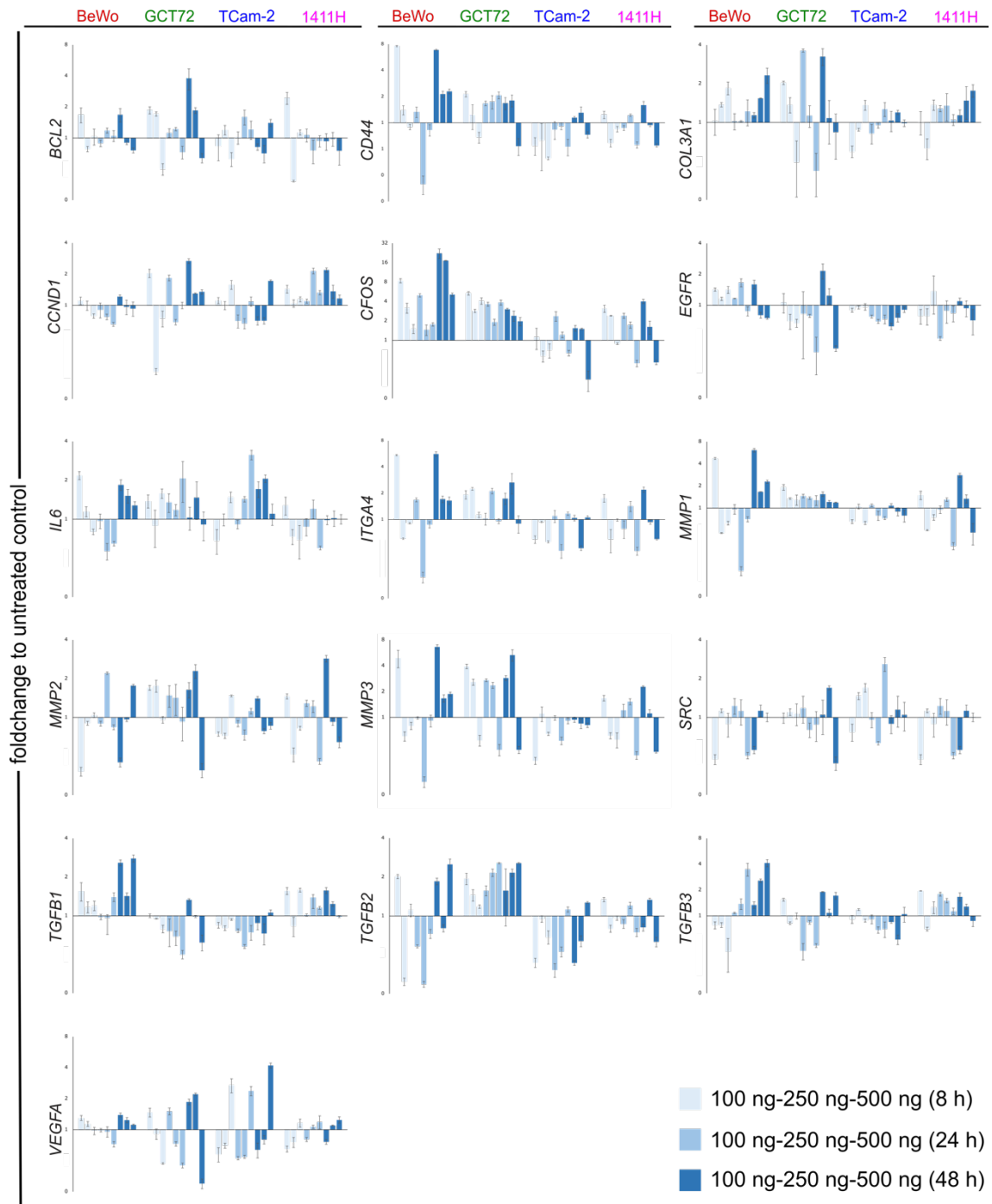
55. Chen YH, Lin TT, Wu YP, et al. Identification of key genes and pathways in seminoma by bioinformatics analysis. *Onco Targets Ther.* 2019;12:3683-3693. doi:10.2147/OTT.S199115
56. Müller MR, Burmeister A, Skowron MA, et al. Therapeutical interference with the epigenetic landscape of germ cell tumors: a comparative drug study and new mechanistical insights. *Clin Epigenetics.* 2022;14(1). doi:10.1186/s13148-021-01223-1
57. Zabel BA, Miao Z, Lai NL, et al. CXCR7 protein expression correlates with elevated MMP-3 secretion in breast cancer cells. *Oncol Lett.* 2010;1(5):845-847. doi:10.3892/ol_00000149
58. Bourguignon LYW, Zhu H, Shao L, Chen YW. CD44 Interaction with c-Src Kinase Promotes Cortactin-mediated Cytoskeleton Function and Hyaluronic Acid-dependent Ovarian Tumor Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry.* 2001;276(10):7327-7336. doi:10.1074/jbc.M006498200
59. Tulotta C, Stefanescu C, Chen Q, Torraca V, Meijer AH, Snaar-Jagalska BE. CXCR4 signaling regulates metastatic onset by controlling neutrophil motility and response to malignant cells. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-38643-2
60. Guan S, Zhou J. CXCR7 attenuates the TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis. *Mol Biosyst.* 2017;13(10):2116-2124. doi:10.1039/C7MB00247E
61. Yu PF, Huang Y, Xu CL, et al. Downregulation of CXCL12 in mesenchymal stromal cells by TGF β promotes breast cancer metastasis. *Oncogene.* 2017;36(6):840-849. doi:10.1038/onc.2016.252
62. Wang C, Chen W, Shen J. CXCR7 targeting and its major disease relevance. *Front Pharmacol.* 2018;9(JUN):368709. doi:10.3389/FPHAR.2018.00641/PDF
63. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-404. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095
64. Wakileh GA, Bierholz P, Kothhoff M, et al. Molecular characterization of the CXCR4 / CXCR7 axis in germ cell tumors and its targetability using nanobody-drug-conjugates. *Experimental Hematology and Oncology.* 2023;12(1). doi:10.1186/s40164-023-00460-9
65. Huynh C, Dingemanse J, Meyer zu Schwabedissen HE, Sidharta PN. Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis and its effect in pathophysiological conditions. *Pharmacol Res.* 2020;161:105092. doi:10.1016/J.PHRS.2020.105092
66. Kovács KJ. Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(6):665-672. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x
67. Tsiambas E, Mastronikolis N, Fotiades PP, et al. SPECIAL MOLECULAR REVIEW c-Jun/c-Fos complex in laryngeal squamous cell carcinoma. *JBUON.* 2020;25(2):618-620.
68. Chen YH, Lin TT, Wu YP, et al. Identification of key genes and pathways in seminoma by bioinformatics analysis. *Onco Targets Ther.* 2019;12:3683-3693. doi:10.2147/OTT.S199115

69. Lei T, Moos S, Klug J, et al. Galectin-1 enhances TNF α -induced inflammatory responses in Sertoli cells through activation of MAPK signalling OPEN. doi:10.1038/s41598-018-22135-w
70. Klein B, Haggene T, Fietz D, et al. Specific immune cell and cytokine characteristics of human testicular germ cell neoplasia. *Human Reproduction*. 2016;31(10):2192-2202. doi:10.1093/humrep/dew211
71. Klein B, Schuppe HC, Bergmann M, Hedger MP, Loveland BE, Loveland KL. An in vitro model demonstrates the potential of neoplastic human germ cells to influence the tumour microenvironment. *Andrology*. 2017;5(4):763-770. doi:10.1111/andr.12365
72. Kausch I, Jiang H, Thode B, Doehn C, Krüger S, Jocham D. Inhibition of bcl-2 enhances the efficacy of chemotherapy in renal cell carcinoma. *European Urology*. 2005;47(5):703-709. doi:10.1016/j.eururo.2004.11.013
73. Manion MK, Hockenbery DM. Targeting BCL-2-related proteins in cancer therapy. *Cancer Biol Ther*. 2003;2(4 Suppl 1). doi:10.4161/CBT.209
74. Skowron MA, Oing C, Bremmer F, et al. The developmental origin of cancers defines basic principles of cisplatin resistance. *Cancer Letters Elsevier Ireland Ltd*. 2021;519:199-210. doi:10.1016/j.canlet.2021.07.037
75. Chen C, Puvvada S. Prognostic Factors for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep. Current Science Inc*. 2016;11(1):37-42. doi:10.1007/s11899-015-0294-x
76. Yu PF, Huang Y, Xu CL, et al. Downregulation of CXCL12 in mesenchymal stromal cells by TGF β promotes breast cancer metastasis. *Oncogene*. 2017;36(6):840-849. doi:10.1038/onc.2016.252
77. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. *Genes and Diseases. Chongqing Medical University*. 2015;2(1):26-34. doi:10.1016/j.gendis.2014.12.002
78. Zabel BA, Miao Z, Lai NL, et al. CXCR7 protein expression correlates with elevated MMP-3 secretion in breast cancer cells. *Oncol Lett*. 2010;1(5):845-847. doi:10.3892/ol_00000149
79. Yates TJ, Knapp J, Gosalbez M, et al. C-X-C chemokine receptor 7: A functionally associated molecular marker for bladder cancer. *Cancer*. 2013;119(1):61-71. doi:10.1002/cncr.27661
80. Qie S, Diehl & JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *Journal of Molecular Medicine*. doi:10.1007/s00109-016-1475-3
81. Sierro F, Biben C, Martínez-Muñoz L, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. Published online 2007. Accessed February 7, 2024. www.pnas.org/cgi/content/full/
82. Gilbert DC, Chandler I, McIntyre A, et al. Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents. *J Pathol*. 2009;217(1):94-102. doi:10.1002/PATH.2436
83. Castrogiovanni C, Waterschoot B, De Backer O, Dumont P. Serine 392 phosphorylation modulates p53 mitochondrial translocation and transcription-independent apoptosis. *Cell Death Differ*. 2018;25:190-203. doi:10.1038/cdd.2017.143

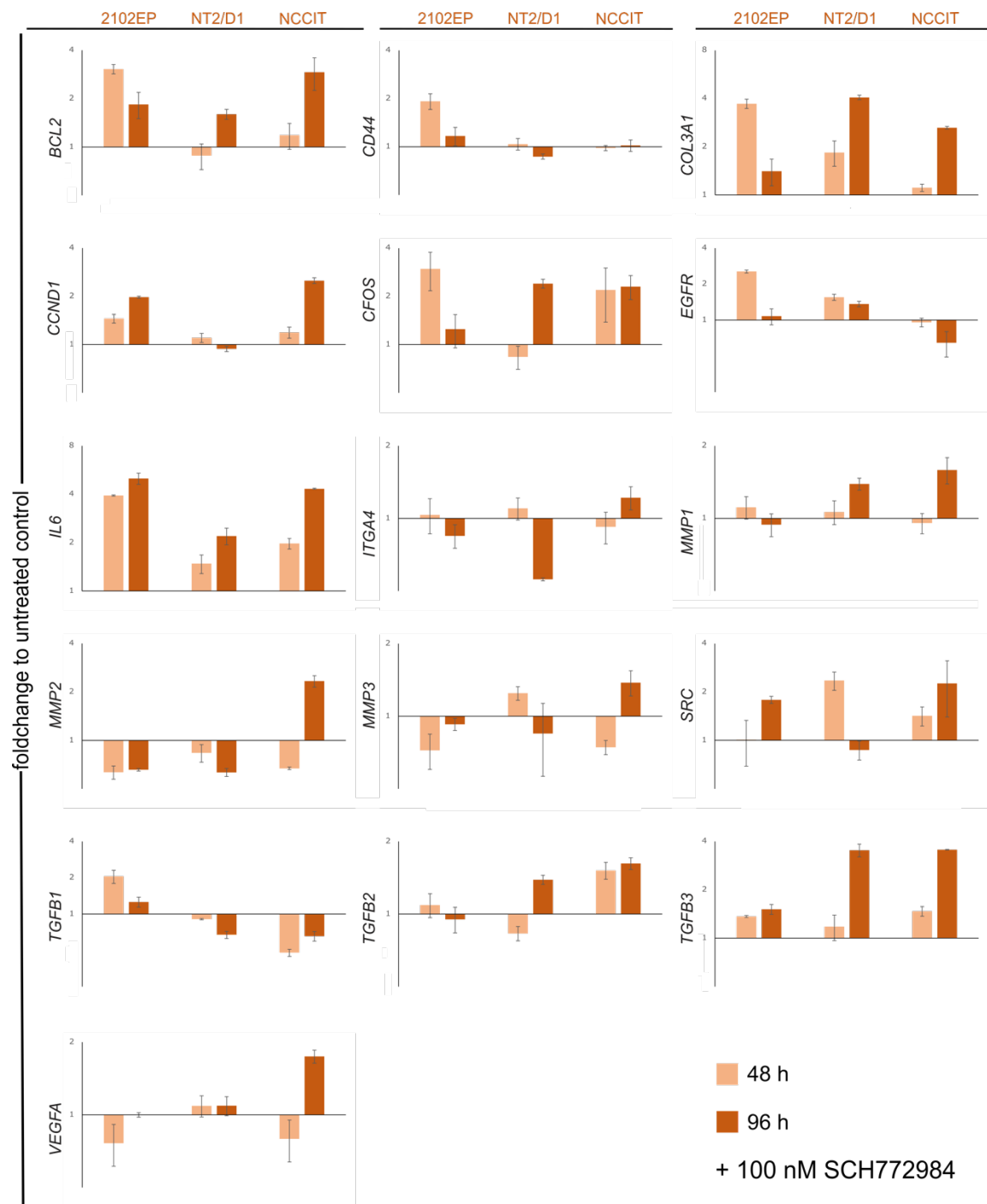
84. Liu Y, Tavana O, Gu W. p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian. *J Mol Cell Biol.* 2019;(7):564-577. doi:10.1093/jmcb/mjz060
85. Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews Cancer* 2006 6:12. 2006;6(12):909-923. doi:10.1038/nrc2012
86. Dai C, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med.* 2010;16(11):528-536. doi:10.1016/j.molmed.2010.09.002
87. Romano FJ, Rossetti S, Conteduca V, et al. Role of DNA repair machinery and p53 in the testicular germ cell cancer: a review. *Oncotarget.* 2016;7(51):85641-85649. doi:10.18632/ONCOTARGET.13063
88. Müller MR, Skowron MA, Albers P, Nettersheim D. Molecular and epigenetic pathogenesis of germ cell tumors. *Asian J Urol.* 2021;8:144-154. doi:10.1016/j.ajur.2020.05.009
89. Skowron MA, Kotthoff M, Bremmer F, et al. Targeting CLDN6 in germ cell tumors by an antibody-drug-conjugate and studying therapy resistance of yolk-sac tumors to identify and screen specific therapeutic options. *Molecular Medicine.* 2023;29(1). doi:10.1186/s10020-023-00636-3
90. Kollmann K, Heller G, Sexl V. c-JUN prevents methylation of p16 INK4a (and Cdk6): the villain turned bodyguard. *Oncotarget.* 2011;2(5):422-427. Accessed January 24, 2024. www.impactjournals.com/oncotarget/www.impactjournals.com/oncotarget/422
91. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 2003 3:11. 2003;3(11):859-868. doi:10.1038/nrc1209
92. Beurel E, Jope RS. The Paradoxical Pro- and Anti-apoptotic Actions of GSK3 in the Intrinsic and Extrinsic Apoptosis Signaling Pathways. *Prog Neurobiol.* 2006;79(4):173. doi:10.1016/J.PNEUROBIO.2006.07.006
93. Mccubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, et al. *GSK-3 as Potential Target for Therapeutic Intervention in Cancer.* Vol 5. www.impactjournals.com/oncotarget/
94. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget.* 2017;8(20):33972. doi:10.18632/ONCOTARGET.15687
95. Bagrodia A, Lee BH, Lee W, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY Genetic Determinants of Cisplatin Resistance in Patients With Advanced Germ Cell Tumors. *J Clin Oncol.* 2016;34:4000-4007. doi:10.1200/JCO.2016.68.7798
96. Schmidtova S, Kalavska K, Liskova V, et al. Targeting of Deregulated Wnt/ β -Catenin Signaling by PRI-724 and LGK974 Inhibitors in Germ Cell Tumor Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences Article LGK974 Inhibitors in Germ Cell Tumor Cell Lines Int J Mol Sci.* 2021;22:4263. doi:10.3390/ijms22084263
97. Verheyen EM, Gottardi CJ. Regulation of Wnt/ β -Catenin Signaling by Protein Kinases. *Dev Dyn.* 2010;239(1):34. doi:10.1002/DVDY.22019

98. Jung JU, Jaykumar AB, Cobb MH. WNK1 in Malignant Behaviors: A Potential Target for Cancer? *Front Cell Dev Biol.* 2022;10. doi:10.3389/FCELL.2022.935318
99. Xiu M, Li L, Li Y, Gao Y. An update regarding the role of WNK kinases in cancer. *Cell Death & Disease* 2022 13:9. 2022;13(9):1-15. doi:10.1038/s41419-022-05249-y
100. Sakamoto KM, Frank DA. CREB in the Pathophysiology of Cancer: Implications for Targeting Transcription Factors for Cancer Therapy. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1137
101. Steven A, Friedrich M, Jank P, et al. What turns CREB on? And off? And why does it matter? *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2020;77:4049-4067. doi:10.1007/s00018-020-03525-8
102. Sulzmaier FJ, Ramos JW. RSK isoforms in cancer cell invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2013;73(20):6099. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1087
103. Li YJ, Zhang C, Martincuks A, Herrmann A, Yu H. STAT proteins in cancer: orchestration of metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2023 23:3. 2023;23(3):115-134. doi:10.1038/s41568-022-00537-3
104. Li L, Cao J, Chen C, et al. Antitumor effect of a novel humanized MUC1 antibody-drug conjugate on triple-negative breast cancer. *Heliyon.* 2023;9:15164. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e15164
105. Macapagal SC, Lee H, Abdul Jabbar J, et al. Efficacy of Brentuximab Vedotin and Nivolumab in Refractory or Relapsed Hodgkin Lymphoma: A Systematic Review. *Cureus.* 2022;14(3). doi:10.7759/cureus.23452
106. Izutsu K, Ogura M, Tobinai K, et al. Safety profile of brentuximab vedotin in Japanese patients with relapsed/refractory Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma: a post-marketing surveillance study. *Int J Hematol.* 2021;113(3):404-412. doi:10.1007/S12185-020-03039-W
107. Wang Z, Li H, Gou L, Li W, Wang Y. Antibody drug conjugates: Recent advances in payloads. doi:10.1016/j.apsb.2023.06.015
108. Yin W, Rogge M. Targeting RNA: A Transformative Therapeutic Strategy. *Clin Transl Sci.* 2019;12(2):98-112. doi:10.1111/CTS.12624
109. Maurer S, Herhaus P, Lippenmeyer R, et al. Side Effects of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with Pentixather Before Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Journal of Nuclear Medicine.* 2019;60(10):1399. doi:10.2967/JNUMED.118.223420
110. Lapa C, Hänscheid H, Kircher M, et al. Feasibility of CXCR4-Directed Radioligand Therapy in Advanced Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Journal of Nuclear Medicine.* 2019;60(1):60-64. doi:10.2967/JNUMED.118.210997
111. Jovčevska I, Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *Biodrugs.* 2020;34(1):11. doi:10.1007/S40259-019-00392-Z

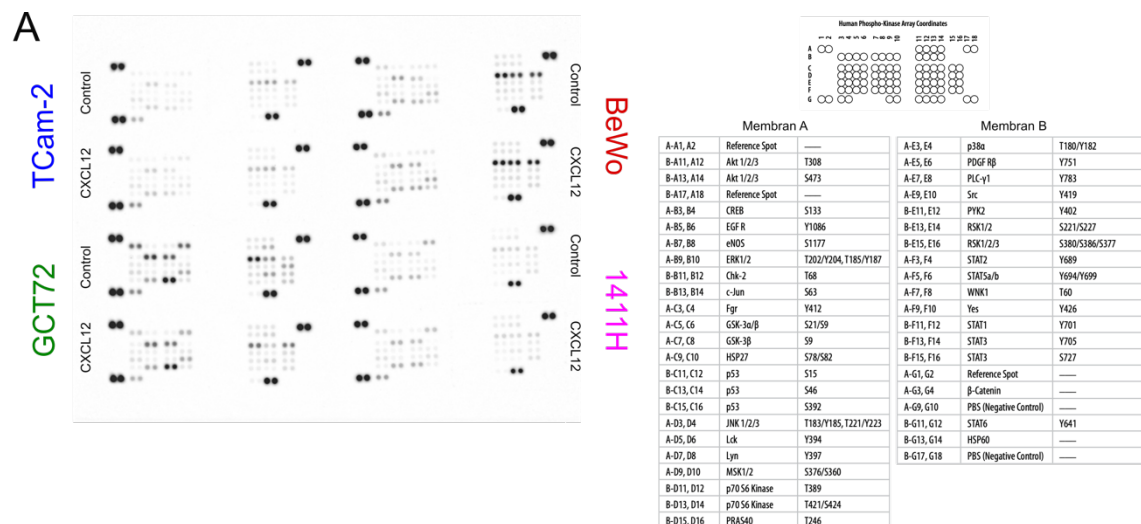
Anhang



Anhang 1: qRT-PCR-Daten der mRNA-Expression einzelner Gene in testikulären Keimzelltumoren nach Applikation von 100, 250 und 500 ng CXCL12 nach 8h, 24h und 48h.



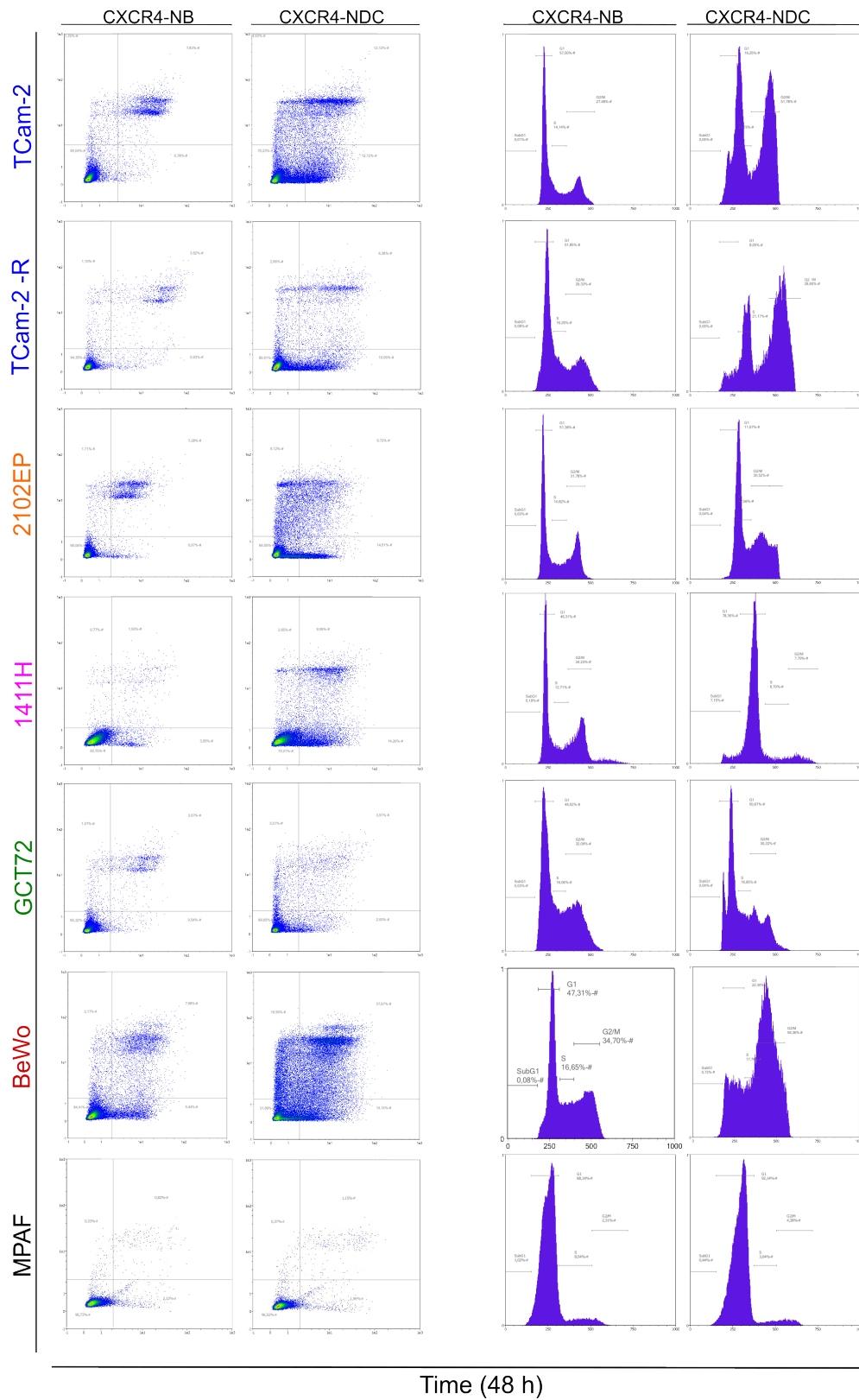
Anhang 2: qRT-PCR-Daten der mRNA-Expression einzelner Gene in embryonalen Keimzelltumoren nach Applikation von 100nM SCH772984 nach 48h und 96h.



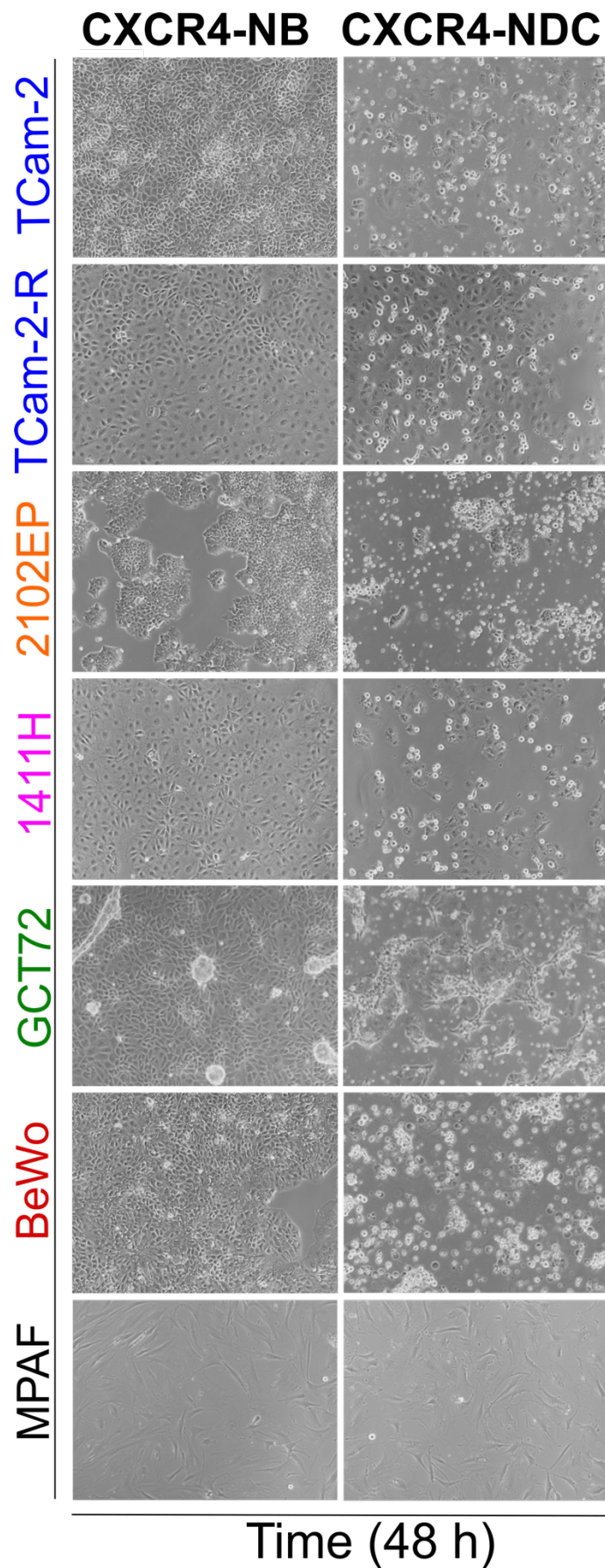
Anhang 3: A) Rohdaten eines humanen Phosphokinase-Arrays verschiedener Zelllinien (GCT72, 1411H, TCam-2, BeWo), nach 24-stündiger Behandlung mit rekombinantem CXCL12-Protein (250 ng/ml). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollreihe.

Apoptosis

Cell Cycle



Anhang 4: Durchflusszytometrische Daten der verwendeten KZT. Linksseitig die Rohdaten der Apoptoseraten nach Verwendung von CXCR4-Nanobodies im Vergleich mit MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies, rechtsseitig die Analyse des Zellzyklus nach Verwendung von CXCR4-Nanobodies im Vergleich mit MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies nach je 48 h.



Anhang 5: Histologische Aufnahmen der verwendeten Zelllinien nach Verwendung von CXCR4-Nanobodies im Vergleich mit MMAE-gekoppelten CXCR4-Nanobodies nach je 48 h.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zum Entstehen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Daniel Nettersheim, welcher mir überhaupt erst die Möglichkeit zur Erstellung einer experimentellen Dissertation gegeben hat. Vor allem die wöchentlichen Meetings, mit auf der einen Seite fordernden Aufgaben und auf der anderen Seite hilfreichen Ratschlägen haben mir geholfen, stetig einen Schritt weiterzukommen. Neben fachlicher Expertise und ausgezeichnete Betreuung, war vor allem die angenehme Atmosphäre und das freundschaftliche Arbeitsumfeld unglaublich motivierend.

Des Weiteren möchte ich Priv.-Doz. Margaretha Skowron danken, ohne deren Einsatz der Einstieg in die Dissertation erst gar nicht gelungen wäre. Ihre Tipps und Ratschläge, ihre inhaltliche Unterstützung, ihre kontinuierlichen Rückmeldungen und vor allem ihre Geduld waren für mich von unschätzbarem Wert.

Mein Dank gilt ebenfalls dem gesamten Team der Arbeitsgruppe, ohne welche ein Arbeiten im Labor nicht möglich gewesen wäre. Sei es die praktische Einarbeitung in Laborarbeiten, Anregungen während des Schreibprozesses oder ein offenes Ohr bei Fragen jeglicher Art; die Zusammenarbeit war innerhalb und außerhalb des Labors fachlich und menschlich mehr als bereichernd.

Zu guter Letzt gilt der Dank meiner Freundin und meiner Familie. Ohne euch wäre all dies nicht möglich gewesen; eure Unterstützung bildet nicht nur im Rahmen dieser Arbeit, sondern in allen Lebenslagen die Basis für Alles, was mir wichtig ist.

