

Technische Universität München
Frauenklinik der Technischen Universität München
Klinische Forschergruppe

**Untersuchungen zur Funktion, Regulation und klinischen Bedeutung von
CXCL9 und CXCL10 im Mammakarzinom des Menschen**

Sara Brigitte Herz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv. Doz. Dr. Markus Niemeyer
2. Prof. Dr. Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 05.12.2016 bei der technischen Universität
eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 12.12.2018 angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

„Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer“ Bronger H., Kraeft S., Schwarz-Boeger, U., Cerny, C. Stockel, A., Avril, S., Kiechle M., Schmitt, M.

erschienen in: Breast Cancer Res. 2012 Feb 14;14(1):R30.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Überblick und Forschungsstand zum Mamma Karzinom	7
1.2 Chemokine im Allgemeinen	8
1.2.1 CXC-Chemokine	10
1.3 Das CXCR3 Chemokinsystem	12
1.3.1 Die Chemokine CXCL9 und CXCL10	12
1.3.2 Der CXCR3 Rezeptor	13
1.4 Chemokine und ihre Rolle in soliden Tumoren	15
1.4.1 Allgemeine Rolle.....	15
1.4.2 Rolle von Chemokinen im Mammakarzinom	19
1.5 Regulation des CXCR3-Chemokinsystems und Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung	21
1.5.1 Estradiol	21
1.5.2 Prolaktin.....	22
1.5.3 Prostaglandin.....	22
1.5.4 Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α).....	22
1.6 COX1 und COX 2 und COX- Inhibitoren	23
1.6.1 COX-Inhibitoren.....	24
1.7 Vorarbeiten und Zielsetzung	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Patienten	26
2.1.2 Mammakarzinom-Zelllinien	26
2.1.3 Zellkulturmedien und -supplemente	26
2.1.4 Regulationsfaktoren	27
2.1.5 ELISA-Kits.....	27
2.1.6 Proteinbestimmung, SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot-Analyse	27
2.2 Zellbiologische Methoden	28
2.2.1 Passagieren der Zellen	28
2.2.2 Stimulation der Zellen	28
2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen	29
2.2.4 MTT Assay	30

2.3	Proteinbiochemische Methoden	30
2.3.1	ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay	30
2.3.2	Herstellung von Zellysaten (totale Zellyse).....	31
2.3.3	Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay Reagent.....	31
2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
2.3.5	Westernblot- Analyse	34
2.4	Statistische Auswertung	36
3.	Ergebnisse	37
3.1	Konzentrationsabhängige Induktion der CXCR3-Liganden durch IFN-γ und TNF-α	37
3.2	Supprimierung der CXCL9- und CXCL10-Sekretion durch PGE₂	38
3.3	Einfluss von Cyclooxygenase-Inhibitoren auf die CXCL9- und CXCL10-Sekretion aus Brustkrebszellen	39
3.3.1	Indometacin.....	40
3.3.2	Acetylsalicylsäure (ASS).....	42
3.3.3	Celecoxib	43
3.4	Einfluss der Stimulationen auf die Zellviabilität der verwendeten Brustkrebszelllinien	44
3.5	Effekte der Stimulation mit Prolaktin	45
3.6	Nachweis von Cyclooxygenasen und CXCL9 in Tumorproben von Patientinnen mit Brustkrebs	46
3.7	CXCR3-Rezeptorennachweis in Zelllinien und Tumorproben	47
3.8	Cathepsin B	48
4.	Diskussion	50
4.1	Induktion der CXCR3-Liganden durch IFN-γ und TNF-α	50
4.2	Einfluss von PGE₂ auf die CXCR3-Ligandensekretion	52
4.3	Einfluss von COX-Inhibition auf die CXCR3-Chemokinsekretion	54
4.4	CXCR3-Expression und Induktion von Cathepsin B in Mammakarzinomzellen	57
4.5	Ausblick	58
5.	Zusammenfassung	59
6.	Tabellenverzeichnis	61

7. Abbildungsverzeichnis	62
8. Literaturverzeichnis.....	63

Abkürzungen

ADCC	<i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
BCA	Bicinchinonsäure
cDNA	Komplementäre (complementary) Desoxyribonukleinsäure
CMF	Chemotherapieschema mit Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil
COX	Cyclooxygenase
CXCL	Chemokinligand mit CXC Motif
CXCR	Chemokinrezeptor
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ER	Östrogenrezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
G418	Geneticindisulfat
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin 1
IRF-1	Interferon regulatory factor 1
JAK-2	Januskinase 2
Mig 9	CXCL9
MMP-9	Matrix Metallopeptidase 9
NFκ-B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	Natürliche Killerzelle
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE1 / E2	Prostaglandin E1 / E2
PVDF	Polyvinylidendifluorid

rpm	<i>Revolutions per minute</i> ; „Umdrehungen pro Minute“
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
TAM	Tumor- assoziierte Makrophagen
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor - α
TNM	Klassifikation zur Einteilung maligner Tumoren
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
v/v	Volumen auf Gesamtvolumen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

1.1 Überblick und Forschungsstand zum Mamma Karzinom

Das Mammakarzinom ist der weltweit häufigste bösartige Tumor der Frau und verursachte laut WHO im Jahre 2008 rund eine halbe Million Todesfälle (WHO, February 2012). Mit 72000 Neuerkrankungen und 17000 Todesfällen jährlich ist es auch in Deutschland die mit Abstand häufigste Krebserkrankung bei Frauen (Robert-Koch-Institut, 2012). Für das Jahr 2012 wurde sogar eine Erhöhung auf 74000 Neuerkrankungen prognostiziert (Gesundheitsberichterstattung, 2012). Nach Einführung des Mammographiescreenings 2005 kam es bereits zu einer sprunghaften Steigerung der Inzidenzen, vor allem der Anteil kleinerer Tumoren (T1) hatte deutlich zugenommen. Nun bleibt zu diskutieren, ob der prognostizierte Anstieg für das Jahr 2012 auf vollständigere Erfassungsraten und ein flächendeckenderes Mammographiescreening zurückzuführen ist (Bauerfeind, 2009). Trotz Zuwachs der Inzidenz seit Mitte der Neunziger Jahre ist ein Rückgang der Mortalitätsrate zu verzeichnen, was zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch den verbesserten Therapiemöglichkeiten zugeschrieben wird. Ob die vermehrte Früherkennung mittels Mammographie eine weitere Reduktion bewirkt, wird erst in den kommenden Jahren adäquat evaluierbar sein (Gesundheitsberichterstattung, 2012). Die wesentlichen Therapiesäulen des Mammakarzinoms bestehen aus der chirurgischen Resektion des Tumors sowie der Strahlen- und Chemotherapie. Diese können, je nach individueller Tumorbiologie, zusätzlich durch endokrine und immunologische Ansätze ergänzt werden. Des Weiteren wird derzeit versucht, mittels Microarray-Technologien Genprofile zu erstellen, die den Nutzen einer systemischen Chemotherapie voraussagen sollen. So befinden sich ein 21-Gen-Rückfallscore (OncotypeDX[®]), ein 70-Genprofil (Mammaprint[®]) sowie ein durch klinische Angaben ergänzter 8-Gen Test (EndoPredict[®]) in klinischer Verwendung (K. Strunz, 2008, Filipits and Pirker, 2011). Um eine Prognose und ein bestmögliches individuelles Therapieansprechen zu gewährleisten, werden verschiedene Faktoren wie das Alter der Patientin und das Tumorgrading nach TNM-Klassifikation bestimmt. Weiterhin sind biologische Kriterien wie der jeweilige Hormonrezeptorstatus oder Expressionsmuster tumorassoziierter Antigene und das jeweilige Wachstumsmuster von Bedeutung (Bauerfeind, 2009). Bei einer Überexpression des Östrogenrezeptors (ER- α) stehen antiendokrine Therapiemöglichkeiten in Form von Rezeptorantagonisten (z.B. Tamoxifen oder Fulvestrant) oder Substanzen, welche die Östrogenbildung im Körper unterdrücken (z.B. Aromataseinhibitoren oder Goserelin), zur Verfügung.

Von besonderem Interesse für die immunologische Therapie ist der Expressionsstatus des HER2-Onkoproteins, einem Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinasetyp. Dieser wird in ca. 20% der invasiven Mammakarzinome überexprimiert und ist mit einem aggressiveren Verlauf der Erkrankung assoziiert. HER2 stimuliert die Zellproliferation und hemmt die Apoptose. Mit Hilfe des monoklonalen humanisierten anti-HER2-Antikörpers Trastuzumab konnte die Wirkung der Chemotherapie bei HER2- positivem Brustkrebs verstärkt und ein besseres klinisches Outcome nachgewiesen werden (Slamon et al., 2001).

In den letzten Jahren wurden weitere immunologische Therapieoptionen entwickelt, so z.B. Pertuzumab, ein ebenfalls monoklonaler humanisierter Antikörper, der die Dimerisierung des HER2-Proteins mit anderen HER-Rezeptoren erfolgreich blockiert. Der Wirkmechanismus dieser Antikörper ist zumindest teilweise auf eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC*) zurückzuführen (Barok et al., 2007). Dabei werden natürliche Killerzellen (NK-Zellen) durch Bindung an das F_c-Fragment dieser monoklonalen Antikörper durch einen entsprechenden Rezeptor auf ihrer Oberfläche in räumliche Nähe zu den Antikörper-markierten Tumorzellen gebracht und können dann ihrerseits den apoptotischen Zellergang der Tumorzellen induzieren.

Unabdingbare Voraussetzung aller immunologischer Therapiestrategien ist es jedoch, dass die Tumorzellen überhaupt ihren Weg in den Tumor finden. Migration und Chemotaxis von Immunzellen werden durch sogenannte Chemokine gesteuert.

1.2 Chemokine im Allgemeinen

In den vergangenen Jahrzehnten wurden im Zusammenhang mit der weiteren Erforschung des Immunsystems und der Pathogenese verschiedener Erkrankungen Botenstoffe entdeckt, die zahlreiche Wirkungen vor allem hinsichtlich des Wachstum und der Differenzierung von Zellen aufweisen. Diese Stoffe bezeichnet man als Zytokine. Sie werden von unterschiedlichen Zelltypen gebildet und wirken parakrin und autokrin auf andere Zellen, insbesondere auf Immunzellen. Eine bestimmte Gruppe von Zytokinen wurde zusammenfassend als chemotaktischen Zytokine, kurz Chemokine, bezeichnet, da sie in der Lage sind, Chemotaxis insbesondere von Immunzellen auslösen zu können.

Das erste Chemokin (Interleukin-8) wurde 1977 von Walz et al. identifiziert. Es folgten ab 1984 spezielle cDNA Strukturuntersuchungen, so dass eine ganze Genfamilie gefunden wurde, lange bevor ihre genauen Funktionen bekannt waren (Walz et al., 1977, Wolpe and Cerami, 1989).

Chemokine sind eine Gruppe von etwa 50 proinflammatorischen, etwa 8-15 kDa großen Peptiden, die in der Lage sind, Makrophagen, Monozyten und Leukozyten chemotaktisch anzulocken (Fulton, 2009).

Es existieren vier Subfamilien von Chemokinen, die als CXC, CC, CX₃C und C Chemokine bezeichnet werden, abhängig von der Lokalisation zweier Cysteinreste am Aminoterminus der Proteinsequenz, die entweder durch keine, eine oder drei beliebige andere Aminosäuren (X) getrennt sind. Der Hauptkörper wird durch ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt gebildet, und der Carboxy-Terminus endet mit einer α -Helix.

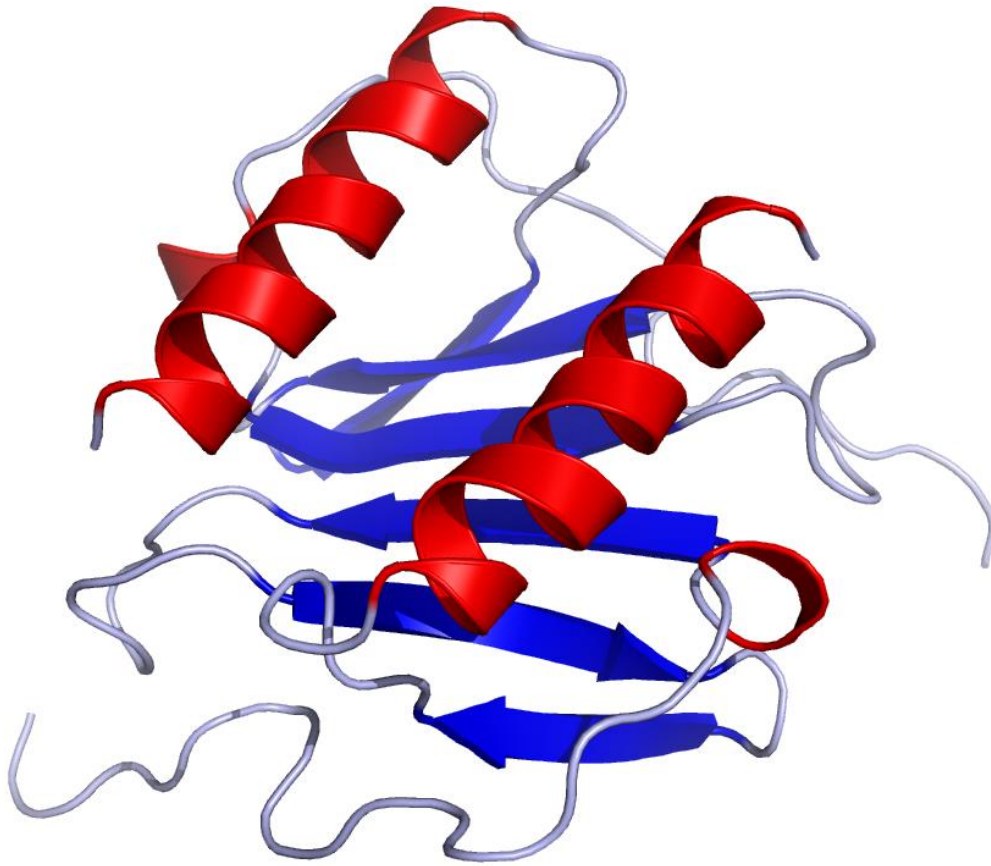


Abbildung 1-1: Tertiärstruktur eines löslichen CXC-Chemokins, hier gezeigt am Beispiel von CXCL8 (IL 8)
https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AIL8_Solution_Structure.rsh.png

Tabelle 1-1: Chemokinfamilien und deren Rezeptoren

Subtyp	Name	Alter Name	Rezeptor
CXC	CXCL1	GRO- α	CXCR2>CXCR1
	CXCL2	GRO- β	CXCR2
	CXCL3	GRO- γ	CXCR2
	CXCL4	PF4	CXCR3-B
	CXCL5	ENA-78	CXCR2
	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR3
	CXCL7	NAP-2	CXCR2
	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
	CXCL9	Mig	CXCR3-A, CXCR3-B
	CXCL10	IP-10	CXCR3-A, CXCR3-B

	CXCL11	I-TAC	CXCR3-A, CXCR3-B, CXCR7
	CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4, CXCR7
	CXCL13	BLC/BCA-1	CXCR5
	CXCL14	BRAK	Unbekannt
	CXCL16		CXCR6
XC	XCL1	Lymphotactin- α	XCR1
	XCL2	Lymphotactin- β	XCR1
CC	CCL1	I-309	CCR8
	CCL2	MCP-1	CCR2
	CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5
	CCL4	MIP-1 β	CCR5
	CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
	CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
	CCL8	MCP-2	CCR3
	CCL9/10	MIP-1 γ	Unbekannt
	CCL11	Eotaxin	CCR3
	CCL12	MCP-5	CCR2
	CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3
CX3C	CX3CL1	Fractalkine, Neurotactin	CX3CR1

1.2.1 CXC-Chemokine

CXC-Chemokine zeichnen sich durch das Vorhandensein einer Aminosäure zwischen dem ersten und zweiten Cystein am Aminotermus aus. Die CXC-Subfamilie beinhaltet 15 verschiedene Vertreter, die mit wenigen Ausnahmen auf dem menschlichen Chromosom 4 lokalisiert sind.

Abhängig vom Vorhandensein des Tripeptid Glutaminat, Leucin und Arginin (ELR) können sie in ELR⁺- und ELR⁻-Chemokine unterteilt werden (Vandercappellen et al., 2008). Das jeweilige Tripeptid hat Einfluss auf die Affinität zum jeweiligen Rezeptor. So binden ELR⁺-Chemokine bevorzugt an den CXCR2-Rezeptor und wirken angiogenetisch, ELR⁻-Chemokine hingegen binden an den CXCR3-Rezeptor und sind angiostatisch (Ben-Baruch, 2006, Strieter et al., 1995).

Des Weiteren kann man die CXC-Chemokine hinsichtlich ihrer Funktionen und ihrer Expressionsmuster in zwei Gruppen einteilen:

Die erste Gruppe sind die so genannten inflammatorischen oder induzierbaren Chemokine (z.B. CXCL1, CXCL2, CXCL3). Sie werden in vielen unterschiedlichen Geweben von einwandernden Leukozyten als Antwort auf bakteriologische Toxine und inflammatorische Zytokine wie z.B. Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) induziert. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, Leukozyten, Monozyten, neutrophile Zellen und andere Effektorzellen als Abwehrreaktion bei Infektionen und Gewebeerletzungen anzulocken

(Rotondi et al., 2007, Baggiolini, 2001, O'Hayre et al., 2008). Je nach Rezeptor sind sie in der Lage, unterschiedliche Zelltypen zu rekrutieren, so locken CXCR3-Liganden beispielsweise aktivierte T-Lymphozyten und NK-Zellen chemotaktisch an (Loetscher et al., 1996). Die durch die Chemokinbindung ausgelöste Signalkaskade führt schließlich zur Wanderung der Zellen in Richtung steigender Chemokinkonzentrationen (Yoshie et al., 2001).

Die zweite Gruppe beinhaltet die homeostatischen oder konstitutiven Chemokine (z.B. CXCL12, CXCL13 und CXCL14). Sie sind bedeutend für die gezielte Bewegung von Lymphozyten und dendritischen Zellen im Bereich der Immunüberwachung (*immunosurveillance*). So navigieren sie die Zielzellen während der Hämatopoese im Knochenmark und im Thymus, später in der Milz und in den Lymphknoten (Rotondi et al., 2007). Bestimmte Chemokine, welche im Rahmen der Hämatopoese im Thymus vorkommen, spielen in den einzelnen Schritten der T-Zell Reifung eine wichtige Rolle. Das Chemokin TECK (CCL25) beispielsweise wird dort von den Dendritischen Zellen produziert und wirkt selektiv auf unreife T-Zellen, indem es ihren gezielten Einstrom in den Thymus koordiniert (Chensue, 2001). Ihre Funktion ist daher im Gegensatz zu der Gruppe der inflammatorischen Chemokine dauerhaft vorhanden und nicht von bestimmten Ereignissen wie z.B. Entzündungsreaktionen abhängig.

Die Wirkungen der Chemokine werden über G-Protein-gekoppelte 7-Transmembrandomän-Rezeptoren vermittelt. Sie binden an die extrazelluläre aminoternale Region und gehen schließlich über die carboxyterminale Region eine Verbindung zum G-Protein ein. Bindet nun ein Chemokin an den jeweiligen Rezeptor, erfolgt eine Konformitätsänderung und eine daraus folgende Interaktion mit dem G-Protein, welches schließlich Enzyme wie die Phospholipase C oder die Phosphoinositol-3-Kinase aktiviert. Es folgt eine Kaskade von Stimulationen anderer Kinasen und Phosphorylierungen, welche bestimmte Zellfunktionen wie z.B. Adhäsion und Chemotaxis nach sich ziehen (Baggiolini, 2001, Chensue, 2001).

Es sind mittlerweile etwa 20 solcher Rezeptoren identifiziert, welche ausschließlich an Mitglieder ihrer Chemokinsubfamilie binden. Der Name setzt sich zusammen aus der Kurzbezeichnung der Chemokinfamilie (CC, CXC, CX3C oder XC), einem R für „Rezeptor“ sowie fortlaufender Nummerierung (z.B. CCR2 oder CXCR4).

Dabei besteht innerhalb einer Subfamilie eine gewisse Promiskuität, d.h. einige Rezeptoren binden an verschiedene Chemokine und umgekehrt (siehe Tabelle 1-1).

In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus hauptsächlich bei den ELR-CXC Chemokinen, deren Rezeptor CXCR3 und deren Rolle in soliden Tumoren.

1.3 Das CXCR3 Chemokinsystem

Ausgehend von den oben beschriebenen Beobachtungen, dass eine erhöhte intratumorale Expression von CXCL9 oder CXCL10 mit vermehrter lymphozytärer Infiltration und einer verbesserten Prognose einhergehen, soll die Rolle dieses Chemokinsystems im Mammakarzinom weiter untersucht werden.

Die CXCR3-Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 gehören zu den ELR-negativen CXC-Chemokinen. Sie werden sie durch eine Vielzahl von Zellen, hierunter Endothelzellen, Fibroblasten und auch Tumorzellen produziert, was u.a. Loos et al. *in vitro* zeigen konnten (Loos et al., 2006, Proost et al., 2003). Allen gemeinsam ist eine starke Induzierbarkeit durch IFN- γ , einem pleiotropen Zytokin mit einer Reihe immunologischer Funktionen, vor allem im Bereich des Tumorwachstums. IFN- γ ist der einzige Vertreter der Typ II Interferone, die eine Untergruppe der Zytokine darstellen. Zu den Typ I Interferonen zählen IFN- α und IFN- β , welche in dieser Arbeit jedoch nicht weiter betrachtet werden (Boehm et al., 1997). Das hier im Fokus stehende IFN- γ ist ein 34kDa großes Homodimer mit einem aus zwei Untereinheiten bestehendem Rezeptor (α - und β -Untereinheit). Ihm wird eine proinflammatorische sowie, insbesondere aus immunologischer Sicht, protektive Rolle zugesprochen (Schroder et al., 2004, Caspi et al., 1994). Sezerniert wird IFN- γ hauptsächlich von CD8+T-Zellen, CD4+Effektorzellen sowie NK-Zellen (Sad et al., 1995, Perussia, 1991). Ferner wird es in zahlreichen Zell- und Gewebetypen als Induktor von CXCL9 und CXCL10 beschrieben (Farber, 1990).

1.3.1 Die Chemokine CXCL9 und CXCL10

Vor allem im Zusammenhang mit potentieller T-Zell Rekrutierung in Tumorzellen ist den beiden Chemokinen CXCL9 und CXCL10 eine besondere Aufmerksamkeit zuteilgeworden (Ben-Baruch, 2006). Da eine vermehrte Rekrutierung von T-Zellen und NK-Zellen in den Tumor Tumorwachstum hemmen oder sogar stoppen kann, ist die Erhöhung ihrer intramuralen Akkumulierung ein mögliches therapeutisches Ziel (Wendel et al., 2008, Smyth et al., 2002). Bislang ist jedoch ihre Regulation in Tumorzellen nur unzureichend untersucht worden.

Bekannt ist aber, dass CXCL9 und CXCL10 durch IFN- γ induzierbar und dass sie in Tumoren nachzuweisen sind. Durch ihre Fähigkeit, Zellnekrose in Tumoren auszulösen, scheinen sie in der Lage, maligne Proliferation aufzuhalten (Vicari and Caux, 2002, Sgadari et al., 1997). Insbesondere im Brustkrebs zeigte sich, dass eine erhöhte Konzentration von CXCL9 mRNA im Tumorgewebe mit einem besseren Therapieansprechen und einer besseren Prognose

assoziiert ist (Vicari and Caux, 2002, Specht et al., 2009a). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass sowohl CXCL9 als auch CXCL10 dazu fähig sind, Tumorstadium und Metastasierung von Karzinomen zu unterdrücken (Addison et al., 2000a). In gastrointestinalen Tumoren sowie im Nierenzellkarzinom des Menschen korreliert ihre Überexpression signifikant mit einem verlängerten rezidivfreien Überleben (Kondo et al., 2004, Suyama et al., 2005). Dies scheint auf ein verbessertes Therapieansprechen und direkte destruiende Einflüsse auf das Tumorgewebe zurückzuführen zu sein.

Es finden sich jedoch auch negative Effekte der CXCR3- Liganden, insbesondere in Bezug auf ihre Beteiligung an der Metastasierung. Kajiitani et al. konnten anhand von Brustkrebszellen zeigen, dass durch NK-Zellen produziertes IFN- γ nicht nur in der Lage ist, CXCL10 in den Mammakarzinom Zellen zu induzieren, sondern auch CXCR3 exprimierende Tumorzellen zur Migration anzuregen (Kajitani et al., 2012).

Walser et al. konnten die Hypothese unterstreichen, dass CXCR3 die Metastasierung von Krebszellen erleichtert, indem sie Versuchstiere mit einem CXCR3-Antagonisten (AMG487) vorbehandelten. Ein deutlicher Rückgang der pulmonalen Metastasierung im Vergleich zu nicht mit AMG487 vorbehandelten Mäusen war zu beobachten. Das Wachstum des Primarius blieb durch die Hemmung von CXCR3 unbeeinträchtigt (Walser et al., 2006).

1.3.2 Der CXCR3-Rezeptor

Die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 binden an den G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR3. CXCL11 hat die stärkste Affinität zum Rezeptor, CXCL9 die schwächste. Zunächst ging man davon aus, dass der Rezeptor ausschließlich auf Immunzellen exprimiert wird, da er auf zirkulierenden T-Zellen, B-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erstmals nachgewiesen werden konnte. Später wurde er weiterhin auf anderen, residenten Zellen, wie hepatischen Sternzellen und mikrovaskulären Endothelzellen dargestellt (Annunziato et al., 1999, Bonacchi et al., 2001, Romagnani et al., 2001).

CXCR3 wurde 1995 mittels PCR basierender Hybridization entdeckt. Es sind bisher drei Splicevarianten dieses Rezeptors bekannt: CXCR3-A, CXCR3-B und CXCR3-alt. An der chemotaktischen Aktivierung von T- und NK-Zellen ist CXCR3-A maßgeblich beteiligt (Lasagni et al., 2003).



Abbildung 1-2: Schematische Darstellung von i CXCR 3-A und CXCR3-B mRNA (Lasagni et al., 2003)

Die Splicevariante CXCR3-B wird auf Endothelzellen exprimiert und vermittelt hauptsächlich die bereits beschriebene angiostatische Aktivität der CXCR3-Liganden (Lasagni et al., 2003, Yang and Richmond, 2004). Die Expression des Rezeptors ist abhängig vom Zell-Zyklus und nur in der S/G2-M Phase möglich (Vandercappellen et al., 2008, Romagnani et al., 2001).

Die dritte Splicevariante, CXCR3-alt, entsteht durch posttranskriptionales Exon-Skipping. Er bindet das Chemokin CXCL11; seine genaue biologische Rolle ist jedoch noch immer unklar (Ehlert et al., 2004).

In einigen Geweben wie Herz, Niere und Skelettmuskulatur werden sowohl CXCR3-A als auch CXCR3-B exprimiert. Die Plazenta hingegen exprimiert ausschließlich die Splicevariante A, mikrovaskuläre Endothelzellen nur Variante B (Ben-Baruch, 2006).

Unter bestimmten Voraussetzungen wird bei Überexpression von CXCR3 eine Beteiligung an der Entstehung von Tumormetastasen beobachtet. Am Beispiel des Kolonkarzinoms konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte CXCR3-Expression die Induktion von Metalloproteasen verstärkt, was schließlich mit einer erhöhten Invasivität einhergeht (Zipin-Roitman et al., 2007). Die chemotaktische Anlockung der Tumorzellen kann vermutlich eine Metastasierung anregen und somit die Streuung in andere Organe, wie Lymphknoten, begünstigen (Kawada et al., 2007). Mit Hilfe der Isolierung von murinen Mammakarzinomzellen aus zunehmend aggressiven Stadien konnte verdeutlicht werden, dass CXCR3 dort zu den am stärksten hochregulierten Genen gehört (Yang et al., 2004). Ma et al. zeigten 2009, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen Überexpression von CXCR3 und schlechter Prognose bei nodal-negativen Brustkrebspatientinnen besteht (Ma et al., 2009).

Somit scheint das CXCR3-Liganden System in malignen Tumoren eine duale Rolle einzunehmen. Einerseits wird durch die Rekrutierung von tumorsuppressiven T- und NK-Zellen und durch Hemmung der Angiogenese das Tumorwachstum gehemmt, was eher als protektive Funktion gesehen werden kann. Andererseits scheint eine Überexpression von CXCR3 auf den Tumorzellen die Migration zu entfernten Metastasierungsorten verstärken zu können.

1.4 Chemokine und ihre Rolle in soliden Tumoren

1.4.1 Allgemeine Rolle

In den letzten 15 Jahren wurde immer deutlicher, dass Chemokine und ihre Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und der Metastasierung von Karzinomen spielen. So unterstützen einige Chemokine stark die Tumorgenese, während andere grundlegende Regulationen hemmen, die für die Tumorentstehung oder Metastasierung notwendig sind. Sie wirken entweder direkt auf die Tumorzellen oder beeinflussen diese über verschiedene Interaktionen innerhalb des Tumormikromilieus.

1.4.1.1 Chemokine und das intratumorale Immunmilieu

In Tumoren und deren Umgebung finden sich unterschiedliche Immunzellpopulationen, vor allem Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Dendritische Zellen, „Tumor-assoziierte Makrophagen“ (TAM) (Vicari and Caux, 2002, Bingle et al., 2002) und T-Zellen, deren Effekte auf das Tumorwachstum sehr unterschiedlich sein können. All diese verschiedenen Immunzellpopulationen welche durch Chemokine in den Tumor rekrutiert werden, haben ihrerseits unterschiedlichen Einfluss auf das Tumorwachstum. Dies alleine hilft die vielfältigen pro- oder antineoplastischen Effekte von Chemokinen zu erklären.

Bestimmte Chemokine, so insbesondere die CXCR3-Chemokine können durch Rekrutierung tumor-suppressiver Lymphozyten wie CD8⁺T-Zellen und NK-Zellen das Tumorwachstum hemmen und Metastasierung verhindern.

NK-Zellen machen ca. 15% aller im Blut zirkulierender Lymphozyten aus. Mit Hilfe verschiedener Zytokine ist es ihnen möglich, die Gefäße zu verlassen und bestimmte Gewebe zu infiltrieren (Wiltrout et al., 1984, Fogler et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen gegen Tumorentstehung, Wachstum und Metastasierung agieren (Riccardi et al., 1980, Smyth et al., 1998, Ljunggren and Karre, 1985). Als wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems besitzen sie mittels verschiedener Mechanismen die Fähigkeit, Tumorzellen zu supprimieren (Leibson, 1997, Cooper et al., 2001).

Hier spielt vor allem die Perforin/Granzym-vermittelte Apoptose eine wichtige Rolle. Perforin, ein zytotoxisches Protein wird von den NK-Zellen freigesetzt und führt zu einer Perforation der Zielzellmembran. Hier dringen nun Granzyme in die Zielzelle ein und führen zur Lyse der Zelle. Weiterhin produzieren NK-Zellen bestimmte Zytokine wie IFN- γ , welches eine entscheidende Bedeutung bei der Aktivierung und Induktion bestimmter Chemokine hat. Diese

Chemokine sind wiederum dazu fähig, vermehrt NK-Zellen und tumorsuppressive T-Lymphozyten anzulocken.

In diesem Zusammenhang sind vor allem die CXCR3- Liganden von Bedeutung. So korreliert eine Überexpression von CXCL9 oder CXCL10 mit dem lymphozytären Infiltrat und einer verbesserten Prognose in vielen soliden Karzinomen (Specht et al., 2009a, Suyama et al., 2005, Goldberg-Bittman et al., 2005). Diese Effekte stehen in Verbindung mit einer Erhöhung der zytotoxischen T-Zell- Antwort und einer vermehrten Infiltration von NK-Zellen sowie CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, die die tumor-inhibitorische Immunität vermitteln (Wendel et al., 2008). Addison et al. konnten am Beispiel von nicht-kleinzelligen Lungentumoren zeigen, dass CXCL9 das Tumorwachstum verlangsamt und der Neovaskularisierung entgegenwirkt (Addison et al., 2000a).

Andere Chemokine fördern indirekt das Tumorwachstum, indem sie die Wirkung bestimmter Immunzellen beeinflussen: Tumorassoziierte Makrophagen (TAM) sind spezielle Makrophagen, die vornehmlich im Bereich von Tumoren zu finden sind. Ihre genaue Funktion im Zusammenhang mit Tumoren wird kontrovers diskutiert. So gibt es sowohl pro- als auch antineoplastische Funktionen.

Makrophagen, stammend aus gesunden oder entzündlichen Geweben, sind in der Lage, Tumoren zu lysieren, tumorassoziierte Antigene zu präsentieren sowie immunstimulierende Chemokine zu exprimieren, welche die antineoplastischen Funktionen der T-Zellen sowie NK-Zellen fördern. Im Gegensatz hierzu weisen die TAM diese Fähigkeiten in stark reduzierter Form auf. Hier lässt sich eine enge Interaktion mit verschiedenen Stimuli wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen, bei hoher Korrelation von deren Konzentrationen mit TAM-Leveln, in Tumoren vermuten (Lewis and Pollard, 2006).

Hohe Infiltrationslevel von TAM haben, je nach Tumorentität, eine gegensätzliche prognostische Aussagekraft. In den meisten Fällen gingen hohe TAM Level mit einer schlechten Prognose einher. Ausnahme bildeten hier Untersuchungen bei Kolon- sowie Magenkarzinomen (Lewis and Pollard, 2006).

Auch Lee et al. konnten am Beispiel von Mammakarzinomen verdeutlichen, dass hohe Konzentrationen von TAM mit klinischer Aggressivität, einem fortgeschrittenen Tumorstadium und schlechter Prognose einhergehen (Lee et al., 1997).

Bingle et al. konnten darstellen, dass bestimmte Tumorzellen dazu fähig sind, die antitumorale Aktivität von TAM zu blockieren bzw. zu umgehen. In manchen Fällen sind die Tumorzellen sogar im Stande, die eigentlichen Funktionen der TAM so umzuwandeln, dass es schlussendlich zu einer Förderung des Tumorwachstums kommt. Die Tumorzellen locken die TAM gezielt an

und nützen ihre natürlichen Regulationsmechanismen. Die im Tumor herrschende Hypoxie führt bei den angelockten TAM zu einer vermehrten Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen, diese nutzen die Tumorzellen selbst zur Angiogenese und damit verbundenem Tumorwachstum.

Die Akkumulation von TAM wiederum wird unter anderem durch die beiden Chemokine CCL2 und CCL5 gefördert, indem sie zu einer Monozytenmigration in das Tumorgewebe führen. So sind auch hohe Konzentrationen dieser beiden Chemokine signifikant mit einer schlechten Prognose und einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert (Luboshits et al., 1999, O'Hayre et al., 2008).

1.4.1.2 Chemokine und Angiogenese

Angiogenese ist die Voraussetzung von Wachstum und Ausbreitung maligner Tumoren. Es ist von entscheidender Bedeutung, dass neue Blutgefäße gebildet und das Gewebe adäquat mit Blut versorgt wird. Chemokine können einen Einfluss auf die Angiogenese haben, indem sie Zellen anregen, angiogenetische Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) freizusetzen.

Hier stehen die TAM und andere Makrophagen erneut im Blickfeld, da sie einige potente proangiogenetische Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wie $\text{TNF-}\alpha$, EGF (epidermal growth factor) und VEGF exprimieren und somit Einfluss auf das Wachstum von Tumoren haben (Lewis and Pollard, 2006).

In diesem Zusammenhang kommt einer bestimmten Gruppe von Chemokinen eine wichtige Bedeutung zu. Zu ihnen gehören die ELR^+ -CXC Chemokine, wie CXCL8 und CXCL1. CXCL8 wird als einer der potentesten Faktoren der malignitätsfördernden Neovaskularisation diskutiert (Heidemann et al., 2003, Strieter et al., 2004b). Sparmann et al. konnten nachweisen, dass CXCL8 zu Tumorwachstum und Neoangiogenese bei Zervix-Karzinomen führt (Sparmann and Bar-Sagi, 2004).

Von wichtiger Bedeutung ist weiterhin das ELR^- -CXC Chemokin CXCL12, das neben anderen Effekten starken Einfluss auf die Gefäßneubildung in Tumoren hat. Zusammen mit seinem Rezeptor, dem CXCR4 spielt es eine wichtige Rolle im Brustkrebs und anderen soliden Tumoren (Phillips et al., 2003, Muller et al., 2001). Muller et al. hatten dabei gezeigt, dass CXCR4 von den Mammakarzinomzellen missbraucht wird, um in CXCL12 reiche Organe wie Lymphknoten, Knochenmark und Lunge zu metastasieren.

Andere Chemokine und ihre Rezeptoren sind in der Lage, Angiogenese und somit das Tumorwachstum zu hemmen. Die wichtigsten Vertreter sind hier die CXCR3-Liganden. Die $\text{IFN-}\gamma$ induzierbaren CXC Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 gelten als potente

Inhibitoren der Angiogenese (Rotondi et al., 2007, Pan et al., 2006, Strieter et al., 2004a, Keeley et al., 2010). Pan et al. konnten am Beispiel vom Nierenzellkarzinom (RCC) im murinen Modell verdeutlichen, dass CXCR3-Liganden eine entscheidende Rolle im Feld der Tumormmunoangiostase spielen. Bei der systemischen Immunotherapie mit IL-2 war der Erfolg abhängig vom Vorhandensein des CXCR3-Chemokinsystems. So war bei CXCR3-*Knockout*-Mäusen allein mit IL-2 kein tumorsuppressiver oder angiostatischer Effekt nachweisbar. Eine kombinierte systemische Therapie mit IL-2 und einem CXCR3-Liganden (CXCL9) führte jedoch zu einer signifikant größeren Tumorreduktion, Angiostase und verstärkter Nekrose des Tumors (Pan et al., 2006). Eine weitere Studie am murinen Modell beobachtete, dass der Behandlungserfolg der Tumorregression des RCC verloren ging, sobald die CXCR3-Liganden erschöpft waren (Tannenbaum et al., 1998). Dieser Zusammenhang scheint jedoch nicht allein auf den Effekt der Angiogenesehemmung, sondern zusätzlich auf die verstärkte Infiltration von CD8⁺ T-Lymphozyten zurückzuführen zu sein.

Strieter et al. konnten zeigen, dass die Anwesenheit des ELR-Motivs, N-terminal vom ersten Cystein-Rest, eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit Angiogenese und Angiostase spielt. So zeigten sich ELR⁺ CXC-Chemokine im Vergleich mit ELR⁻ CXC-Chemokinen als potente Induktoren der Angiogenese. CXC-Chemokine, denen das ELR-Motiv fehlt, wie CXCL9 und CXCL10, sind dagegen angiostatisch (Strieter et al., 1995). Ursache der Hemmung der Angiogenese mittels CXCR3-Liganden scheint am ehesten die Interaktion mit dem CXCR3-B-Rezeptor zu sein (Romagnani et al., 2004, Strieter et al., 1995). Weiterhin hemmt CXCR3-B die Chemotaxis und wirkt antiproliferativ (Datta et al., 2006, Walser et al., 2006, Lasagni et al., 2003).

1.4.1.3 Chemokine und Metastasierung

Weiterhin spielen Chemokine eine entscheidende Rolle in der Metastasierung von malignen Erkrankungen (Kawada et al., 2007). Durch Expression spezifischer Chemokinrezeptoren können Tumorzellen, unter Nutzung der entsprechenden Ligandenkonzentrationsgradienten, chemotaktisch an unterschiedliche Metastasierungsorte gelockt werden. Die in diesem Zusammenhang wichtigsten Chemokinrezeptoren und deren Liganden sind CCR7/CCL21 im Rahmen von Lymphknotenmetastasen und CXCR4/CXCL12 bei Lungen-, Leber-, Knochen- und Gehirnmastasen (Zlotnik, 2004, Muller et al., 2001). Auch Murakami et al. konnten im Mausmodell eines malignen Melanoms bestätigen, dass die Tumorzellen an verschiedene Metastasierungsorte wie Lymphknoten (mittels CCR7), Lunge (mittels CXCR4) oder Haut (mittels CCR10) gelockt werden (Murakami et al., 2004).

1.4.1.4 Chemokine und Invasivität von Tumorzellen

Darüber hinaus sind Chemokine in der Lage, Malignitätsfaktoren in Tumorzellen, wie z.B. Proteasen zu induzieren und damit die Invasivität zu erhöhen (Zipin-Roitman et al., 2007, Shin et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass mit CXCL10 behandelte Brustkrebszellen (MDA-MB 231) eine Gruppe von kleinen GTPase der Rho-Proteinfamilie aktivieren und somit die Invasivität und Beweglichkeit der Tumorzellen erhöhen (Li et al., 2004). Weiterhin konnte eine Aktivierung von MMP-9 in mit CXCR3-Liganden stimulierten Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Shin et al., 2010).

1.4.2 Rolle von Chemokinen im Mammakarzinom

Chemokine spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Modulation von Brustkrebs (Ben-Baruch, 2003). Die unterschiedlichen Chemokine und ihre Rezeptoren haben auch im Mammakarzinom verschiedene Funktionen. Beschrieben werden sowohl tumorunterstützende als auch tumorhemmende Mechanismen.

Die Expression des CXCR4-Rezeptors auf Brustkrebszellen ist bereits hinlänglich bekannt (Muller et al., 2001, Sung et al., 2008). Die CXCL12-CXCR4-Achse hat eine enge Assoziation mit der Entstehung von Metastasen und der Tumorpheriferation (Bachelder et al., 2002, Belperio et al., 2004). Kato et al. konnten eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen von CXCR4 und der Entstehung von Lymphknotenmetastasen bei Brustkrebs nachweisen (Kato et al., 2003). Weitere Studien zeigten, dass eine CXCR4-Expression auf den Brustkrebszellen mit einer frühen Metastasierung und Tumorpheriferation assoziiert zu sein scheint (Schmid et al., 2004, Kato et al., 2003, Smith et al., 2004, Keeley et al., 2010).

Müller et al. konnten beobachten, dass Tumorzellen des invasiv-duktales Mammakarzinoms eine hohe Expression von CXCR4 aufweisen. Organe, in die das Mammakarzinom klassischerweise metastasiert (Lymphknoten, Lunge, Leber), haben erhöhte Konzentrationen von CXCL12 mRNA (Muller et al., 2001). Die Inhibierung der CXCL12/CXCR4-Interaktionen *in vivo* führte dementsprechend auch zu einer signifikanten Hemmung der Metastasierung in Lymphknoten und Lunge, was die Hypothese, dass bestimmte Chemokine dazu fähig sind chemokinrezeptor-positive Tumorzellen zu rekrutieren und diese zu metastatischen Nischen zu locken, unterstreicht und eine mögliche Erklärung für die schlechtere Prognose bei erhöhter CXCR4-Expression liefert.

CXCL12 kann darüber hinaus Zellwachstum induzieren, was bereits am Beispiel des Ovarialkarzinoms bewiesen wurde. Eine Zellstimulation mittels CXCL12 führte über eine Aktivierung von CXCR4 und speziellen Kinasen zu einer dosisabhängigen Proliferation der

Krebszellen (Porcile et al., 2005). Außerdem besteht ein Zusammenhang des CXCR4/CXCL12-Systems mit anderen promalignen Mechanismen, welche die Brustkrebsentstehung fördern.

Hier soll kurz auf die Rolle von HER2 und des angiogenetischen Faktors VEGF eingegangen werden. HER2 ist in der Lage, CXCR4 hoch zu regulieren, was wiederum ein wesentlicher Faktor für die HER2 mediierte Invasion und Metastasierung *in vivo* darstellt (Li et al., 2004). Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen HER2 und der CXCR4-Expression in Brustkrebstumorgewebe nachgewiesen werden, wobei das CXCR4 Expressionslevel signifikant negativ mit dem Gesamtüberleben korrelierte (Li et al., 2004). CXCL12 hat wie EGF und 17- β -Estradiol einen proliferativen Effekt auf Brustkrebszellen.

Im Fokus bezüglich der Chemokin-assoziierten Neovaskularisation steht das CXC-Chemokin CXCL8, welches als ein potenter Induktor angiogenetischer Prozesse angesehen wird (Strieter et al., 2004b). In Kombination mit seinem Rezeptor CXCR2 spielt es eine fundamentale Rolle in der Neovaskularisation verschiedener Tumorsysteme (Addison et al., 2000b, Heidemann et al., 2003). Insbesondere am Beispiel von Brustkrebszellen wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, die komplexe Interaktionen zwischen CXCL8 und seinem Rezeptor aufweisen konnten (Azenshtein et al., 2005). So bestand eine Assoziation zwischen erhöhten CXCL8-Serumspiegeln und einer progredienten Erkrankung (Benoy et al., 2004, Yokoe et al., 1997). Die besondere Stellung von CXCL8 wird dadurch verstärkt, dass im Gegensatz zu den meisten anderen Chemokinen von den Brustgewebszellen selbst und nicht von den Tumorzellen exprimiert wird. So kommt CXCL8 sowohl bei Brustkrebspatientinnen als auch bei gesunden Vergleichspersonen vor (Palkowetz et al., 1994, Miller et al., 1998).

Pantschenko et al. konnten jedoch zeigen, dass die CXCL8 Expression bei Patientinnen mit invasiv duktalem und in situ Karzinomen höher ist als bei Vergleichspatientinnen mit benignen Brustkrankungen (Pantschenko et al., 2003). So scheint das Chemokin auf physiologische Weise eine Rolle in der natürlichen Gewebshomeostase zu spielen. Im Tumorgewebe wirkt es jedoch als malignitätsfördernder Faktor, indem es die Neovaskularisation steigert (Ben-Baruch, 2006).

Die durch INF- γ induzierbaren Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 und ihr Rezeptor CXCR3 weisen sowohl pro- als auch anti-proliferative Wirkungen auf. Der CXCR3-Rezeptor wird vorwiegend auf der Oberfläche von NK-Zellen und Th1 tumorsuppressiven Lymphozyten exprimiert und ist mitverantwortlich für deren chemotaktische Rekrutierung in Tumorgewebe (Groom and Luster, 2011, Wendel et al., 2008). Dementsprechend sind hohe Konzentrationen

der durch INF- γ induzierbaren Chemokine mit einer verstärkten Immunantwort und einem verbesserten Überleben bei soliden Tumoren assoziiert. In diesem Zusammenhang konnten Specht et al. beim Mammakarzinom einen statistischen Zusammenhang zwischen erhöhter CXCL9 mRNA und besserem Überleben nach CMF-Chemotherapie beobachten (Specht et al., 2009a). Des Weiteren fiel auf, dass CXCL9 mit einem Therapieansprechen auf bestimmte neoadjuvante Chemotherapieregime und auf das Einwandern von CD8-positiven T-Lymphozyten in Brustkrebsgewebe reagiert (Denkert et al., 2010). Diese Ergebnisse konnten am Mausmodell reproduziert werden: Walser et al. transfizierten murine Brustkrebszellen mit CXCL9 und konnten in folgenden Experimenten nachweisen, dass hieraus eine erhöhte chemotaktische T-Zell Infiltration, ein vermindertes Tumorwachstum und ein verbessertes Überleben resultiert (Walser et al., 2007).

Bei weiteren Untersuchungen des zugehörigen Rezeptors zeigte sich jedoch, dass dieser auch mit gegenteiligen Effekten assoziiert sein kann, wenn dieser auf Tumorzellen exprimiert ist. So konnte die Forschungsgruppe um Ma et al. am Mausmodell beobachten, dass eine erhöhte CXCR3-Expression mit einem schlechteren Überleben und einer erhöhten Rate an Metastasierungen beim Mammakarzinom einhergeht (Ma et al., 2009). Die chemotaktische Anlockung kann vermutlich zu Metastasierung anregen und somit die Streuung in andere Organe, wie Lymphknoten, begünstigen (Kawada et al., 2007).

Datta et al. wiesen nach, dass Ras-Proteine im Mammakarzinom Tumorwachstum und -entstehung unterstützen, indem sie eine Kaskade von Proteinkinasen aktivieren, welche über Metalloproteasen (MMP-9) und Chemokine ihre Wirkung entfalten (Datta et al., 2006). In diesem Zusammenhang spielt CXCL10 eine wichtige Rolle, da es mittels RAS stark hochreguliert wird.

1.5 Regulation des CXCR3-Chemokinsystems und Möglichkeiten der pharmakologischen Beeinflussung

Im Hinblick auf eine mögliche Beeinflussung der CXCR3- Liganden scheint es sinnvoll, einen genaueren Blick auf deren Regulatoren zu werfen. Bislang ist über die Regulation von CXCL9 und CXCL10 in Brust- und Brustkrebszellen nur wenig bekannt.

1.5.1 Estradiol

In Endometriumkrebszellen konnte bereits eine Hochregulation von CXCL12 durch 17- β -Estradiol und Tamoxifen, einem selektiven Estrogenmodulator, nachgewiesen werden (Kubarek and Jagodzinski, 2007). Sentman et. al konnten *in vitro* eine durch Estradiol

getriggerte Hochregulation von CXCL10 und CXCL11 in Endometriumzellen zeigen (Sentman et al., 2004). Andere Studien konnten ähnliche Zusammenhänge unter anderem auch bei Brustkrebszellen bestätigen (Pietkiewicz et al., 2010, Kubarek et al., 2009).

1.5.2 Prolaktin

Für Prolaktin, ein Hypophysenvorderlappenhormon, das vor allem an der Regulation der Laktation bei der Frau beteiligt ist, konnte eine regulierende Funktion auf die CXCR3-Liganden nachgewiesen werden (Kanda and Watanabe, 2007). So zeigte Prolaktin *in vitro* eine Steigerung der IFN- γ induzierten CXCL9-, CXCL10- und CXCL11- Expression in Keratinozyten. Dies scheint auf eine Aktivierung von STAT1, NF κ B und IRF-1 via JAK-2 und MEK/ERK zurückzuführen zu sein (Kanda and Watanabe, 2007).

1.5.3 Prostaglandin

Prostaglandine, über COX regulierte Gewebeshormone, sind hinsichtlich ihrer vielfältigen Wirkungen ebenfalls Kandidaten, um etwaige Regulationsmechanismen zu untersuchen.

Das CXC-Chemokin, CXCL14, wird im Endometrium unter anderem durch Progesteron reguliert und spielt dort im Rahmen der weiblichen Menstruation eine wichtige Rolle indem es uterine NK-Zellen aktiviert (Mokhtar et al., 2010). Ob andere Chemokine, v.a. CXCL9 und CXCL10 ebenfalls durch Progesteron beeinflusst werden können und welche Bedeutung sie in der Pathogenese von Brustkrebs spielen, wurde bisher nur am Beispiel von Endometriumkarzinom erforscht (Sentman et al., 2004).

1.5.4 Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α)

Der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) gehört zu der Gruppe der Zytokine und ist maßgeblich an lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt. TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und ist an Zellnekrose, -proliferation und -differenzierung beteiligt. Dies geschieht zum Großteil über die Stimulation von NF κ -B, einem Transkriptionsfaktor, der entscheidend für die Expression von CXCL9 und CXCL10 ist (Hiroi and Ohmori, 2003). In Voruntersuchungen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine Stimulation von Brustkrebszellen mit TNF- α eine deutliche Verstärkung des INF- γ Effekts bewirkt.

Insgesamt erscheinen all diese Kandidaten vielversprechend, die genauen Regulationsmechanismen detaillierter zu untersuchen.

1.6 COX1 und COX 2 und COX- Inhibitoren

Da in Melanomzellen gezeigt werden konnte, dass Prostaglandin E₂ einen inhibierenden Effekt auf die CXCR3- Ligandensekretion hat (Kanda et al., 2002), soll in der vorliegenden Arbeit ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem Cyclooxygenase (COX)-System und der CXCL9- bzw. CXCL10- Ausschüttung im Mammakarzinom untersucht werden.

Die Cyclooxygenase-1 und -2 sind die wesentlichen Katalysatoren für die Umwandlung von Arachnoidonsäure in Prostaglandin. In zwei Reaktionsschritten wird zunächst Prostaglandin G₂, dann Prostaglandin H₂ gebildet. Mittels verschiedener Synthasen, Oxydasen und spontaner Isomerisation werden die weiteren Prostaglandine aus dem Prostaglandin H₂ synthetisiert. Die Cyclooxygenasen sind hierbei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt und nehmen so eine zentrale Stellung bei der Synthese ein.

Harris et al. konnten anhand einer prospektiven Studie zeigen, dass eine regelmäßige Einnahme von NSAR (nicht-steroidalen Antirheumatika) mit einem niedrigeren Brustkrebsrisiko einhergeht (Harris et al., 2003). Bekannt ist, dass die meisten epithelialen Tumoren COX-2 exprimieren, was ein erhöhtes Prostaglandinlevel (PGE₂) im Tumorgewebe nach sich zieht (Fulton et al., 2006). PGE₂, das Hauptprodukt der Cyclooxygenase in Tumoren, unterstützt das Tumorstadium, indem es die Aktivität von NK-Zellen und T-Zellen reduziert (Brunda et al., 1980, Sinha et al., 2007). Weiterhin scheint eine erhöhte COX- Expression im Brustkrebs mit erhöhter Metastasierung und schlechterer Prognose vergesellschaftet zu sein (Ristimaki et al., 2002). Da Prostaglandin die CXCR3- Ligandenexpression supprimiert, wird in dieser Arbeit versucht diesem durch Hemmung der COX entgegenzuwirken.

Die Cyclooxygenasen sind maßgeblich an der Biosynthese der Prostaglandine und des Thromboxans A₂ beteiligt. Sie lagert zwei Sauerstoffmoleküle an die Arachnoidonsäure (Eikosatetraensäure) an, wodurch PGG₂ entsteht. Durch Reduzierung einer Hydroperoxidgruppe entsteht dann PGH₂. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete PGE₂ ist ein zelltypspezifisches Prostaglandin, welches vor allem von Makrophagen, Endothelzellen, Nierenepithelien und glatten Muskelzellen gebildet wird, aber auch Hauptprodukt der COX in Tumoren ist.

Des Weiteren existieren zwei Isoformen der Cyclooxygenase, die COX-1 und die COX-2. Die COX-1 wird in den meisten Geweben konstitutiv, die COX-2 nur in geringen Mengen exprimiert. Die Expression der COX-2 nimmt jedoch bei Entzündungsreaktionen stark zu (Rassow, 2006).

1.6.1 COX-Inhibitoren

COX-Inhibitoren hemmen die Cyclooxygenase, indem sie die Bindungstasche der Arachnoidonsäure sterisch blocken. Da hierdurch die Prostaglandinsynthese gehemmt wird, wirken sie antiphlogistisch und durch verminderte Prostaglandin- induzierte Hyperalgesie analgetisch.

Sie werden auch als Nicht- Opioid Analgetika, nicht- steroidale Antirheumatika (NSAR) oder als NSAID (non steroidal anti-inflammatory drugs) bezeichnet.

1.6.1.1 Indometacin

Indometacin ist ein potentes Indolessigsäurederivat aus der Gruppe der unselektiven NSAR. Es findet hauptsächlich Anwendung im Rahmen entzündlich-rheumatischer Gelenkerkrankungen, akutem Gichtanfall, schmerzhaften Schwellungen und Entzündungen. Ferner wird es in der Geburtshilfe zur Tokolyse bei vorzeitigen Wehen eingesetzt. Es wird häufig nur als Akuttherapie toleriert, da es mit erheblichen, meist dosisabhängigen Nebenwirkungen verbunden ist. Hier sind vor allem gastrointestinale Beschwerden, bis hin zu Magengeschwüren zu nennen (Karow, 2010).

1.6.1.2 Acetylsalicylsäure (ASS)

ASS ist ein irreversibler Hemmer der Cyclooxygenase aus der Gruppe der unselektiven NSAR. ASS zeigt dosisabhängige Effekte. So kann man bereits ab $<30\text{mg/d}$ eine Thrombozytenaggregationshemmung nachweisen, was im Rahmen myokardialer und zerebraler Minderperfusion Anwendung findet. Bis 3g/d ist die Wirkung hauptsächlich analgetisch und antipyretisch, bei $2\text{-}4\text{g/d}$ zusätzlich antiphlogistisch. Ab $>8\text{-}10\text{g/Tag}$ ist mit einer Intoxikation zu rechnen. Die Nebenwirkungen entsprechen den typischen Nebenwirkungen der Cyclooxygenase-Hemmer, mit gastrointestinalen Beschwerden, Überempfindlichkeit, Verlängerung der Blutungszeit, ZNS Beschwerden und verminderter Nierenperfusion (Karow, 2010).

1.6.1.3 Celecoxib

Celecoxib ist ein selektiver COX-2- Hemmer aus der Gruppe der Coxibe. Zur Anwendung kommt es vornehmlich bei degenerativen Gelenkerkrankungen und chronischer Arthritis, wo es ähnlich effektiv wie herkömmliche NSAR wirkt. Der wesentliche Vorteil sind die geringeren gastrointestinalen Nebenwirkungen. Bei der Gruppe der selektiven COX-2 Inhibitoren zeigten sich jedoch vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse, was zum Beispiel zur Marktrücknahme von Rofecoxib führte. Weitere Nebenwirkungen sind vermehrte Na^+ - und Wasserretention mit folgendem Blutdruckanstieg, Ödeme und Verschlechterung einer vorbestehenden

Niereninsuffizienz. Vor allem bei kombinierter Einnahme mit ASS kann es zu gastrointestinalen Beschwerden führen (Karow, 2010).

Celecoxib ist der einzige beim Mammakarzinom bisher prospektiv getestete COX-Inhibitor (Androulidaki et al., 2009, Barnes et al., 2007).

1.7 Vorarbeiten und Zielsetzung

Daten aus klinischen Untersuchungen ebenso wie Mausexperimente belegen den protektiven Effekt von intratumoralen CXCR3- Liganden. Insbesondere CXCL9 scheint mit einem verstärkten tumor-suppressiven lymphozytären Infiltrat einherzugehen und dadurch Tumorstadium zu unterdrücken zu können.

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die bislang weitgehend unbekannt Regulation von CXCR3- Chemokinen in Mammakarzinomzellen zu untersuchen und mögliche pharmakologische Wege ihrer intratumoralen Anreicherung aufzuzeigen.

Hierzu sollen parakrine und autokrine Regulationsfaktoren der CXCL9- und CXCL10- Sekretion in Mammakarzinomzellen identifiziert werden.

Nach Charakterisierung ihrer Regulation innerhalb des Tumormikromilieus ist es das Ziel Möglichkeiten der pharmakologischen Einflussnahme aufzuzeigen.

Ferner erfolgt die Bestimmung der Proteinexpression von CXCR3, CXCL9 und CXCL10 mittels ELISA und Westernblot in archivierten Tumorproben (gefrorenes Frischgewebe) von unbehandelten und mittels Chemotherapie behandelten Mammakarzinompatientinnen und der Vergleich der Ergebnisse mit den histomorphologischen und klinischen Daten.

Die Ergebnisse sollen das Verständnis für die Rolle dieses Chemokinsystems beim (un)behandelten Brustkrebs erweitern, letztendlich ihre Bedeutung als neue Biomarker für individualisierte Therapieentscheidungen aufzeigen und durch die Untersuchung ihrer Biochemie Grundlagen für therapeutische Interventionsmöglichkeiten, wie bereits Tierexperimente sie zeigen, beim Menschen schaffen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patienten

Die Tumorproben stammten aus der Gewebebank der Frauenklinik der TU München. In dieser Gewebebank befinden sich ca. 12.000 Einzelproben von Patientinnen mit Mammakarzinom einschließlich Informationen über die Histopathologie, Klinik, Therapie und Krankheitsverlauf. Das schriftliche Einverständnis der Patientinnen bezüglich der Verwendung der Daten und des Gewebematerials zu wissenschaftlichen Zwecken wurde präoperativ routinemäßig eingeholt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Kollektiv von 60 Brustkrebspatientinnen mit den folgenden Kriterien verwendet: pT1/2, pN1, ER+, M0. Die Patientinnen sind zwischen 1991 und 2004 primär operiert worden. Unmittelbar nach Entnahme der Gewebeproben wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Tumorextrakte waren entsprechend der publizierten Protokolle hergestellt worden (Janicke et al., 1994).

2.1.2 Mammakarzinom-Zelllinien

Im folgendem Projekt wurden zwei unterschiedliche humane Mammakarzinomzelllinien, MDA-MB 231 und MCF-7 Zellen (American Type Culture Collection, Manassas, VA) untersucht. Alle verwendeten Zelllinien sind im Labor der Frauenklinik bereits etabliert.

2.1.3 Zellkulturmedien und -supplemente

Im Rahmen der Zellkultur wurde Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) mit Glutamax, Dubbecco's phosphate buffered saline (DPBS), Fetales Kälberserum (FCS), Geneticindisulfat (G418), N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES, 1 M), Hygromycin B und Dulbecco's PBS Puffer von der Firma Gibco, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Dimethylsulfoxid (DMSO), L-Arginin, L-Asparagin und Tryptan Blue Solution (0,4 %) der Firma Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) verwendet. Außerdem Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Trypsin von der Firma Biochrom AG (Berlin, Deutschland). Alle weiteren Chemikalien kamen von Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma (St.Louis, MO, USA). Verwendete Verbrauchsmaterialien, sofern nicht anders vermerkt, wurden von der Firma BD Biosciences (NJ, USA), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und B Braun (Deutschland) bezogen.

2.1.4 Regulationsfaktoren

Als Effektorsubstanzen wurde rekombinantes humanes Interferon gamma (IFN- γ) und humaner rekombinanter Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) von Peprotech (Hamburg, Deutschland), Prostaglandin E₂, PGE₁ Alkohol, Butaprost, Sulproston, Indomethacin und Celecoxib von Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA) benutzt und in Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) rekonstituiert. Die Acetylsalicylsäure (ASS) stammte von Sigma (St.Louis, MO, USA) und wurde in PBS rekonstituiert.

2.1.5 ELISA-Kits

Zum quantitativen Nachweis von CXCL9 und CXCL10 in Gewebeextrakten und Überständen wurden das *Human CXCL9/MIG DuoSet DY392* und das *Human CXCL10/IP-10 DuoSet DY266* von R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet. Die genutzte TMB Peroxidase SubstratSolution stammte von Kirkegaard & Perry Laboratories (KPL Inc., Gaithersburg, MD, USA).

2.1.6 Proteinbestimmung, SDS-Gelelektrophorese, Western-Blot-Analyse

Die Proteinanalyse mittels Immunblot wurde die folgenden Chemikalien durchgeführt: Acrylamid (Rotiphorese Gel 40), Ammoniumpersulfat (APS), Essigsäure, Natriumdodecylsulfat (SDS) von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland), Coomassie Blau und Methanol von Merck (Darmstadt, Deutschland). Außerdem fetales Kälberserum (BSA), Glycin, Milchpulver, Tetramethylethylendiamin (TEMED), Trishydroxymethylaminomethan (Tris) und Triton X 100 von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), das BCA Protein Assay Kit (mit BSA) und Pierce ECL Western Blotting Substrate von Thermo Fisher Pierce Protein Research Products (Rockford, IL, USA). Ferner PVDF Membrane von Millipore GmbH (Schwalbach, Deutschland), Tween 20 von AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland) und Proteinmarker Prestained Protein Ladder #SM0671 von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland).

Tabelle 2-1: Antikörper

Antigen	Antikörper	Spezies	Firma
CXCL9	Anti-human CXCL9 (Mig), Klon 49106	Monoklonal (Maus)	R&D Systems, Minneapolis, USA
CXCL10	Anti-human CXCL10 (IP-10), AF-266-NA	Polyklonal (Ziege)	R&D Systems, Minneapolis, USA
CXCL10	Anti-human CXCL10 (IP-10), Klon 33036, MAB 266	Monoklonal (Maus)	R&D Systems, Minneapolis, USA

CXCR3	Ani Anti-human CXCR3, Klon 49801	Monoklonal (Maus)	R&D Systems, Minneapolis, USA
COX-1	Anti-human COX-1, Klon COX 111	Monoklonal (Maus)	Invitrogen Corporation, Camarillo, CA
COX-2	Anti-human COX-2, Klon CX229	Monoklonal (Maus)	Biozol Diagnostica, Eching, Germany
GAPDH	Anti-glyceraldehyde 3-phosphat dehydrogenase, Klon 6C5	Monoklonal (Maus)	Millipore, Billerica, MA, USA
HRP	Horseradish peroxidase-conjugated IgG	Polyklonal (Ziege)	Jackson ImmunoResearch, Burlington, ON, USA
CathepsinB	Cathepsin B Monoclonal Antibody for Western Blot	Monoklonal (Maus)	Thermo Fisher, Rockfort, IL, 61105 USA

2.2 Zellbiologische Methoden

Die verwendeten Zelllinien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM) kultiviert, dem zusätzlich 10 % fetales Kälberserum (FCS), 10 mg/ml Gentamycin, 1 M HEPES und 0,36 g/1,16 g Asparagin/Arginin zugesetzt waren. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Heraeus Begasungsbrutschrank bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre (96 %) unter 5 % CO₂-Begasung. Alle Zellexperimente und Kulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Steril-Arbeitsbank (Heraeus HeraSafe; Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt.

2.2.1 Passagieren der Zellen

Zur Vermeidung eines Wachstumsarrests durch Kontaktinhibition wurden die Zellen abhängig von ihrer Wachstumsdichte alle zwei bis fünf Tage im Verhältnis von 1:2 bis 1:20 gesplittet und erneut in frische Zellkulturflaschen überführt.

Zu diesem Zweck wurde das Medium zunächst vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Um die Zellen von der Oberfläche zu lösen, wurden sie nun mit 0,05 % PBS/EDTA bedeckt (ca. 3 ml) und ca. 5 min bei 37 °C inkubiert, bis sich sichtlich der Zellrasen löste. Nach Resuspension der gelösten Zellen mit ca. 7 ml Medium wurde die Suspension bei Raumtemperatur (RT) und 1300 rpm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet erneut in ca. 10 ml Medium resuspendiert. Je nach Dichte der Zellen wurden nun 0,5-2,0 ml in neue Zellkulturflaschen überführt und mit frischem Medium verdünnt.

2.2.2 Stimulation der Zellen

Um die Zellen mit den Efferktorsubstanzen stimulieren zu können, mussten sie zunächst in 24-Well Platten ausgesät werden. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen

ausgezählt (Zellen [ml⁻¹] = (Zellzahl/Zahl der gezählten Großquadrate) x 10.000) und in entsprechender Menge in die einzelnen Wells übertragen. Ziel war es, pro Well 5 x 10³ MCF-7 und 7 x 10³ MDA-MB 231 Zellen zu erhalten. Das Vorgehen entspricht dem oben beschriebenen des Passagierens. Nachdem die Zellen abzentrifugiert und resuspendiert wurden, wurde ca. 60 µl hiervon in ein kleines Eppendorfgefäß abpipettiert und 1:1 mit Tryptanblau vermischt. Hiervon wurde nun eine kleine Menge auf die Zählkammer aufgetragen und die Gesamtzellzahl in der Suspension bestimmt.

Sobald die Zellen in den 24-Well-Platten zu ca. 70-80 % konfluent waren, wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden je 500 µl von 37 °C warmen, FCS-freien Hungermedium auf die Zellen gegeben. Diese wurden dann erneut für 24 h bei 37 °C inkubiert.

Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und mit 190 µl Hungermedium/Well ersetzt. Es wurden nun jeweils 30 µl einer definierten Verdünnung der jeweiligen Effektorsubstanz (Prostaglandinanaloga oder Cyclooxygenaseinhibitoren) hinzugegeben. Das IFN-γ wurde 30 min später zugefügt. Die Zellen wurden erneut für 18-24 h inkubiert.

Danach wurden die Überstände geerntet, indem man vorsichtig 220 µl pro Well abpipettierte und diesen in beschriftete Eppendorftubes überführte. Sofern man die Überstände nicht unmittelbar für weitere Versuche nutzte, wurden sie bei -20 °C eingefroren.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um die Zellen für einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden sie in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und danach wie oben beschrieben abgelöst, gewaschen und abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend in eiskaltem Einfriermedium (90 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)) aufgenommen. Die erhaltene Zellsuspension wurde in Cryogefäßen (1 ml) abgefüllt, 5 min auf Eis (-20 °C) inkubiert im Anschluss in einer Styroporbox bei -80 °C gelagert. Bei längerfristiger Lagerung erfolgte dies in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Das Auftauen von zuvor in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C gelagerten Zellen sollte möglichst schnell erfolgen, um Zellschäden während des Auftauens zu vermeiden. Die Aliquots wurden aufgetaut, resuspendiert und bei 1000 rpm abzentrifugiert, um das toxisch wirkende DMSO möglichst schnell zu entfernen. Daraufhin folgte die Resuspension des Pellets in dem vorgewärmten Medium und die Kultivierung unter oben genannten Bedingungen.

2.2.4 MTT Assay

Die Zellviabilität nach Stimulation mit Zytokinen, Cyclooxygenase-Inhibitoren und Prostaglandin wurde mit Hilfe eines MTT Assay untersucht. Zu diesem Zweck folgte das Aussäen von 5×10^3 MCF-7 Zellen bzw. 7×10^3 MDA-MB 231 Zellen pro Well in 96-Well Mikrotitrierplatten, mit anschließender 24 h Kultivierung. Nach weiteren 24 h in FCS-freiem Medium wurden sie mit den verwendeten Regulationsfaktoren stimuliert und für weitere 24 bzw. 48 h inkubiert. Schließlich wurden 20 μ l MTT (3- (4,5- Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Sigma-Aldrich) zugefügt und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte schließlich bei 590 nm im SLT Spectra ELISA Reader (Crailsheim, Deutschland), nach Zugabe von 100 μ l DMSO.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

Mit Hilfe des ELISA wurden die CXCL9- und CXCL10- Konzentrationen in geernteten Zellüberständen der stimulierten Brustkrebszellen und in den Gewebeproben gemessen. Die Überstände der MCF-7 Zellen wurden unverdünnt und die der MDA-MB 231 Zellen in einer Verdünnung von 1:15 in Hungermedium aufgetragen. Die Tumorgewebeextrakte wurden 1:5 in 1 %BSA/PBS verdünnt. Die Stimulation und das Ernten der Überstände erfolgte wie oben beschrieben. Als CXCL9/MIG ELISA wurde das DuoSet® DY392 der Firma R&D Systems verwendet. Es wurden je 100 μ l/Well des Capture-Antibodies, 1080 μ g/ml mouse anti-human CXCL9 nach Rekonstitution mit 1 ml PBS, in einer Verdünnung von 1:180 auf eine 96-Well Mikroplatte aufgetragen. Verdünnt wurde mit PBS. Es folgte die Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Platte mit 0,05 % PBST (1x PBS + 0,05 % Tween 20) dreimal gewaschen und anschließend für mindestens 1 h mit 300 μ l 1% BSA/PBS geblockt. Zur Erstellung der Standardkurve wurden acht absteigende Konzentrationen von rekombinantem CXCL9 in 1 %BSA/PBS hergestellt (2000 pg/ml als höchster Standard in folgender zweifacher Verdünnungsreihe). Jeweils 100 μ l wurden nach einem weiteren Waschschrift gemeinsam mit den jeweiligen Proben auf die 96-Well Microplatte aufgetragen. Nach einer mindestens zweistündigen Inkubation folgte eine erneute Waschung und anschließendes Auftragen von 100 μ l des Detektionsantikörpers (36 μ g/ml goat anti-human-CXCL9 nach Rekonstitution mit 0,5 ml 1% BSA/PBS), ebenfalls in einer Verdünnung von 1:180. Nach 2 h Inkubation erfolgte erneutes Waschen und das Auftragen von 100 μ l Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:200. 20 min später wurde erneut gewaschen und

je 100 µl Substrat Solution (1:1) aufgetragen. Beide Schritte liefen unter Vermeidung von direktem Licht ab. Als Stopplösung wurde 1 M H₂SO₄ verwendet, wovon je 50 µl pro Well aufgetragen wurden. Es folgte die unmittelbare Messung mit dem SLT Spectra Elisa Reader, Software easy WIN fitting, bei 450 nm (SLT, Crailsheim, Deutschland).

Für den human CXCL10/IP-10 ELISA wurde das DuoSet® DY266 verwendet. Das Protokoll wurde bis auf herstellerbedingte Änderungen der Rekonstitution und Verdünnung analog zum CXCL9-ELISA durchgeführt.

Tabelle 2-2: Zusammensetzung von 10 x PBS pH7,4

NaCl	80,0 g/l
KH ₂ PO ₄	2,0 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	11,4 g/l
KCL	2,0 g/l
H ₂ O	1000 ml

2.3.2 Herstellung von Zelllysaten (totale Zelllyse)

Um zelluläre Proteine nachzuweisen, wurden die Zellen zunächst durch einen speziellen Lysepuffer in Lösung gebracht. Die stetige Kühlung der verwendeten Lösungen und Materialien wurde zur Hemmung der zelleigenen Proteasen strikt eingehalten. In 6 cm Kulturschalen wurden nun 5x10⁶ Zellen zur Herstellung von Zelllysaten ausgesät. Bei einer Konfluenz von ca. 70-80 % wurden die Zellen wie folgt lysiert: Zunächst wurde der Lysepuffer (50 nM Hepes, PH 7,5, 4 °C, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 % Glycerin, 1 % Triton X-100, 1 nM NaO-Vanadat, Protease-Inhibitor Cocktail Complete EDTA- frei (Roche, Deutschland)) langsam auf Eis aufgetaut und ein 50 ml Falcon PBS auf ca. 4 °C gekühlt. Sobald der Lysepuffer vollständig aufgetaut war, wurden die Kulturschalen aus dem Brutschrank entnommen und ebenfalls auf Eis gelegt. Bevor mit 3 ml eiskaltem PBS zweimal gewaschen wurde, erfolgte das vorsichtige absaugen des Mediums mit der Pasteurpipette. Im nächsten Schritt wurden 400 µl des Lysepuffers auf die Zellen gegeben, vorsichtig geschwenkt und mit Hilfe eines Zellschabers (BD Bioscience, NY, USA) mechanisch von ihrer Unterlage entfernt und in Suspension gebracht. Diese wurde schließlich in Eppendorf Reaktionsgefäße (1 ml) übergeführt und für mindestens 20 min auf Eis gestellt. Zur vollständigen Zelllyse, wurde zusätzlich ein Ultraschallgerät unter Nutzung der Kavitationskräfte zweimal je 10 s angewandt. Sofern das Lysat nicht unmittelbar danach zur Verwendung kam, wurde es bei -20 °C weggefroren.

2.3.3 Proteinbestimmung mittels BCA Protein Assay Reagent (Bicinchoninsäure)

Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels des BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL), der nach dem Prinzip der Biuret-Reaktion funktioniert und entsprechend

der Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. In alkalischer Lösung bilden sich Protein-Cu²⁺-Komplexe. Die Cu²⁺-Ionen werden dann zu Cu⁺ reduziert und bilden mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Zunächst wurde eine TBS-Stocklösung hergestellt und diese zu einer 0,05 % TBST Gebrauchslösung unter Zugabe von Tween 20 mit Aqua dest. verdünnt. Der Albuminstandardstock (2 mg/ml) wurde mit BSA und TBST in neun verschiedenen Konzentrationen plus Leerwert verdünnt. Als Kontrollen diente Precipath Protein Control in den Verdünnungen 1:200 und 1:1000. Das BCA Reagenz wurde laut Hersteller 1:200 verdünnt. Nun wurden je 50 µl Probe, Standard oder Puffer auf eine 96-Well Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt. Die Inkubation erfolgte entweder bei 37 °C für 2 h oder über Nacht bei Raumtemperatur. Die Absorption wurde im ELISA Reader bei 550 nm gemessen.

TBS Stammlösung:

0,2 M Tris HCl

7,305 % (w/v) NaCl

H₂O dest., PH 8,5

2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) unter Verwendung der Mini-Protean Cell Apparatur (BioRad). Die durch das SDS denaturierten Proteine gehen nichtkovalente Wechselwirkungen mit hydrophoben Bereichen ein, wobei das Verhältnis von SDS-Molekülen pro Aminosäure annähernd konstant ist. Durch den Ausgleich der Ladungsunterschiede durch SDS erhalten alle Proteine eine negative Ladung und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Da die spezifische Ladung gleich ist, hängt die Wanderung neben der Durchlässigkeit der Matrix nur vom Molekulargewicht der Proteine ab. Für die Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden die Glasplatten zunächst gründlich mit 70 % Ethanol und H₂O gereinigt und dann in die Apparatur eingespannt. Nun wurde vorsichtig das Trenngel zwischen die zwei abgedichteten Glasplatten gegossen, welches mit ca. 1 ml Isopropanol überzogen wurde, um eine Glättung der Gelgrenze zu erreichen und den Kontakt mit Sauerstoff zu vermeiden. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren wurde der Alkohol abgegossen und mit H₂O mehrmals ausgewaschen. Nach Hinzugabe des Sammelgels erfolgte unverzüglich, unter strikter Vermeidung von Luftblasen, das Einsetzen des Gelkamms. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt, diese mit Elektrophoresepuffer

gefüllt und die Kämme wurden vorsichtig entfernt. Die aufzutragenden Proben (Gesamtprotein je nach Experiment) wurden zwischenzeitlich mit 5x Laemmli-Puffer + 25 % Mercaptoethanol, und PBS auf das gewünschte Endvolumen gebracht und fünf Minuten bei 96 °C denaturiert. Die Geltaschen wurden mit der jeweiligen Probe und dem Proteinmarker Prestained Protein Ladder #SM0671 (Fermentas, St. Leon- Rot, Deutschland) zur späteren Abschätzung der Molekulargewichte beladen. Die Proteine wurden zunächst bei 80 V im Sammelgel konzentriert und bei Erreichen der sichtbaren Lauffront im Trenngel bei 150 V aufgetrennt.

Die genannten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2-3: Herstellung des Probenauftragspuffers = Laemmli- Puffer

1M Tris- HCl pH 6,8	15 ml	150 mM
Glycerin	45 g	45 %
Bromphenolblau	10 mg	0,01 %
β-Mercaptoethanol	6 ml	17 %
SDS	15 g	15 %
H ₂ O	100 ml	

Tabelle 2-4: Herstellung von 10x Elektrophoresepuffer

Glycin	144 g	1,6 M
Tris	30 g	250 mM
SDS	10 g	40 mM/ 1 %
H ₂ O	1liter	

Tabelle 2-5: Herstellung von Trenn- und Sammelgel

Trenngel 1,5mm	15 %	12 %	10 %
H ₂ O	3,5 ml	4,3 ml	4,8 ml
1,5 M Tris-HCl, pH8,8 RT	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 %SDS RT	100 ml	100 ml	100 ml
40 % Acrylamid 4°C	3,8 ml	3 ml	2,5 ml
10 % Ammoniumpersulfat	50 ml	50 ml	50 ml
TEMED RT/Abzug	5 ml	5 ml	5 ml
Gesamtvolumen	10 ml	10 ml	10 ml
Sammelgel (jede Stärke)	4 %		
H ₂ O	6,4 ml		
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 RT	2,5 ml		
10 %SDS RT	100 ml		

40 % Acrylamid 4 °C	1,0 ml		
10 % Ammoniumpersulfat	50 ml		
TEMED RT/Abzug	10 ml		
Gesamtvolumen	10 ml		

2.3.5 Westernblot- Analyse

Bei der Westernblot- Analyse erfolgte der Nachweis der durch SDS-Page aufgetrennten Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Um die Proteine auf eine PVDF-Membran zu transferieren, wurde mit Hilfe gängiger Blotting- Verfahren ein elektrisches Feld aufgebaut. Die Proteine werden auf der Oberfläche der Membran immobilisiert und so immunologischen Reaktionen zugänglich gemacht.

2.3.5.1 Semi-Dry Blot

Der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran wurde mittels Semi-Dry Blot (Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst beide Metallflächen der „Blotting-Maschine“ mit 70 % Ethanol gereinigt. Pro Gel wurden sechs Whatman-Filterpapiere und eine PVDF-Membran auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten (ca. 5,5 x 8 cm). Sowohl die Filterpapiere als auch die Membran wurden vor dem Blot kurz in Semi-Dry Puffer (s.u.) gelegt. Die PVDF-Membran wurde zusätzlich kurz mit Methanol benetzt. Nun wurden zuerst drei nasse Filterpapiere, dann die Membran, das Gel und zuletzt wieder drei Lagen Filterpapier exakt übereinander auf die Metallfläche der Maschine gelegt. Durch diese Maßnahme wurde die Bildung von Luftblasen zwischen den Lagen vermieden. Nach dem Schließen der Kammer wurden die Gele für 120 min auf die Membranen geblottet. Bei einfacher Membran wurde eine Stromstärke von 75 mA und für doppelte Membranen eine Stromstärke von 150 mA angelegt.

Tabelle 2-6: Semi-Dry Puffer

Tris	5,82 g	50 mM
Glycin	2,93 g	30 mM
SDS	0,037 g	4 ‰
Methanol	200 ml	20 % (v/v)
H ₂ O	1000 ml	

2.3.5.2 Wet-Blot

Bei dieser Methode wurden ebenso wie beim Semi-Dry Blot Verfahren sechs Whatman-Filterpapiere und eine PVDF-Membran pro Gel genutzt. Die Filterpapiere wurden in einem speziellen Blotting-Puffer und die Membran zusätzlich kurz mit Methanol benetzt. Ebenfalls wurden noch zwei zur Apparatur gehörende Schaumstoffschwämme mit dem Puffer benetzt. Auf die Anode der Apparatur wurden nun der Reihe nach ein Schwamm, drei Filterpapiere, die Membran, das Gel, drei Filterpapiere und erneut ein Schwamm gelegt. Durch Ausstreichen mit einer Glaspipette wurde sichergestellt, dass keine Luftblasen den Kontakt zwischen Membran und Gel behinderten. Der Proteintransfer erfolgte auf Eis für 90 min bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA.

Tabelle 2-7: Wet- Blotting-Puffer

Tris	3,03 g	25 mM
Glycin	14,4 g	192 mM
Methanol	200 ml	20 % (v/v)
H ₂ O	1000 ml	

2.3.5.3 Ponceau Färbung der Membran

Zur Kontrolle, ob das Gel homogen auf die Membran transferiert und gleiche Mengen an Protein aufgetragen wurden, schwenkte man die PVDF-Membran für ca. 60 s in Ponceau-Lösung. Es zeigten sich bei erfolgreich transferiertem Protein deutliche Banden. Um die Färbung wieder zu entfernen, wurde PBST verwendet.

2.3.5.4 Immunfärbung

Die Membran wurde zunächst über Nacht bei 4 °C mit 5 % Milch/PBST geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Inkubation mit dem Erstantikörper in entsprechender Verdünnung (in 5 % Milch/PBST; siehe Tab.) erfolgte bei RT für mindestens 1 h oder über Nacht bei 4 °C. Gewaschen wurde je 3x 10 min mit 0,05 % PBST. Mit dem passenden Zweitantikörper folgte die Inkubation für mind. 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nachdem erneut 3x 10 min gewaschen wurde, konnte die Membran mit *Enhanced Chemoluminescence* (ECL) Detektionssystem für eine Minute benetzt und anschließend mit Hilfe des Cawomat 2000IR (Cawo) auf einem Autoradiographie- Film (Kodak Co., Rochester, NY) entwickelt werden. Die Expositionszeit variierte je nach Antikörper von drei Minuten bis sechs Stunden.

Tabelle 2-8: Antikörper Western Blot

Antikörper	Herkunft	Verdünnung
CXCR3	Monoklonal (Maus)	0,67 µg/ml
COX-1	Monoklonal (Maus)	1:1000
COX-2	Monoklonal (Maus)	1:1000
Cathepsin B	Monoklonal (Ratte)	0,5µg/l
GAPDH	Monoklonal (Maus)	1:10.000
β-Aktin	Monoklonal (Maus)	1:10.000
HRPOX IgG	Monoklonal (Maus)	1: 10.000

2.4 Statistische Auswertung

Die Experimente wurden mit Hilfe des Mann-Whitney Test ausgewertet. Statistische Signifikanz wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Konzentrationsabhängige Induktion der CXCR3-Liganden durch IFN- γ und TNF- α

Das erste Ziel war es, mittels IFN- γ und TNF- α eine Induktion der CXCR3-Liganden nachzuweisen, da diese beiden Zytokine auch in anderen Geweben die stärksten Induktoren der CXCR3-Liganden sind (Luster and Ravetch, 1987, Luster et al., 1985).

MCF-7 und MDA-MB 231 Brustkrebszellen wurden wie oben beschrieben in Kulturmedium gezüchtet und nach 24 h Kultivierung in serumfreien Medium mit Effektorsubstanzen stimuliert. Die Mammakarzinomzellen wurden in den unterschiedlichen Wells mit 2,5 ng/ml, 10 ng/ml und 50 ng/ml IFN- γ stimuliert. TNF- α wurde in den Konzentrationen 10 ng/ml und 50 ng/ml eingesetzt. Bei der kombinierten Stimulation wurden jeweils 10 ng/ml IFN- γ und TNF- α verwendet. Die Überstände der mit IFN- γ und TNF- α stimulierten Mammakarzinom-Zelllinien wurden nach 24 h geerntet und die Chemokinkonzentrationen im ELISA gemessen.

In den Kulturmedien nicht stimulierter Brustkrebszellen waren keine messbaren CXCL9- oder CXCL10-Konzentration festzustellen. In beiden Zelllinien konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der CXCL9- und CXCL10-Sekretion durch IFN- γ nachgewiesen werden. MDA-MB 231 Zellen zeigten bei Stimulation mit gleicher IFN- γ -Konzentration eine deutlich höhere CXCL9- und CXCL10-Sekretionen als MCF-7 Zellen (Abb. 3-1.).

Die alleinige Stimulation mit TNF- α (10 und 50 ng/ml) zeigte eine Induktion von CXCL10 in beiden Zelllinien, deutlich stärker jedoch in MCF-7 Zellen. Ein Anstieg der CXCL9-Konzentration war in beiden Zelllinien nicht detektierbar.

Da ein synergistischer Effekt von IFN- γ und TNF- α , unter anderem aufgrund der Erhöhung der Rezeptorzahl für TNF- α durch IFN- γ , aber auch aufgrund synergistisch wirkender Transkriptionsfaktoren bekannt ist (Ruggiero et al., 1986, Clarke et al., 2010), wurden die Zellen in einem weiteren Schritt mit beiden Effektorsubstanzen stimuliert.

Die kombinierte Stimulation mit IFN- γ und TNF- α bewirkte in beiden Mammakarzinomzelllinien eine synergistische Induktion der CXCR3-Liganden (siehe Abb.3-1). So erhöhte sich bei MCF-7 Zellen die CXCL9-Sekretion um das Achtfache und die CXCL10-Sekretion sogar um das 64-fache im Vergleich zur alleinigen IFN- γ -Stimulation. Bei MDA-MB 231 Zellen erhöhte sich die CXCL9-Ausschüttung um das Siebenfache und die CXCL10-Sekretion um das Dreifache.

Da IFN- γ der stärkste bisher bekannte Induktor der CXCR3-Liganden ist und sich seine Präsenz auch in humanem Brustkrebsgewebe nachweisen lässt, wurde IFN- γ bei allen weiteren Stimulationsexperimenten als primärer Stimulus verwendet, auch vor dem Hintergrund, dass alle in Tiermodellen beschriebenen CXCR3-Ligandeneffekte IFN- γ -abhängig waren (Gorbachev et al., 2007, Pan et al., 2006, Walser et al., 2007).

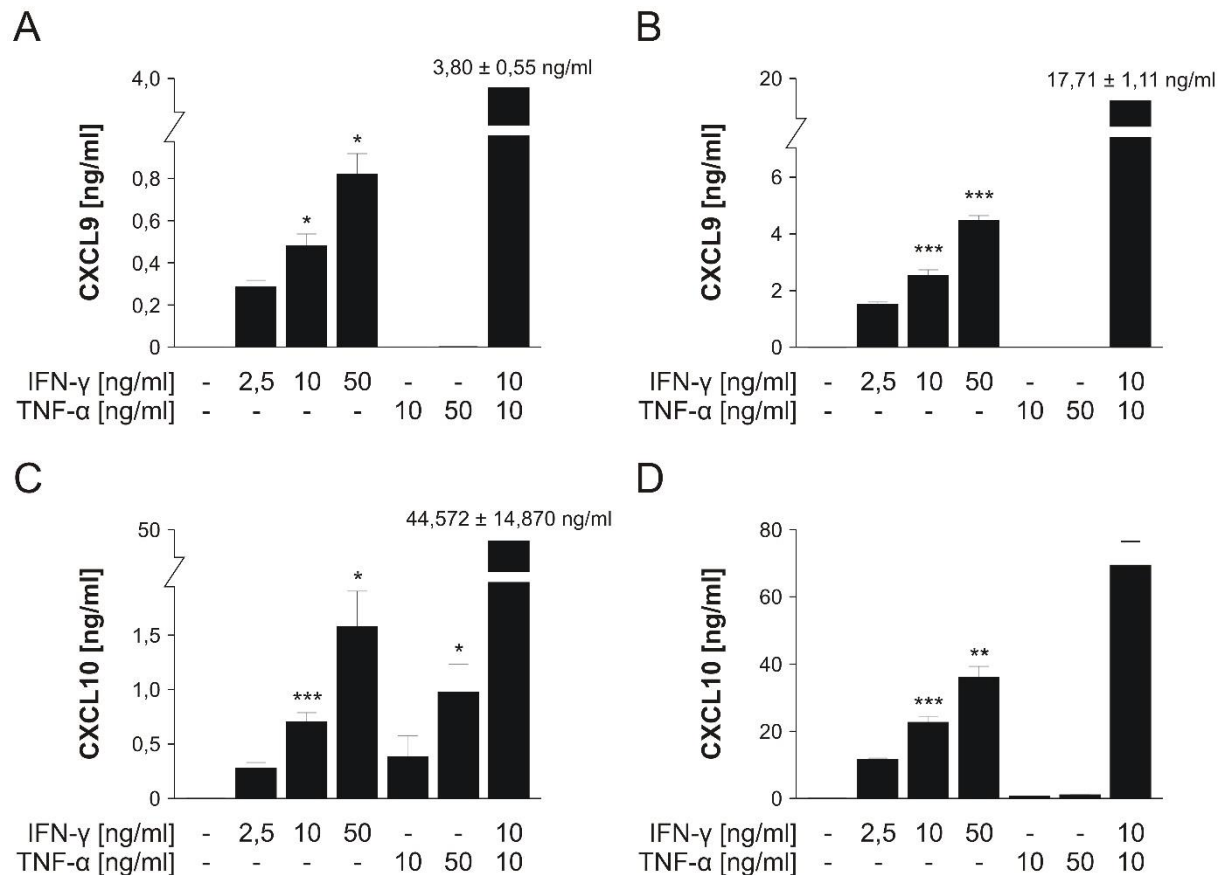


Abbildung 3-1: A+C zeigen den Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf MCF-7 Zellen; B+D auf MDA-MB 231 Zellen

3.2 Supprimierung der CXCL9- und CXCL10-Sekretion durch PGE₂

Prostaglandin E₂ (PGE₂) ist das Hauptprodukt der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Tumorzellen (Dannenberg and Subbaramaiah, 2003). Im Brustkrebsmausmodell konnte gezeigt werden, dass COX-2-Inhibitoren die Rekrutierung von NK-Zellen steigern und die Metastasierungsraten senken können (Fulton et al., 2006, Ristimaki et al., 2002, Lala et al., 1986, Walker and Rotondo, 2004). Es sollte daher getestet werden, ob PGE₂ die CXCR3-Ligandensekretion aus Brustkrebszellen vermindern kann. Dies könnte auch als Erklärung für die geringere Lymphozyteninfiltration in COX-2-überexprimierenden Mammakarzinomen dienen.

Ausgehend hiervon wurde zunächst die Auswirkung von Prostaglandin E₂ auf die IFN- γ -vermittelte CXCR3-Ligandensekretion von MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen *in vitro* untersucht. Die Zellen wurden 30 min vor der INF- γ -Stimulation mit 10 μ M PGE₂ stimuliert. Die Bestimmung von CXCL9 und CXCL10 im Zellüberstand erfolgte mittels ELISA. Bei den

MCF-7 Zellen wurde 50 ng/ml und bei den MDA-MB 231 Zellen 2,5 ng/ml INF- γ verwendet, da bei dieser Konzentration in den Vorversuchen die beste Detektierbarkeit der Chemokine im jeweiligen ELISA-Messbereich nachgewiesen werden konnte. Die Überstände wurden 24 h nach Auftragen der Stimulatoren geerntet. Es zeigte sich eine signifikante Supprimierung der CXCL9- und CXCL10-Konzentrationen in den Zellüberständen der MCF-7 Zellen nach PGE₂-Stimulation (Abb. 3-2; A).

Bei den MDA-MB 231 Zellen war diese Supprimierung weniger stark ausgeprägt, es zeigte sich lediglich eine signifikant reduzierte CXCL9-Konzentration, bei CXCL10 war jedoch zumindest ein Trend in diese Richtung zuerkennen (Abb. 3-2; B).

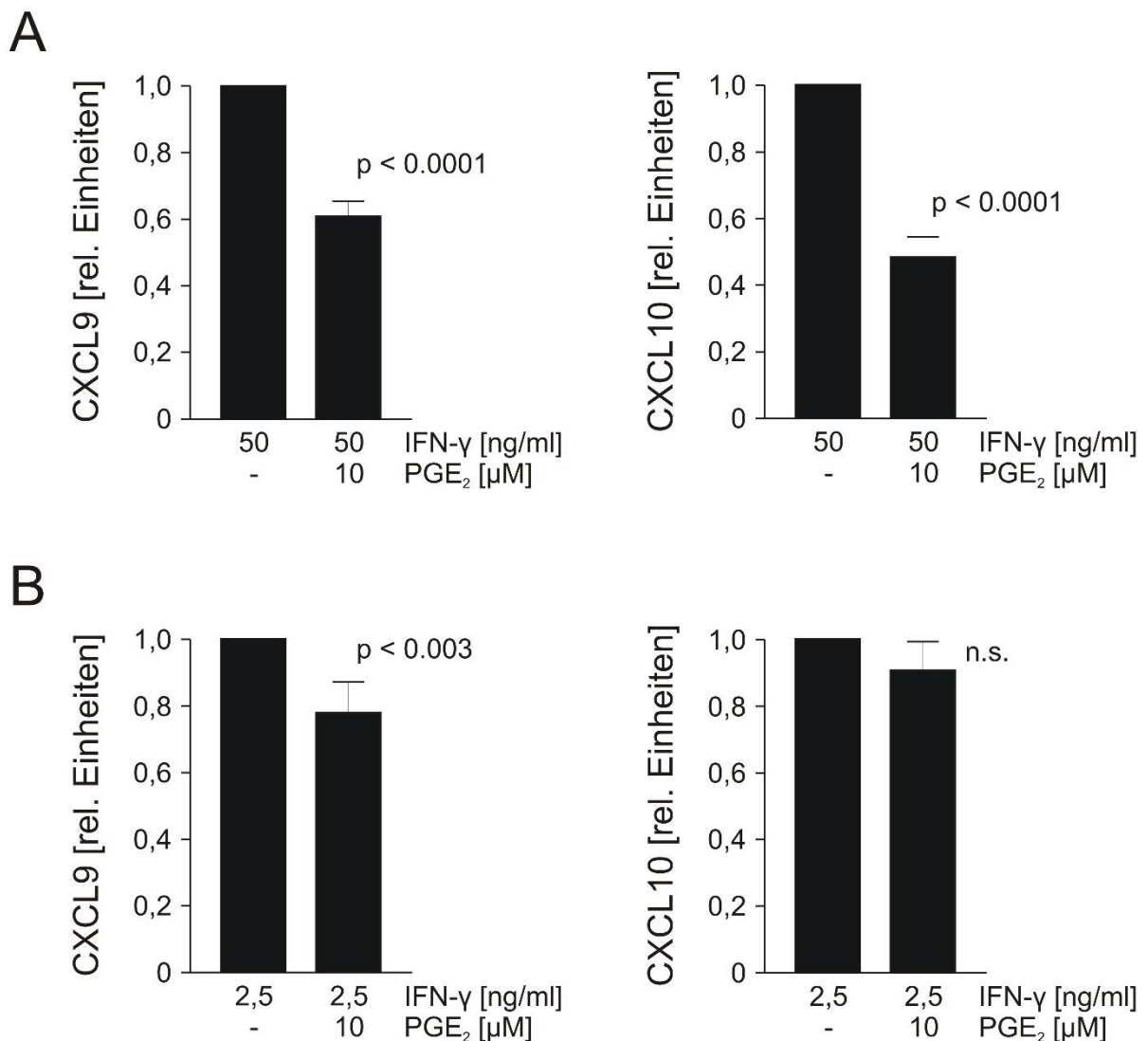


Abbildung 3-2: A zeigt den Einfluss von PGE₂ auf MCF-7 Zellen, B auf MDA-MB 231 Zellen

3.3 Einfluss von Cyclooxygenase-Inhibitoren auf die CXCL9- und CXCL10-Sekretion aus Brustkrebszellen

Da bewiesen werden konnte, dass PGE₂ die CXCR3-Ligandenexpression supprimiert, sollte nun im nächsten Schritt die PGE₂-Produktion gehemmt werden. Ziel war eine Induktion der

CXCR3-Liganden, was durch die Hemmung der Cyclooxygenase erreicht werden sollte. Die Cyclooxygenasen, auch als Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen bezeichnet, waren sowohl in den MCF-7 als auch in den MDA-MB 231 Zellen mit verschieden starker Expression der Unterformen COX-1 und COX-2 nachgewiesen worden (Liu and Rose, 1996). Mittels Westernblot konnte in den MCF-7 Zellen nur die COX-2 nachgewiesen werden, während die MBA-MB 231 Zellen beide Isoenzyme exprimierten (Abb. 3-3).

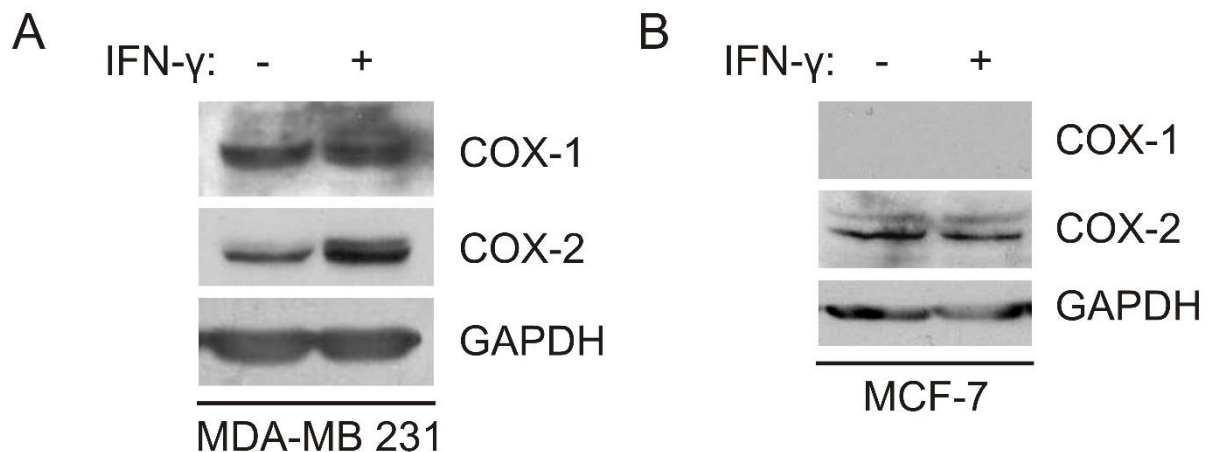


Abbildung 3-3: COX-Expression in Mammakarzinom-Zelllinien

Selektive und unselektive COX-Inhibitoren, auch NSAR (nicht steroidale Antirheumatika) genannt, hemmen die Prostaglandinsynthese und wirken somit unter anderem antiphlogistisch. Unter Berücksichtigung der vorangegangenen Ergebnisse wurde versucht, die CXCR3-Ligandensekretion durch Hemmung der Prostaglandin-Synthese mittels COX-Inhibitoren zu erhöhen.

Hierzu wurden Indometacin, ein Indolessigsäurederivat, und Acetylsalicylsäure (ASS) als unselektive COX-Inhibitoren verwendet. Als selektiver COX-2-Hemmer wurde Celecoxib genutzt, der einzige bisher in klinischen Studien beim Mammakarzinom eingesetzte COX-Inhibitor (Falandry et al., 2009a, Young et al., 2012, Meric et al., 2006).

3.3.1 Indometacin

Die Gabe von Indometacin (10 μ M und 30 μ M) in das Medium der in Wells ausgesäten MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen erfolgte 30 min bevor das IFN- γ zugefügt wurde. Bei den MCF-7 Zellen zeigte sich bereits ab 10 μ M Indometacin ein signifikanter Anstieg der IFN- γ -vermittelten CXCL9-Sekretion um das 1,6-fache, der sich bei einer Indometacin-Konzentration von 30 μ M verdoppelte. Die Messung der CXCL10-Konzentrationen nach Stimulation mit 10 und 30 μ M lagen erst bei 30 μ M im signifikanten Bereich und erreichten hier eine Erhöhung um das 2,5-fache im Vergleich mit der alleinigen IFN- γ -Stimulation (50 ng/ml) (Abb. 3-4).

Bei den MDA-MB 231 Zellen konnte man im Hinblick auf die CXCL9-Konzentration ebenfalls eine konzentrationsabhängige Stimulation feststellen. Die Gabe von 10 μM führte zu einer 1,3-fachen, die Gabe von 30 μM zu einer 1,6-fachen Konzentrationserhöhung im Überstand der Zellen nach 24 h. Die CXCL10-Konzentration erhöhte sich bei den MDA-MB 231 Zellen um das 2,1- und Zweifache (Abb. 3-5).

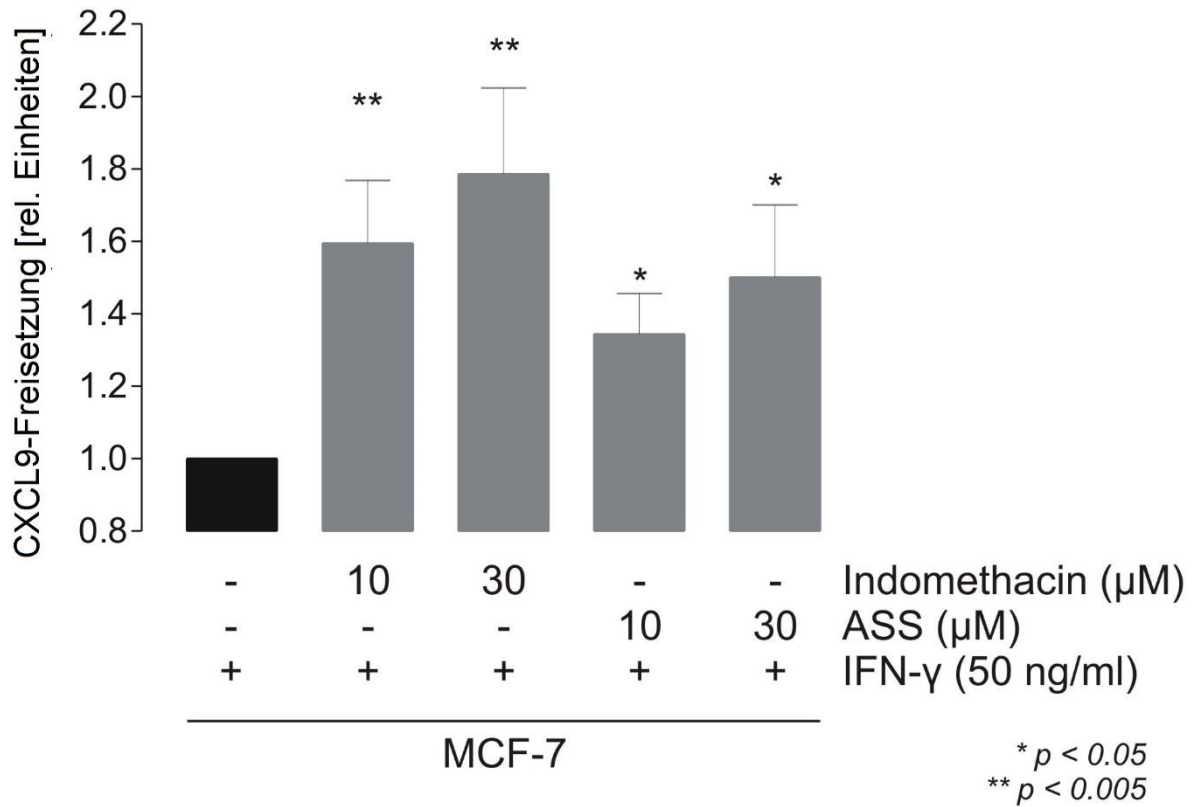


Abbildung 3-4: Stimulation der MCF-7 Zellen mit ASS und Indomethacin

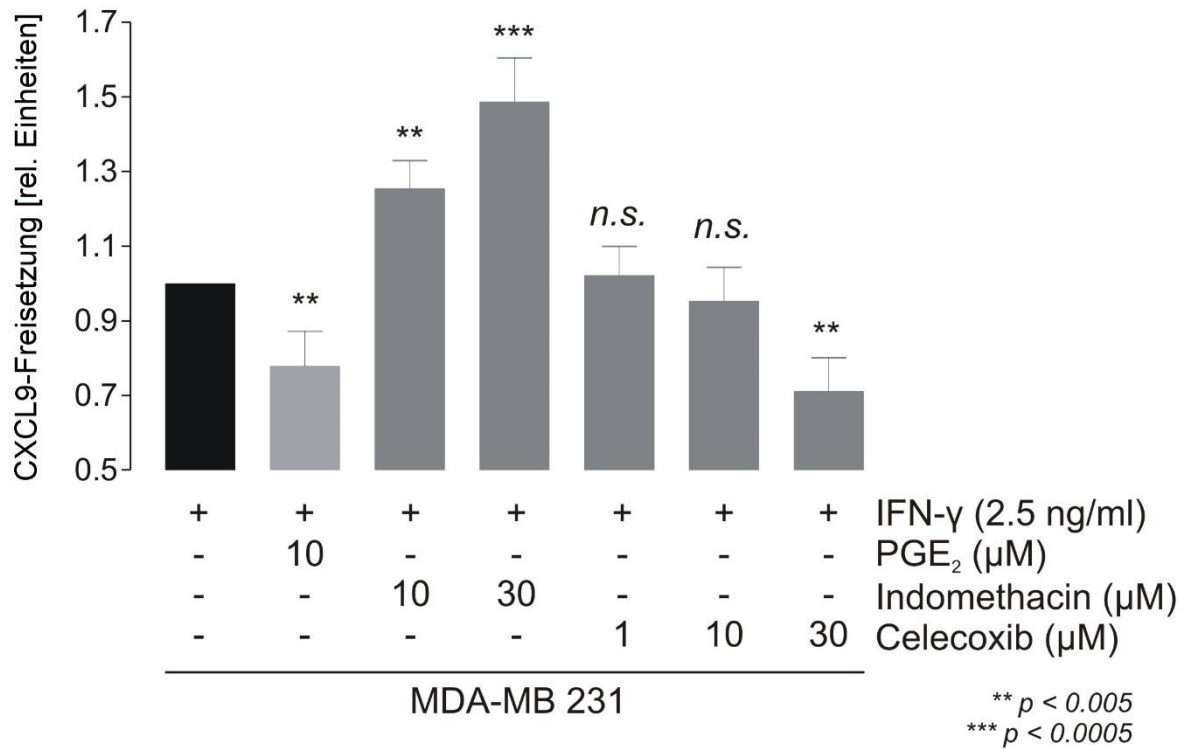


Abbildung 3-5: Stimulation der MDA-MB 231 Zellen mit ASS, PGE₂, Celecoxib und Indomethacin

3.3.2 Acetylsalicylsäure (ASS)

ASS (10 μM und 30 μM) wurde jeweils 30 min vor der Stimulation mit IFN-γ auf die Zellen gegeben. In den 24 h später geernteten Überständen konnte bei MCF-7 Zellen eine signifikante CXCL9-Konzentrationserhöhung mittels ELISA detektiert werden. Die CXCL10-Expression stieg ebenfalls signifikant (Abb. 3-6; A+B).

Bei den MDA-MB 231 Zellen zeigte sich ebenso eine signifikante Erhöhung der beiden Chemokine. Insgesamt fiel der Anstieg von CXCL10 bei beiden Zelllinien höher aus, als der CXCL9-Anstieg (Abb. 3-6; C+D).

Insbesondere im Hinblick auf CXCL10 scheint ASS im Vergleich mit Indomethacin einen deutlich induktiveren Effekt auf die Sekretion zu haben.

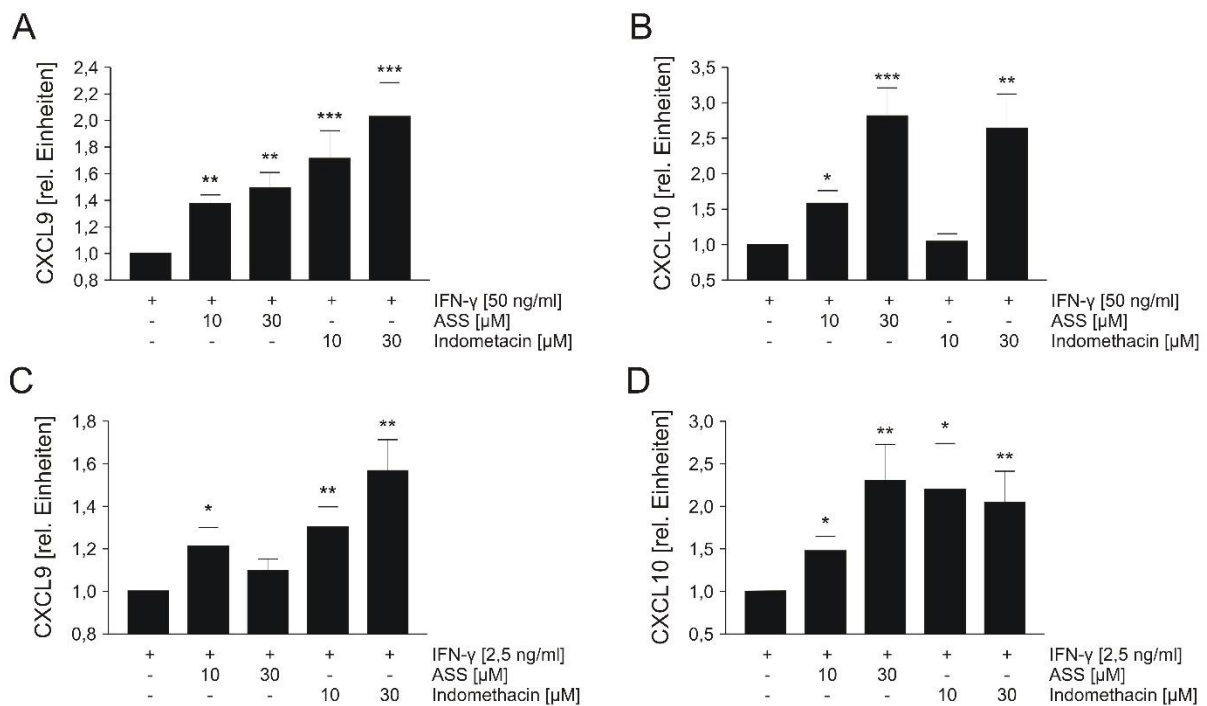


Abbildung 3-6: A+B zeigen den Einfluss von ASS und Indometacin auf MCF-7 Zellen; C+D auf MDA-MB 231 Zellen

3.3.3 Celecoxib

Der COX-2-selektive Inhibitor Celecoxib zeigte unterschiedliche Effekte auf die Chemokinsekretion. Es wurde mit 0,1 μM, 1,0 μM, 10 μM und 30 μM Celecoxib stimuliert, je 30 min vor Hinzufügen von IFN-γ.

Der erwartete CXCL9-Anstieg wurde in beiden Zelllinien jedoch nur bei Gabe von niedrigen Dosierungen des Celecoxib beobachtet. Hier zeigte sich bei den MCF-7 Zellen nach Gabe von 0,1 μM Celecoxib eine 1,7-fache, bei den MDA-MB 231 Zellen nach Gabe von 1,0 μM Celecoxib sogar eine 2,7-fache Erhöhung der CXCL9-Konzentrationen. Mit Steigerung der Dosierungen von Celecoxib, war eine Abnahme und bei 30 μM sogar eine 0,7-fache Supprimierung der CXCL9-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen (Abb. 3-7). Dies zeigte sich in beiden Zelllinien.

Hinsichtlich der CXCL10-Konzentrationen zeigte sich in den beiden Zelllinien ein unterschiedliches Ansprechen auf Celecoxib. Bei den MDA-MB 231 Zellen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Erhöhung der gemessenen CXCL10-Konzentrationen. Bei den MCF-7 Zellen zeigte sich, ähnlich wie bei der Messung der CXCL9-Konzentrationen, eine Abnahme bei Verwendung von hohen Celecoxib-Konzentrationen (>1,0 μM).

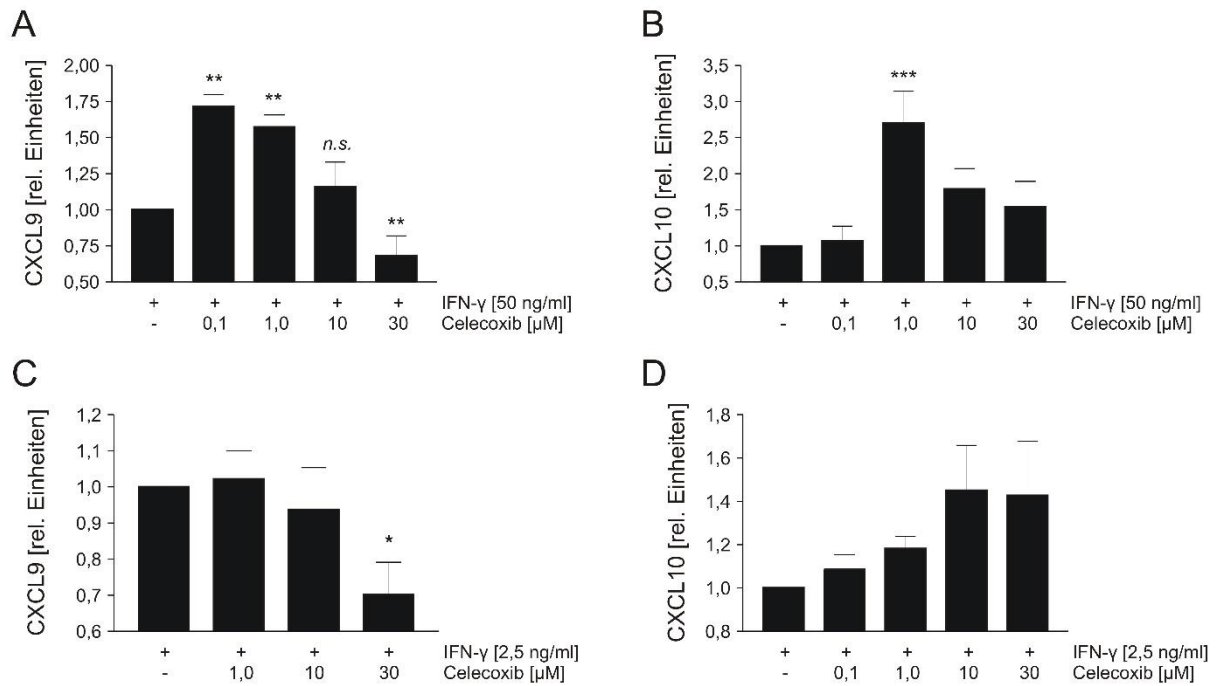


Abbildung 3-7: A+B zeigen den Einfluss von Celecoxib auf MCF-7 Zellen; C+D auf MDA-MB 231 Zellen

3.4 Einfluss der Stimulationen auf die Zellviabilität der verwendeten Brustkrebszelllinien

Um auszuschließen, dass die Supprimierung der CXCL9- oder CXCL10-Konzentration durch PGE₂ und höheren Dosen von COX-Inhibitoren auf Zytotoxizität und daraus folgendem Zelluntergang zurückzuführen ist, führten wir MTT-Tests durch (siehe Material und Methoden). Die Auswertung der in 96-Well Platten stimulierten und mit MTT-Reagenz versetzten MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen erfolgte nach 24 und 48 h. Weder nach Stimulation mit PGE₂, noch nach Stimulation mit COX-Inhibitoren zeigte sich eine signifikante Veränderung der Zellviabilität (Abb. 3-8). Somit sind unterschiedliche Proliferationsraten unter Einfluss von PGE₂ oder COX-Inhibitoren nicht verantwortlich für Veränderungen der CXCL9- oder CXCL10-Sekretion aus Brustkrebszellen.

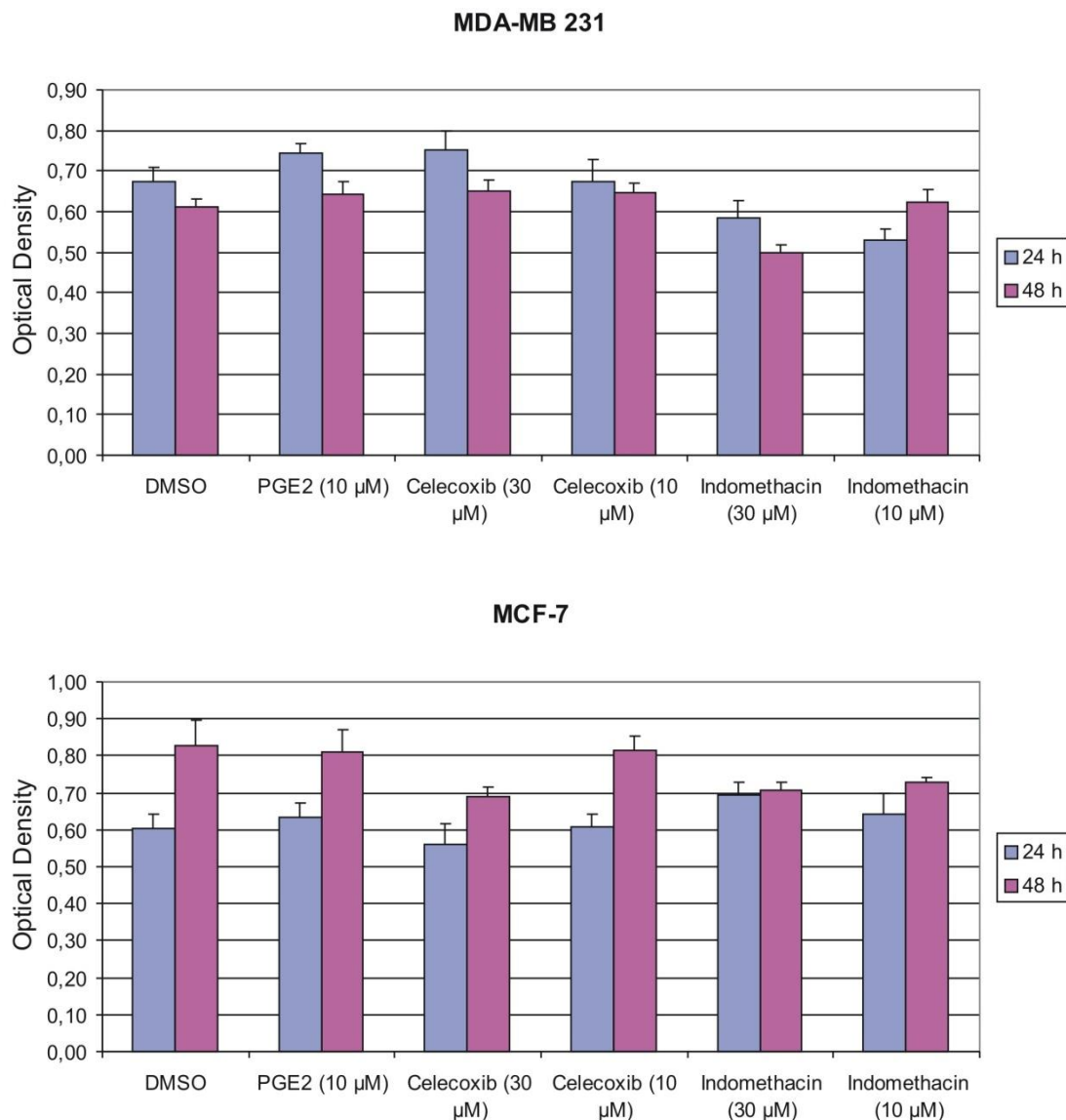


Abbildung 3-8: MTT- Test

3.5 Effekte der Stimulation mit Prolaktin

Prolaktin ist ein aus 194 Aminosäuren bestehendes neuroendokrines Hormon der Hypophyse mit einer Molekülmasse von 23,5 kDa. Als Protein der Zytokin- Superfamilie spielt es eine wichtige Rolle im Rahmen unterschiedlicher Zellfunktionen, wie Proliferation, Differenzierung und immunologischen Regulationen, insbesondere im Reproduktionssystem (Ben-Jonathan et al., 1996). Des Weiteren bewirkt Prolaktin eine schwangerschafts-assoziierte Umwandlung von Epithelzellen der Milchdrüsen im Rahmen der Laktation.

Da CXCR3-Liganden in der Muttermilch nachgewiesen werden konnten (Takahata et al., 2003), wo sie vermutlich das kindliche intestinale Immunsystem aktivieren, sollte getestet

werden, ob die Fähigkeit zur möglicherweise Prolaktin induzierten CXCL9/10-Sekretion auch in Mammakarzinomzellen erhalten bleibt.

Prolaktin führt zu einer Hochregulation von IFN- γ *in vitro* (Sodhi and Tripathi, 2008). In menschlichen Keratinozyten konnten Kanda et al. beobachten, dass Prolaktin über eine Erhöhung der IFN- γ -Produktion zu einer Stimulation der CXCL9- und CXCL10-Sekretion führt, bedingt durch eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und NF- κ B (Kanda and Watanabe, 2007). Andererseits zeigten genetisch veränderte Mäuse, die eine Überexpression von Prolaktin in Mammaepithelzellen aufwiesen, ein deutlich erhöhtes Risiko, Mamma-Tumoren zu entwickeln (Wennbo et al., 1997, Rose-Hellekant et al., 2003). Zu diesem Zweck wurden die MCF-7 und die MDA-MB 231 Zellen mit Prolaktin und IFN- γ stimuliert. Der erwartete Anstieg der CXCL9- und CXCL10-Konzentrationen im Überstand von MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen konnte jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

3.6 Nachweis von Cyclooxygenasen und CXCL9 in Tumorproben von Patientinnen mit Brustkrebs

Um weitere Hinweise darauf zu finden, dass die Regulation von CXCL9 durch Cyclooxygenasen auch *in vivo* von Bedeutung sein könnte, wurde zunächst mittels Westernblot-Analyse die COX-1- und COX-2-Expression in 46 Tumorproben bestimmt, da die Messung von PGE₂ direkt nicht möglich ist. Hierbei wurde der monoklonale COX-1-Antikörper und der monoklonale COX-2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet (siehe Tabelle 2-8). Beide Antikörper detektierten Banden bei etwa 72 kDa, was gut zu den beschriebenen Gewichten beider Isoenzyme passt. Es zeigten sich deutlich Unterschiede der Stärke der COX-Expression bei den verschiedenen Tumorproben (Abbildung 3-9). Die Proben wurden daraufhin in Gruppen mit hoher und mit niedriger Expression eingeteilt: Für die COX-2 wurde die Kohorte entsprechend der Daten von Soslow et al. eingeteilt, wonach 65 % der Mammakarzinome COX-2 überexprimieren (Soslow et al., 2000), während es für COX-1 keine solche Einteilung gab, so dass die Proben entsprechend der Expression in etwa halbiert wurden.

Zusätzlich wurden die Extrakte mittels ELISA hinsichtlich ihrer CXCL9-Konzentration untersucht. Diese wurde auf die Gesamtproteinkonzentration in den jeweiligen Extrakten bezogen. Die relativen CXCL9-Konzentrationen lagen dabei zwischen 0,01 und 16,8 pg/ μ g Gesamtprotein. Stark COX-1 exprimierende Tumoren zeigten tendenziell reduzierte CXCL9-Konzentrationen (87,8 % \pm 13,4 %, n=43). Im Hinblick auf COX-2 fand sich der

vermutete inverse Zusammenhang deutlicher: So war die CXCL9-Konzentration bei der Gruppe mit hoher COX-2-Expression nur halb so hoch wie in der Gruppe mit niedriger Expression ($56,5 \% \pm 13,9 \%$, $n = 29$, $p < 0,026$), (Abb. 3-9).

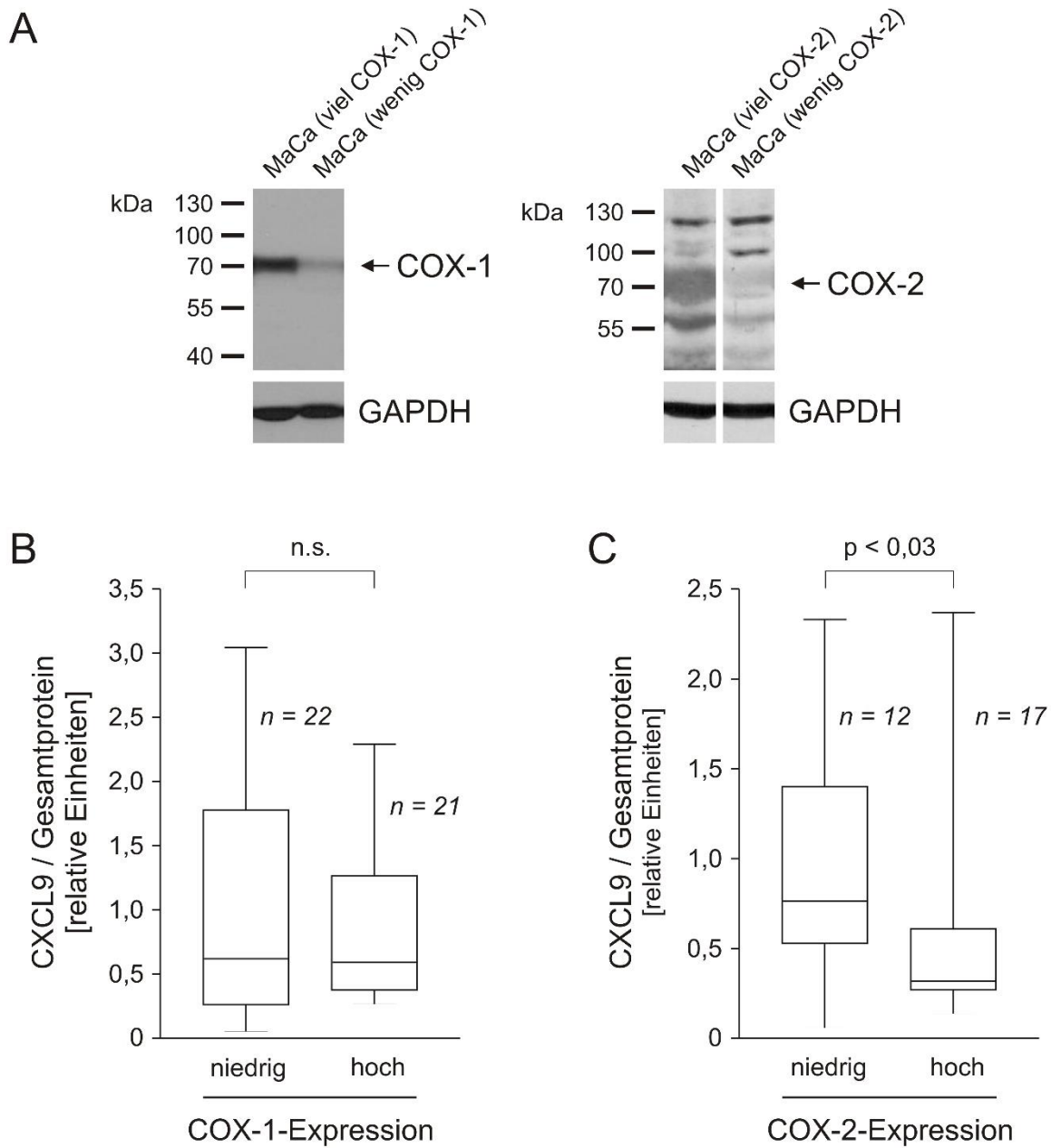


Abbildung 3-9: Korrelation von COX und CXCL9

3.7 CXCR3-Rezeptorennachweis in Zelllinien und Tumorproben

Mittels Westernblot-Analysen konnte sowohl in den MCF-7 als auch in MDA-MB 231 Zellen das Vorhandensein beider CXCR3-Splicevarianten (A und B) nachgewiesen werden. Es zeigte

sich eine typische Doppelbande, welche die Splicevarianten CXCR3-A und CXCR3-B bei etwa 55 kDa darstellt.

3.8 Cathepsin B

Cathepsin B ist eine lysosomale Cystein-Protease, die eine Rolle beim Umbau von Proteinen innehat. Auch scheint sie im Rahmen von tumorbiologischen Vorgängen und Metastasierung beteiligt zu sein. So wird Cathepsin B bei malignen Tumoren und deren Vorstufen stark überexprimiert (Roshy et al., 2003, Berquin and Sloane, 1996). Die Aktivierung von Cathepsin B auf Zelloberflächen führt zu nachfolgender Aktivierung und Regulation von proteolytischen Kaskaden (Podgorski and Sloane, 2003). Im Mammakarzinom konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits in den 90er Jahren gezeigt werden, dass eine Überexpression von Cathepsin B mit einem verschlechterten Überleben bei Mammakarzinompatientinnen einhergeht (Thomssen et al., 1995).

Als Grundlage für weiterführende Studien sollte getestet werden, ob Cathepsin B durch CXCR3-Chemokine induzierbar ist, so wie es für andere Proteasen gezeigt wurde (Zipin-Roitman et al., 2007). Im Rahmen eines negativen Feedback Mechanismus können Proteasen, wie z.B. MMP-9, MMP-13 oder Cathepsin B die Chemokine wieder spalten, was mittlerweile für Cathepsin B bestätigt wurde (Repnik et al., 2015).

Um diese Regulation nachzuweisen wurden die Mammakarzinomzellen zunächst mit CXCL9 und CXCL10 stimuliert, anschließend wurde mittels Westernblot-Analyse die Cathepsin B-Expression gemessen. Als Erstantikörper wurde Cathepsin B in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Sowohl bei den stimulierten MCF-7 Zellen, als auch bei den MDA-MB 231 Zellen zeigten sich deutliche Cathepsin-typische Banden bei 35 kDa, und eine Induktion durch CXCL9 und CXCL10 konnte somit bestätigt werden (Abb. 3-10).

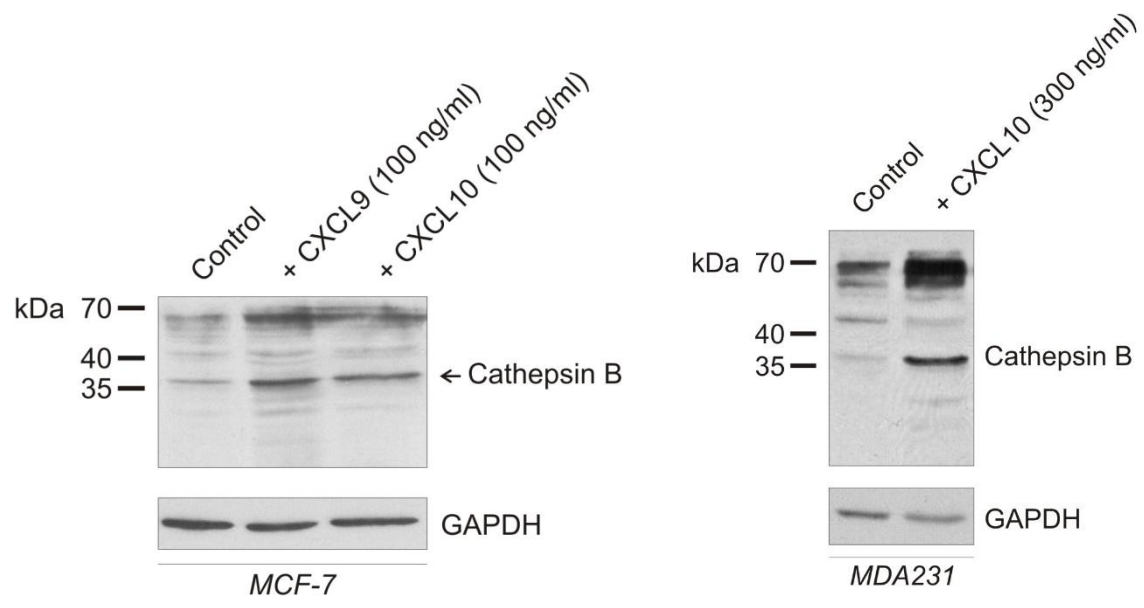


Abbildung 3-10: Induktion von Cathepsin B durch CXCL9 und CXCL10

4. Diskussion

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) ein wichtiger Prognosefaktor beim Mammakarzinom sind. Diese TILs sind nicht nur wichtig für die körpereigene Tumorabwehr per se, sondern haben auch als Effektorzellen aller bislang getesteter Immuntherapien eine wesentliche Bedeutung. Trastuzumab beispielsweise, ein monoklonaler Antikörper gegen den HER2-Rezeptor, welcher in der Behandlung des HER2-positiven Mammakarzinoms zum Einsatz kommt, markiert die Tumorzellen so, dass das körpereigene Immunsystem diese angreifen und zerstören kann (Kohrt et al., 2012, Stagg et al., 2011). Dieser Mechanismus ist bekannt als Antikörper abhängige Zelltoxizität (ADCC). Wesentliche tumorsuppressive Lymphozytenpopulationen, wie CD8-positive T-Zellen oder natürliche Killerzellen, werden über den CXCR3-Rezeptor und seine Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 in solide Tumoren rekrutiert (Chen and Mellman, 2013, Wendel et al., 2008). Entsprechend korreliert die intratumorale Expression dieser CXCR3-Chemokine mit einem erhöhten lymphozytären Infiltrat und einem verlängerten Überleben der Patientinnen (Denkert et al., 2010, Denkert et al., 2015, Specht et al., 2009b, Hilborn et al., 2014). Auch in syngenem Mammakarzinom-Mausmodellen geht eine Überexpression von murinem CXCL9 in den Tumorzellen mit vermindertem Tumorstadium und Reduktion pulmonaler Metastasen einher (Walser et al., 2007).

Daher erscheint die Hochregulation dieser Chemokine eine mögliche therapeutische Option für die Behandlung von Krebserkrankungen zu sein (Abastado, 2012). Allerdings ist bisher wenig über die Regulation dieser Chemokine im Mammakarzinom bekannt. Diese Arbeit legt Grundlagen hinsichtlich der Funktion und Regulation von Chemokinen in humanen Mammakarzinomzellen.

4.1 Induktion der CXCR3-Liganden durch IFN- γ und TNF- α

Da IFN- γ der stärkste bislang bekannte Induktor von CXCR3-Liganden ist (Rotondi et al., 2005, Kaur et al., 2008, Luster and Ravetch, 1987, Groom and Luster, 2011) und in ausreichenden Konzentrationen in Mammakarzinomen zu finden ist (Muller et al., 2001), wurde als Erstes die konzentrationsabhängige Induktion der Chemokine in den beiden Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB 231 untersucht. Durch die Gabe steigender Konzentrationen von IFN- γ in das Zellmedium konnte bei beiden Zelllinien ein signifikanter, konzentrationsabhängiger Anstieg der CXCR3-Ligandensynthese mittels ELISA nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen an anderen Zelltypen. Antonelli et al. zeigten beispielsweise in verschiedenen Studien eine IFN- γ -induzierbare Rolle dieser Chemokine im Rahmen der endokrinen Orbitopathie und verschiedenen daran beteiligten Zellarten (Antonelli et al., 2006a, Antonelli et al., 2006b). Grundlegende Untersuchungen an Lungengeweben ergaben ebenfalls eine CXC-Chemokininduktion durch INF- γ (Neville et al., 1997). Auch in Kolonkarzinomzellen kann CXCL10 durch IFN- γ induziert werden (Zipin-Roitman et al., 2007). Wenzel et al. konnten am Beispiel vom Plattenepithelkarzinom des Ösophagus bestätigen, dass eine durch INF- γ regulierte CXCR3-Ligandenexpression, eine wichtige Rolle im Bereich der Tumorimmunantwort spielt (Wenzel et al., 2008).

TNF- α , ein multifunktionelles Zytokin, welches in der Lage, ist andere Zytokine zu aktivieren und eine wichtige Bedeutung im Rahmen von Entzündungsreaktionen hat, wurde ebenfalls auf seine Wirkung in Bezug auf die CXC-Chemokine untersucht. Ähnlich wie IFN- γ ist es ein bekannter Induktor von CXCR3-Chemokinen (Groom and Luster, 2011). In den Untersuchungen konnte TNF- α alleine lediglich CXCL10, nicht jedoch CXCL9 induzieren. Dieser Effekt war deutlich stärker in MCF-7 als in MDA-MB 231 Zellen.

Diese Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit entsprechenden Daten an menschlichen Eosinophilen und kornealen Keratinozyten (Liu et al., 2007, McInnis et al., 2005). Als mögliche Ursache können die unterschiedlichen Signalwege herangezogen werden: So ist der Signalweg von TNF- α direkt von NF- κ B, der IFN- γ -Signalweg zusätzlich von JAK/STAT-1 α abhängig. Die IFN- γ -vermittelte Induktion von CXCR3-Liganden setzt einen intakten NF- κ B-Signalweg voraus. In diesem Zusammenhang konnte verdeutlicht werden, dass ein konstitutives Level von NF- κ B notwendig für die IFN- γ -induzierte Expression von CXCL9 und CXCL10 ist (Clarke et al., 2010, Hiroi and Ohmori, 2003). Letztlich scheint der alleinige TNF- α -Weg nicht ausreichend für eine detektierbare CXCL9-Sekretion zu sein.

Obwohl TNF- α auf die CXCL9-Sekretion keinen Einfluss hatte, zeigte sich ein deutlich synergistischer Effekt von IFN- γ und TNF- α , wie es auch aus anderen Geweben bekannt ist (Antonelli et al., 2006b, Clarke et al., 2010, Majumder et al., 1998, Narumi et al., 2000). Zurückzuführen ist dieses Ergebnis auf die Effekte der durch IFN- γ aktivierten JAK2/STAT-1 α und der durch TNF- α aktivierten NF- κ B-Transkriptionsfaktoren, welche in Kombination über das CREB-Bindungsprotein (CBP) und die damit verbundene Erhöhung der RNA-Polymerase II, synergistische Wirkungen aufweisen und zu einer erhöhten Transkription von *CXCL10* führen (Clarke et al., 2010).

Die Gabe von IFN- γ bewirkt eine verbesserte Sensitivität der Zellen für Antiöstrogene, die durch den durch IFN- γ stimulierten *Interferon regulatory factor 1* (IRF-1) reguliert wird. Dieser

ist ein tumorsuppressiver Faktor, der das Ansprechen von Antiöstrogenen verbessert (Ning et al., 2010). Inwieweit die Hochregulation von CXCR3- Liganden durch das IFN- γ hierbei eine zusätzliche Rolle spielt, ist noch unklar. Es wäre jedoch durchaus denkbar, dass CXC-Chemokine in Kombination mit IRF-1 Tumorwachstum hemmen, tumorsuppressiv und angiostatisch wirken, vor allem da die IRF-1-Expression ebenfalls über den JAK/STAT-Signalweg reguliert wird.

Für alle weiteren Regulationsexperimente wurde in dieser Arbeit IFN- γ verwendet, um gewissermaßen eine Basissekretion in Tumoren zu simulieren. Einerseits geschah dies in dem Bewusstsein, dass IFN- γ in Mammakarzinomen vorhanden ist und einer der stärksten Induktoren der CXCR3-Liganden ist. Andererseits zeigten die Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe von Amy Fulton, dass der tumorsuppressive Effekt von COX-Inhibitoren im syngenem Mausmodell maßgeblich von IFN- γ abhängig ist (Kundu et al., 2005).

Auch andere Arbeiten belegen die Bedeutung von IFN- γ für das intratumorale Immunmilieu. Eine Studie von Wendel et. al. suchte Faktoren, welche eine intratumorale NK-Zellakkumulation herbeiführen können. Es zeigte sich bei IFN- γ -*Knockout*-Mäusen deutlich weniger NK-Zellinfiltration in das Tumorgewebe als in der Vergleichsgruppe (Wendel et al., 2008). Kumulativ ergab sich hier schließlich ein schlechteres Überleben im Vergleich zum Wildtyp. Wurden die Tumorzellen hingegen mit IFN- γ transfiziert, folgte eine Erhöhung der CXCR3-Ligandenexpression und somit eine NK-Zellakkumulation im Tumor. Diese korrelierte wiederum mit einem verlängerten Überleben. Somit wird auch hier die Notwendigkeit des Vorhandenseins von IFN- γ zur Bildung von CXCL9 und CXCL10 im Tumormikromilieu unterstrichen.

4.2 Einfluss von PGE₂ auf die CXCR3-Ligandensekretion

Cyclooxygenasen sind seit den 70er Jahren eine vorgeschlagene tumortherapeutische Zielstruktur, und Prostaglandin E₂ (PGE₂) ist das metabolische Hauptprodukt dieser Enzyme (Dannenberg and Subbaramaiah, 2003). Insbesondere beim Mammakarzinom scheint die COX- Inhibition eine therapeutische Möglichkeit darzustellen: In der prospektiven WHO-Studie wurde eine Verminderung des Brustkrebsrisikos nach Einnahme von nicht-steroidalen antientzündlichen Substanzen (NSAIDs), insbesondere bei Ibuprofen nachgewiesen (Harris et al., 2003). In der *Nurses' Health Study* zeigte sich eine signifikante Verringerung des Sterberisikos nach Brustkrebs nach Einnahme von ASS (Holmes et al., 2010). Grundlagenwissenschaftliche Arbeiten lassen vermuten, dass diese klinischen Beobachtungen

immunologische Gründe haben. Die Gruppe um Fulton konnte einen tumorsuppressiven Effekt durch COX-1- und COX-2-Inhibition in syngenem Mausmodellen beobachten (Kundu et al., 2001, Kundu and Fulton, 2002), ein Effekt, der im Falle des lokalen Tumorwachstums von CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen und im Falle der Metastasierung von NK-Zellen und IFN- γ abhängig ist (Kundu et al., 2005). Verschiedene Mausmodelle in anderen Karzinomen bestätigen diese Ergebnisse und zeigen, dass COX-Inhibition die Wirksamkeit von Vakzinierungsstrategien und die Reduktion von Tumorwachstum bedingen, ausgelöst durch eine vermehrte Rekrutierung von Th1-Lymphozyten (Fujita et al., 2011, Sharma et al., 2005a, Sharma et al., 2005b, Haas et al., 2006).

Andere Studien konnten zeigen, dass Prostaglandine verschiedene inhibitorische Effekte auf die Aktivität natürlicher Killerzellen aufweisen und somit Tumorwachstum unterstützen, da durch die Inhibition der NK-Zellen ein wichtiger Faktor der körpereigenen Abwehr gegen Tumorzellen verloren geht (Brunda et al., 1980, Bankhurst, 1982).

Da die PGE₂-Synthese durch COX-Inhibitoren gehemmt wird, sollte in dieser Arbeit zunächst dargestellt werden, dass PGE₂ tatsächlich einen hemmenden Effekt auf die Expression der CXCR3-Liganden ausübt. Dazu wurden die Zellen mit 10 μ M PGE₂ stimuliert, 30 min später wurden jeweils 50 ng/ml IFN- γ bei MCF-7 Zellen oder 2,5 ng/ml IFN- γ bei MDA-MB 231 Zellen hinzugefügt. Bei den MCF-7 Zellen resultierte eine Reduktion der CXCL9- und CXCL10-Konzentrationen um das 1,6- bzw. Zweifache im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IFN- γ . Bei den MDA-MB 231 Zellen war diese Supprimierung weniger ausgeprägt. Diese Ergebnisse beweisen, dass PGE₂ die Sekretion von CXCL9 und CXCL10 hemmen kann. Dieser Effekt war zuvor nur in humanen Keratinozyten und dendritischen Zellen, nicht jedoch in Tumorzellen, gezeigt worden (Kanda and Watanabe, 2002, McIlroy et al., 2006, Kanda et al., 2004).

Diese Beobachtung schafft nun eine mechanistische Verbindung zwischen der beschriebenen COX-Überexpression und einem verminderten lymphozytären Infiltrat, wie es in vielen soliden Karzinomen beschrieben wurde (Liu et al., 2009, Sharma et al., 2005b). Dies könnte auch eine weitere Erklärung für die Abhängigkeit der COX-Inhibitionseffekte von CXCR3-positiven Lymphozyten und IFN- γ sein (Fulton et al., 2006, Fulton et al., 1991). Präinkubation von Tumorzellen mit COX-Inhibitoren vor Implantation in die Versuchstiere ist ausreichend, um die beobachteten tumorsuppressiven Effekte im syngenem Mausmodell zu bewirken (Kundu and Fulton, 2002), ein weiterer Hinweis darauf, dass die Tumorzellen selbst die Ursache des COX-Effekts sind.

4.3 Einfluss von COX-Inhibition auf die CXCR3-Chemokinsekretion

Beide Zelllinien, sowohl die MCF-7 als auch die MDA-MB 231 Zellen, exprimieren die beiden COX-Isoenzyme COX-1 und COX-2 (Liu and Rose, 1996). Dies konnte an den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien bestätigt werden: Beide Zelllinien zeigten im Westernblot deutlich COX-2, wobei COX-1 nur von MDA-MB 231 Zellen eindeutig exprimiert wurde. In den untersuchten Tumorproben konnte eine COX-Expression auch *in vivo* nachgewiesen werden (siehe 3.7). Da verdeutlicht werden konnte, dass PGE₂ die CXCR3-Ligandenexpression unterdrückt, wurde davon ausgegangen, dass eine COX- Inhibition die CXCL9- und CXCL10-Expression erhöhen müsste. Die durchgeführten Experimente konnten den Zusammenhang zwischen COX und der CXCR3-Liganden Sekretion im Mammakarzinom bestätigen.

Andere Gruppen konnten anhand von Mausexperimenten beobachten, dass COX-2/PGE₂-Inhibition die Anzahl der infiltrierenden Th1-Lymphozyten fördert, die wiederum hemmend auf das Tumorstadium wirken (Sharma et al., 2005b, Sharma et al., 2005a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl selektive als auch unselektive COX-Inhibitoren verwendet. Im Gegensatz zu den unselektiven COX-Inhibitoren Indometacin und Acetylsalicylsäure blockiert der selektive COX-Inhibitor Celecoxib spezifisch das COX-2-Enzym.

Die unselektiven Inhibitoren, wie Acetylsalicylsäure und Indometacin zeigten eine konzentrationsabhängige Induktion. Die Zellen wurden zunächst mit Acetylsalicylsäure oder Indometacin inkubiert, nach 30 min wurde IFN- γ zugefügt. Für Indometacin ergab sich eine dosisabhängige Steigerung der CXCL9-Expression um das Zweifache für MCF-7 Zellen und um das 1,6-fache bei MDA-MB 231 Zellen. Die CXCL10-Expression stieg noch deutlicher um das 2,5- bzw. Zweifache bei MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen an. Die Gabe von Acetylsalicylsäure erhöhte CXCL9 um das 1,5- und 1,2-fache und CXCL10 um das 2,8- und 2,3-fache, jeweils für MCF-7 und MDA-MB 231.

Der selektive Inhibitor Celecoxib hingegen zeigte eine differentielle Regulation: In niedrigen Dosen zeigte sich ein vergleichbarer Effekt mit den unselektiven COX-Inhibitoren, die CXCL9- und CXCL10-Konzentrationen stiegen an. Bei Erhöhung der Dosis wurde dieser Effekt zunehmend geringer, die CXCR3-Liganden Expression nahm wieder ab. Diese Ergebnisse lassen sich auf der Basis der Hypothese interpretieren, dass in geringen Dosen die COX- Inhibitionseffekte überwiegen. Der COX-unabhängige Effekt in höheren Dosen von Celecoxib könnte unter anderem auf eine NF- κ B- Inhibition zurückzuführen sein. Ähnliche Ergebnisse wurden für das NSAR Sulindac beschrieben, welches die CXCL9-mRNA-Synthese

in murinen Makrophagen NF- κ B-abhängig inhibiert (Sakaeda et al., 2006). Andere Arbeitsgruppen konnten verdeutlichen, dass eine Stimulation des NF- κ B-Signalweges zu einer erhöhten CXCR3-Ligandenexpression führt (Hiroi and Ohmori, 2003). Funakoshi-Tago et al. zeigten, dass Celecoxib in der Lage ist, die NF- κ B-Aktivierung zu hemmen (Funakoshi-Tago et al., 2008). Es scheint daher vorstellbar, dass Celecoxib erst in hohen Dosen eine ausreichend stark hemmende Wirkung auf NF- κ B aufweist, die der COX-Inhibition entgegenwirkt und somit in verminderter Expression von CXCR3-Liganden resultiert.

Im Zusammenhang mit anderen Tumoren wird schon seit längerem immer wieder die Prognoseverbesserung durch NSAR Gabe diskutiert. Am Tiermodell konnte bei Kolonkarzinom und deren Lebermetastasen eine Reduktion des Tumorwachstums nach Gabe von Celecoxib nachgewiesen werden (de Heer et al., 2008). Daher wurde Celecoxib bereits im Rahmen klinischer Studien in der Therapie von Mammakarzinomen eingesetzt. Dabei wurde es in Kombination mit dem Aromatasehemmer Exemestan zur neoadjuvanten und adjuvanten Therapie verwendet (Lustberg et al., 2011, Falandry et al., 2009a). Die Studien zeigten jedoch enttäuschende Ergebnisse und mussten aufgrund kardialer Nebenwirkungen frühzeitig abgebrochen werden (Falandry et al., 2009b). Im Anbetracht der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse stellt sich die Frage, ob Celecoxib in diesem Zusammenhang der falsche COX-Inhibitor ist und man in Kombination mit beispielsweise Indomethacin bessere Ergebnisse erzielen könnte. Bislang fehlen jedoch prospektive Therapiestudien unter Verwendung unselektiver COX-Inhibitoren.

Fulton et al. konnten am Mausmodell darstellen, dass Indometacin abhängig von NK-Zellen und dem Vorhandensein von IFN- γ das Tumorwachstum verlangsamen kann (Kundu et al., 2005). In dieser Arbeit konnten nun mögliche Wirkmechanismen aufgezeigt werden. Es muss betont werden, dass der Effekt des Indomethacin ausschließlich bei immunkompetenten Mäusen von Erfolg ist. Dies bestätigt die These, dass der COX-Inhibitionseffekt Teil einer Immunmodulation zu sein scheint.

Um auszuschließen, dass eine veränderte Zellviabilität der Grund für die vorliegenden Ergebnisse ist, wurden MTT-Assays durchgeführt, die keinen Anhalt für Zelluntergang zeigten. Sowohl die Inhibierung von CXCR3-Liganden durch PGE₂ als auch die Induktion von CXCL9 und CXCL10 durch COX-Inhibitoren zeigten sich verstärkt in MCF-7 Zellen, auch wenn die MDA-MB 231 Zellen höhere COX-Expressionen aufwiesen. Ein möglicher Erklärungsversuch hierfür könnte eine geringere Dichte der vier EP-Rezeptoren der MDA-MB 231 Zellen sein, was in den verwendeten Zellen jedoch nicht untersucht wurde. Eine andere Erklärung könnte eine höhere COX-Expression der MDA-MB 231 Zellen sein, wodurch schon in unstimulierten

Zellen sehr viel intrinsisches PGE₂ vorhanden ist, was die Sensitivität des exogen zugeführten PGE₂ herabsetzt. Auch wenn dies nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, scheint die erste These wahrscheinlicher, da sich in den weiteren Experimenten im Rahmen der COX-Inhibition größere Effekte bei den MCF-7 Zellen zeigten.

Um weitere Hinweise auf eine mögliche Bedeutung dieser Zusammenhänge *in vivo* zu erhalten wurde die CXCL9 Konzentration in 46 Brustkrebsgewebeproben mittels ELISA bestimmt und die Ergebnisse mit dem rezidivfreien Überleben der Patientinnen verglichen. Die Tumorproben wurden mittels Western Blot auf das Vorhandensein und die Expressionsstärke von COX-1 und COX-2 untersucht. Die CXCL9-Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Stark COX-1 exprimierende Tumoren zeigten tendenziell reduzierte CXCL9-Konzentrationen (86,6 % ± 13,6 %, n= 43). Im Hinblick auf COX-2 verdeutlichte sich der vermutete Zusammenhang zusätzlich. So war die CXCL9-Konzentration bei der Gruppe mit hoher COX-Expression nur halb so hoch wie in der Gruppe mit niedriger Expression (56,5% ± 13,9%, n= 29, p < 0,026). Dies befindet sich in Übereinstimmung mit den präklinischen Ergebnissen von Kundu et al., die nahe legen, dass die PGE₂-Synthese stärker durch COX-2 als durch COX-1 induziert wird (Kundu et al., 2001). Dass vor allem COX-2 eine wichtige Rolle in Bezug auf klinisch pathologische Faktoren hat, konnte von Ranger et al. gezeigt werden. In den von ihnen durchgeführten Experimenten konnte eine signifikante Korrelation zwischen hoher COX-2-Expression und der Metastasierungsrate bei Brustkrebs beobachtet werden (Ranger et al., 2004). In den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten sich große Variationen in der CXCL9-Expression im Tumorgewebe. Eine hohe Proteinkonzentration der Gewebe korrelierte nicht mit der gemessenen CXCL9-Konzentration. Ebenso wenig korrelierte eine hohe CXCL9-Konzentration mit einem verbesserten Überleben. Letztlich ist dies bei der geringen und heterogenen Zusammensetzung des Patientinnenkollektivs nicht aussagekräftig, war jedoch auch nicht die primäre Fragestellung der Expressionsanalysen in den Geweben.

Es ist bekannt, dass erhöhtes PGE₂ im Brustkrebs mit einem schlechten Outcome und der Entwicklung von Fernmetastasen vergesellschaftet ist (Karmali et al., 1983, Rolland et al., 1980).

In diesem Zusammenhang wäre es nun interessant, Tumorproben von Patienten zu untersuchen, die NSAR als Basistherapeutika eingenommen haben, um vergleichen zu können, ob die CXCL9-Expression sich von solchen unterscheidet, die keine NSAR eingenommen haben.

4.4 CXCR3-Expression und Induktion von Cathepsin B in Mammakarzinomzellen

Als Voraussetzung zur Untersuchung der Cathepsin B-Regulation in den beiden verwendeten Mammakarzinomzelllinien wurde der CXCR3-Rezeptor mittels Westernblot nachgewiesen. Dabei konnten die beiden Splicevarianten CXCR3-A und CXCR3-B in der zu erwartenden Molekülgröße nachgewiesen werden, so wie es auch in anderen Zelltypen beschrieben ist (Ji et al., 2008). Damit konnten Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe Ben-Baruch erweitert werden, die zwar CXCR3 auf der Zelloberfläche von MCF-7, MDA-MB 231 und T47-D Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen hatten, nicht jedoch zwischen den beiden Splicevarianten unterscheiden konnten (Goldberg-Bittman et al., 2004). Datta et al. hatten die CXCR3-Splicevarianten mittels RT-PCR in MDA-MB 435 Zellen nachweisen können (Datta et al., 2006).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass sowohl bei den MCF-7 Zellen als auch bei den MDA-MB 231 Zellen Cathepsin B (und Procathepsin B) exprimiert wird. Nach Stimulation der Zellen mit CXCL9 oder CXCL10 konnte im Westernblot eine Hochregulation von Cathepsin B nachgewiesen werden.

Cathepsin B gehört zu einer Gruppe lysosomaler Proteasen, die häufig im Rahmen menschlicher Krebserkrankungen hochreguliert sind. Ähnlich wie Matrix-Metalloproteasen und Serin-Proteasen unterstützen sie das Wachstum und die Vaskularisierung von umgebenden Geweben und spielen so auch eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese (Jedeszko and Sloane, 2004). Cathepsin B-Induktion wurde sowohl in mesenchymalen als auch in epidermalen Tumoren, wie Brust-, Lungen-, Gehirn- und gastrointestinalen Tumoren sowie Melanomen beschrieben (Berdowska, 2004). Auch bei Pankreastumoren konnte ein gesteigertes Cathepsin nachgewiesen werden und bei allen Tumoren scheint dies mit einer schlechteren Prognose einherzugehen (Jedeszko and Sloane, 2004, Gocheva and Joyce, 2007, Gocheva et al., 2006). Mit Hilfe des Cathepsin Inhibitors Stefin A konnte die Rate an Fernmetastasen bei Brustkrebs erheblich gesenkt werden. Dies ist vermutlich der Blockierung der Cathepsine, v.a. Cathepsin B zuzuschreiben (Parker et al., 2008). Forcierte Herunterregulation von Cathepsin B führte zu reduziertem Tumorwachstum und weniger Lungenmetastasen in murinen Brustkrebsmodellen (Vasiljeva et al., 2008, Vasiljeva et al., 2006). Nicht zuletzt durch Arbeiten aus der Klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der TU München konnte Cathepsin B als ein negativer prognostischer Marker beim Mammakarzinom identifiziert werden (Foekens et al., 1998, Lah et al., 2000, Maguire et al., 1998, Thomssen et al., 1995). Kürzlich konnte außerdem die

promaligne Funktion des Cathepsin B verdeutlicht werden, da gezeigt wurde, dass seine selektive Inhibition beim Mammakarzinom die Metastasierung in Knochen begrenzen kann (Withana et al., 2012). Inwiefern in diesem Zusammenhang, eine fehlende Spaltung der CXCR3-Liganden und somit eine hohe Konzentration von CXCL9 und CXCL10 zur protektiven Funktion beitragen, muss Inhalt weiterführender Experimente sein.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene Induktion von Cathepsin B durch CXCR3-Liganden zeigt eine neue Erklärung für den negativ prognostischen Wert von CXCR3 im Mammakarzinom auf (Ma et al., 2009, Hilborn et al., 2014). Im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus könnten Brustkrebszellen auf diese Weise CXCR3-Liganden im Tumor abbauen, dadurch die tumorsuppressive lymphozytäre Infiltration unterbinden und dem Immunsystem entkommen. Ein ähnlicher Mechanismus wurde kürzlich für die Dipeptidylpeptidase IV nachgewiesen, die ebenfalls in der Lage ist, CXCR3-Liganden abzubauen (Barreira da Silva et al., 2015).

4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente erweitern unser Verständnis von der Regulation lymphozytenrekutierender Chemokine im Brustkrebs. Durch den erstmaligen Nachweis einer positiven Regulation durch unselektive, nicht selektive, COX-Inhibitoren haben sie darüber hinaus unmittelbare Implikation für die Therapie. Pharmakologisch gut bekannte Substanzen wie Indomethacin sollten (im Gegensatz zu Celecoxib), insbesondere als Zusatz zu zukünftigen Immuntherapien, beim Mammakarzinom getestet werden. Durch eine gesteigerte CXCR3-bedingte Immuninfiltration sollten diese Therapien verbessert werden.

5. Zusammenfassung

Seit einigen Jahren befinden sich zunehmend immunologische Therapien beim Mammakarzinom in der klinischen Erprobung. Chemokine, so insbesondere Liganden des CXCR3-Chemokinrezeptors, spielen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Immuneffektorzellen in solide Karzinome, was wiederum für den Erfolg von immunologischen Therapiestrategien notwendig ist.

Ziel der Arbeit war es, Regulationsmechanismen von CXCR3-Liganden zu untersuchen und mögliche pharmakologische Einflussmöglichkeiten aufzuzeigen, mit denen man ihre intratumorale Konzentration erhöhen und so Immuntherapien möglicherweise verbessern kann. Insbesondere das Cyclooxygenase- System war von besonderem Interesse, da eine COX-Überexpression mit einer verminderten lymphozytären Infiltration im Mammakarzinom vergesellschaftet ist.

Nachdem zunächst einmal gezeigt werden konnte, dass CXCR3-Liganden sowie deren Rezeptor *in vitro* vorhanden sind, wurden die MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen mit unterschiedlichen Stimulanzen beimpft, um eine Regulation aufzuweisen.

IFN- γ und TNF- α zeigten sich als Induktoren, PGE₂ als Repressor von CXCL9 und CXCL10. Um eine Erhöhung der CXCR3-Liganden zu erreichen schien es daher sinnvoll PGE₂ zu blockieren, um die supprimierende Wirkung aufzuheben. Da PGE₂ das Hauptprodukt der Cyclooxygenase ist, war es naheliegend diese in nachfolgenden Versuchen zu hemmen.

Als pharmakologische COX-Inhibitoren wurden nun Indomethacin, ASS und als selektiver COX-2-Inhibitor Celecoxib verwendet.

Mit Hilfe von Westernblot-Analysen wurde zunächst das Vorhandensein der beiden Isoformen der Cyclooxygenase (COX-1 und COX-2) in den Zelllinien nachgewiesen.

Es folgte die Stimulation der Zellen mit Indomethacin sowie ASS, woraufhin eine Konzentrationserhöhung der CXCR3-Liganden nachgewiesen wurde.

Bei der Verwendung von Celecoxib jedoch, trat bei hohen Dosierungen eine Supprimierung der CXCL9 und CXCL10 Konzentrationen auf. Einzig nach Stimulation der MDA-MB 231 Zellen konnte eine dosisabhängige Steigerung der CXCL10-Konzentration verzeichnet werden. Dies zeigt, dass ASS und Indomethacin hinsichtlich der pharmakologischen Hochregulation der Chemokine dem selektiven COX-Inhibitor Celecoxib zu bevorzugen sind. Grund hierfür sind vermutlich COX-unabhängige Mechanismen, welche hier nicht weiter untersucht wurden.

Da Prolaktin als weiterer potentieller Induktor von CXCR3-Liganden in Frage kommt, wurden MCF-7 sowie MDA-MB 231 Zelllinien mit Prolaktin stimuliert. Eine Konzentrationserhöhung der CXCR3-Liganden, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Im Folgenden wurde versucht auch *in vivo* die anhand von Zellstudien gewonnenen Erkenntnisse zu untermauern. 46 Tumorproben konnten untersucht werden und es zeigte sich, dass auch *in vivo* ein inverser Zusammenhang zwischen COX-Expression und CXCL9-Konzentration besteht. So wurde bei starker COX-Expression im vorhandenen Gewebe, eine niedrige CXCL9-Konzentrationen gemessen und umgekehrt.

Inhalt weiterer Untersuchungen war die Regulation von Cathepsin B durch CXCR3-Liganden. Hier konnte zunächst einmal gezeigt werden, dass sowohl MCF-7 Zellen als auch MDA-MB 231 Zellen Cathepsin B exprimieren. Eine Stimulation der Zellen mit CXCL9 oder CXCL10 zeigte eine Cathepsin B-Induktion.

Da bekannt ist, dass Proteasen im Rahmen eines negativen Feedback Mechanismus Chemokine wieder spalten können, kann diese Induktion eine neue Erklärung für den negativ prognostischen Wert von CXCR3 im Mammakarzinom sein, da hierdurch die tumorsuppressive lymphozytäre Infiltration unterbunden werden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen bekannte Regulationsmechanismen der Chemokine im Tumormikroenvironment, erweitern das bisherige Wissen und zeigen mögliche pharmakologische Einflussmöglichkeiten auf.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Chemokinfamilien und deren Rezeptoren	9
Tabelle 2-1: Antikörper	27
Tabelle 2-2: Zusammensetzung von 10 x PBS pH7,4.....	31
Tabelle 2-3: Herstellung des Probenauftragspuffers = Laemmli- Puffer	33
Tabelle 2-4: Herstellung von 10x Elektrophoresepuffer	33
Tabelle 2-5: Herstellung von Trenn- und Sammelgel	33
Tabelle 2-6: Semi-Dry Puffer	34
Tabelle 2-7: Wet- Blotting-Puffer	35
Tabelle 2-8: Antikörper Western Blot.....	36

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Tertiärstruktur eines löslichen CXC-Chemokins.....	9
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung von CXCR 3-A und CXCR3-B mRNA	14
Abbildung 3-1: Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen	38
Abbildung 3-2: Einfluss von PGE ₂ auf MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen.....	39
Abbildung 3-3: COX-Expression in Mammakarzinom-Zelllinien	40
Abbildung 3-4: Stimulation der MCF-7 Zellen mit ASS und Indomethacin.....	41
Abbildung 3-5: Stimulation mit ASS, PGE ₂ , Celecoxib und Indomethacin.....	42
Abbildung 3-6: Einfluss von ASS und Indometacin auf MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen..	43
Abbildung 3-7: Einfluss von Celecoxib auf MCF-7 und MDA-MB 231 Zellen.....	44
Abbildung 3-8: MTT- Test.....	45
Abbildung 3-9: Korrelation von COX und CXCL9.....	47
Abbildung 3-10: Induktion von Cathepsin B durch CXCL9 und CXCL10.....	45

8. Literaturverzeichnis

- ABASTADO, J. P. 2012. The next challenge in cancer immunotherapy: controlling T-cell traffic to the tumor. *Cancer Res*, 72, 2159-61.
- ADDISON, C. L., ARENBERG, D. A., MORRIS, S. B., XUE, Y. Y., BURDICK, M. D., MULLIGAN, M. S., IANNETTONI, M. D. & STRIETER, R. M. 2000a. The CXC chemokine, monokine induced by interferon-gamma, inhibits non-small cell lung carcinoma tumor growth and metastasis. *Hum Gene Ther*, 11, 247-61.
- ADDISON, C. L., DANIEL, T. O., BURDICK, M. D., LIU, H., EHLERT, J. E., XUE, Y. Y., BUECHI, L., WALZ, A., RICHMOND, A. & STRIETER, R. M. 2000b. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol*, 165, 5269-77.
- ANDROULIDAKI, A., DERMITZAKI, E., VENIHAKI, M., KARAGIANNI, E., RASSOULI, O., ANDREAKOU, E., STOURNARAS, C., MARGIORIS, A. N. & TSATSANIS, C. 2009. Corticotropin Releasing Factor promotes breast cancer cell motility and invasiveness. *Mol Cancer*, 8, 30.
- ANNUNZIATO, F., COSMI, L., GALLI, G., BELTRAME, C., ROMAGNANI, P., MANETTI, R., ROMAGNANI, S. & MAGGI, E. 1999. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*, 65, 691-9.
- ANTONELLI, A., ROTONDI, M., FALLAHI, P., ROMAGNANI, P., FERRARI, S. M., BARANI, L., FERRANNINI, E. & SERIO, M. 2006a. Increase of interferon-gamma-inducible CXC chemokine CXCL10 serum levels in patients with active Graves' disease, and modulation by methimazole therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 64, 189-95.
- ANTONELLI, A., ROTONDI, M., FERRARI, S. M., FALLAHI, P., ROMAGNANI, P., FRANCESCHINI, S. S., SERIO, M. & FERRANNINI, E. 2006b. Interferon-gamma-inducible alpha-chemokine CXCL10 involvement in Graves' ophthalmopathy: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *J Clin Endocrinol Metab*, 91, 614-20.
- AZENSHTTEIN, E., MESHEL, T., SHINA, S., BARAK, N., KEYDAR, I. & BEN-BARUCH, A. 2005. The angiogenic factors CXCL8 and VEGF in breast cancer: regulation by an array of pro-malignancy factors. *Cancer Lett*, 217, 73-86.
- BACHELDER, R. E., WENDT, M. A. & MERCURIO, A. M. 2002. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer Res*, 62, 7203-6.
- BAGGIOLINI, M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*, 250, 91-104.
- BANKHURST, A. D. 1982. The modulation of human natural killer cell activity by prostaglandins. *J Clin Lab Immunol*, 7, 85-91.
- BARNES, N. L., WARNBERG, F., FARNIE, G., WHITE, D., JIANG, W., ANDERSON, E. & BUNDRED, N. J. 2007. Cyclooxygenase-2 inhibition: effects on tumour growth, cell cycling and lymphangiogenesis in a xenograft model of breast cancer. *Br J Cancer*, 96, 575-82.

- BAROK, M., ISOLA, J., PALYI-KREKK, Z., NAGY, P., JUHASZ, I., VEREB, G., KAURANIEMI, P., KAPANEN, A., TANNER, M. & SZOLLOSI, J. 2007. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther*, 6, 2065-72.
- BARREIRA DA SILVA, R., LAIRD, M. E., YATIM, N., FIETTE, L., INGERSOLL, M. A. & ALBERT, M. L. 2015. Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy. *Nat Immunol*, 16, 850-8.
- BAUERFEIND, D. M. I. 2009. *Manual Mammakarzinome*, München, W. Zuckschwerdt Verlag
- BELPERIO, J. A., PHILLIPS, R. J., BURDICK, M. D., LUTZ, M., KEANE, M. & STRIETER, R. 2004. The SDF-1/CXCL 12/CXCR4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Chest*, 125, 156S.
- BEN-BARUCH, A. 2003. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions. *Breast Cancer Res*, 5, 31-6.
- BEN-BARUCH, A. 2006. The multifaceted roles of chemokines in malignancy. *Cancer Metastasis Rev*, 25, 357-71.
- BEN-JONATHAN, N., MERSHON, J. L., ALLEN, D. L. & STEINMETZ, R. W. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*, 17, 639-69.
- BENOY, I. H., SALGADO, R., VAN DAM, P., GEBOERS, K., VAN MARCK, E., SCHARPE, S., VERMEULEN, P. B. & DIRIX, L. Y. 2004. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin Cancer Res*, 10, 7157-62.
- BERDOWSKA, I. 2004. Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta*, 342, 41-69.
- BERQUIN, I. M. & SLOANE, B. F. 1996. Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol*, 389, 281-94.
- BINGLE, L., BROWN, N. J. & LEWIS, C. E. 2002. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*, 196, 254-65.
- BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M. & HOWARD, J. C. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 15, 749-95.
- BONACCHI, A., ROMAGNANI, P., ROMANELLI, R. G., EFSEN, E., ANNUNZIATO, F., LASAGNI, L., FRANCALANCI, M., SERIO, M., LAFFI, G., PINZANI, M., GENTILINI, P. & MARRA, F. 2001. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem*, 276, 9945-54.
- BRUNDA, M. J., HERBERMAN, R. B. & HOLDEN, H. T. 1980. Inhibition of murine natural killer cell activity by prostaglandins. *J Immunol*, 124, 2682-7.

- CASPI, R. R., CHAN, C. C., GRUBBS, B. G., SILVER, P. B., WIGGERT, B., PARSA, C. F., BAHMANYAR, S., BILLIAU, A. & HEREMANS, H. 1994. Endogenous systemic IFN-gamma has a protective role against ocular autoimmunity in mice. *J Immunol*, 152, 890-9.
- CHEN, D. S. & MELLMAN, I. 2013. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39, 1-10.
- CHENSUE, S. W. 2001. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev*, 14, 821-35, table of contents.
- CLARKE, D. L., CLIFFORD, R. L., JINDARAT, S., PROUD, D., PANG, L., BELVISI, M. & KNOX, A. J. 2010. TNFalpha and IFNgamma synergistically enhance transcriptional activation of CXCL10 in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF-kappaB, and the transcriptional coactivator CREB-binding protein. *J Biol Chem*, 285, 29101-10.
- COOPER, M. A., FEHNIGER, T. A. & CALIGIURI, M. A. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22, 633-40.
- DANNENBERG, A. J. & SUBBARAMAIAH, K. 2003. Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise. *Cancer Cell*, 4, 431-6.
- DATTA, D., FLAXENBURG, J. A., LAXMANAN, S., GEEHAN, C., GRIMM, M., WAAGA-GASSER, A. M., BRISCOE, D. M. & PAL, S. 2006. Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res*, 66, 9509-18.
- DE HEER, P., SANDEL, M. H., GUERTENS, G., DE BOECK, G., KOUDIJS, M. M., NAGELKERKE, J. F., JUNGGEURT, J. M., DE BRUIJN, E. A., VAN DE VELDE, C. J. & KUPPEN, P. J. 2008. Celecoxib inhibits growth of tumors in a syngeneic rat liver metastases model for colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62, 811-9.
- DENKERT, C., LOIBL, S., NOSKE, A., ROLLER, M., MULLER, B. M., KOMOR, M., BUDCZIES, J., DARB-ESFAHANI, S., KRONENWETT, R., HANUSCH, C., VON TORNE, C., WEICHERT, W., ENGELS, K., SOLBACH, C., SCHRADER, I., DIETEL, M. & VON MINCKWITZ, G. 2010. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 105-13.
- DENKERT, C., VON MINCKWITZ, G., BRASE, J. C., SINN, B. V., GADE, S., KRONENWETT, R., PFITZNER, B. M., SALAT, C., LOI, S., SCHMITT, W. D., SCHEM, C., FISCH, K., DARB-ESFAHANI, S., MEHTA, K., SOTIRIOU, C., WIENERT, S., KLARE, P., ANDRE, F., KLAUSCHEN, F., BLOHMER, J. U., KRAPPMANN, K., SCHMIDT, M., TESCH, H., KUMMEL, S., SINN, P., JACKISCH, C., DIETEL, M., REIMER, T., UNTCH, M. & LOIBL, S. 2015. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without Carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *J Clin Oncol*, 33, 983-91.
- EHLERT, J. E., ADDISON, C. A., BURDICK, M. D., KUNKEL, S. L. & STRIETER, R. M. 2004. Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping. *J Immunol*, 173, 6234-40.

- FALANDRY, C., CANNEY, P. A., FREYER, G. & DIRIX, L. Y. 2009a. Role of combination therapy with aromatase and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol*, 20, 615-20.
- FALANDRY, C., DEBLED, M., BACHELOT, T., DELOZIER, T., CRETIN, J., ROMESTAING, P., MILLE, D., YOU, B., MAURIAC, L., PUJADE-LAURAIN, E. & FREYER, G. 2009b. Celecoxib and exemestane versus placebo and exemestane in postmenopausal metastatic breast cancer patients: a double-blind phase III GINECO study. *Breast Cancer Res Treat*, 116, 501-8.
- FARBER, J. M. 1990. A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5238-42.
- FILIPITS, M. & PIRKER, R. 2011. Predictive markers in the adjuvant therapy of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 74, 355-63.
- FOEKENS, J. A., KOS, J., PETERS, H. A., KRASOVEC, M., LOOK, M. P., CIMERMAN, N., MEIJER-VAN GELDER, M. E., HENZEN-LOGMANS, S. C., VAN PUTTEN, W. L. & KLIJN, J. G. 1998. Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer. *J Clin Oncol*, 16, 1013-21.
- FOGLER, W. E., VOLKER, K., MCCORMICK, K. L., WATANABE, M., ORTALDO, J. R. & WILTROUT, R. H. 1996. NK cell infiltration into lung, liver, and subcutaneous B16 melanoma is mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction. *J Immunol*, 156, 4707-14.
- FUJITA, M., KOHANBASH, G., FELLOWS-MAYLE, W., HAMILTON, R. L., KOMOHARA, Y., DECKER, S. A., OHLFEST, J. R. & OKADA, H. 2011. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*.
- FULTON, A., MILLER, F., WEISE, A. & WEI, W. Z. 2006. Prospects of controlling breast cancer metastasis by immune intervention. *Breast Dis*, 26, 115-27.
- FULTON, A. M. 2009. The chemokine receptors CXCR4 and CXCR3 in cancer. *Curr Oncol Rep*, 11, 125-31.
- FULTON, A. M., ZHANG, S. Z. & CHONG, Y. C. 1991. Role of the prostaglandin E2 receptor in mammary tumor metastasis. *Cancer Res*, 51, 2047-50.
- FUNAKOSHI-TAGO, M., SHIMIZU, T., TAGO, K., NAKAMURA, M., ITOH, H., SONODA, Y. & KASAHARA, T. 2008. Celecoxib potently inhibits TNFalpha-induced nuclear translocation and activation of NF-kappaB. *Biochem Pharmacol*, 76, 662-71.
- GESUNDHEITSBERICHTERSTATTUNG 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
- GOCHEVA, V. & JOYCE, J. A. 2007. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle*, 6, 60-4.

- GOCHEVA, V., ZENG, W., KE, D., KLIMSTRA, D., REINHECKEL, T., PETERS, C., HANAHAN, D. & JOYCE, J. A. 2006. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev*, 20, 543-56.
- GOLDBERG-BITTMAN, L., NEUMARK, E., SAGI-ASSIF, O., AZENSHTAIN, E., MESHEL, T., WITZ, I. P. & BEN-BARUCH, A. 2004. The expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand, CXCL10, in human breast adenocarcinoma cell lines. *Immunol Lett*, 92, 171-8.
- GOLDBERG-BITTMAN, L., SAGI-ASSIF, O., MESHEL, T., NEVO, I., LEVY-NISSENBAUM, O., YRON, I., WITZ, I. P. & BEN-BARUCH, A. 2005. Cellular characteristics of neuroblastoma cells: regulation by the ELR--CXC chemokine CXCL10 and expression of a CXCR3-like receptor. *Cytokine*, 29, 105-17.
- GORBACHEV, A. V., KOBAYASHI, H., KUDO, D., TANNENBAUM, C. S., FINKE, J. H., SHU, S., FARBER, J. M. & FAIRCHILD, R. L. 2007. CXC chemokine ligand 9/monokine induced by IFN-gamma production by tumor cells is critical for T cell-mediated suppression of cutaneous tumors. *J Immunol*, 178, 2278-86.
- GROOM, J. R. & LUSTER, A. D. 2011. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol*, 89, 207-15.
- HAAS, A. R., SUN, J., VACHANI, A., WALLACE, A. F., SILVERBERG, M., KAPOOR, V. & ALBELDA, S. M. 2006. Cyclooxygenase-2 inhibition augments the efficacy of a cancer vaccine. *Clin Cancer Res*, 12, 214-22.
- HARRIS, R. E., CHLEBOWSKI, R. T., JACKSON, R. D., FRID, D. J., ASCENSEO, J. L., ANDERSON, G., LOAR, A., RODABOUGH, R. J., WHITE, E. & MCTIERNAN, A. 2003. Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative. *Cancer Res*, 63, 6096-101.
- HEIDEMANN, J., OGAWA, H., DWINELL, M. B., RAFIEE, P., MAASER, C., GOCKEL, H. R., OTTERSON, M. F., OTA, D. M., LUGERING, N., DOMSCHKE, W. & BINION, D. G. 2003. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem*, 278, 8508-15.
- HILBORN, E., SIVIK, T., FORNANDER, T., STAL, O., NORDENSKJOLD, B. & JANSSON, A. 2014. C-X-C ligand 10 and C-X-C receptor 3 status can predict tamoxifen treatment response in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 145, 73-82.
- HIROI, M. & OHMORI, Y. 2003. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required to elicit interferon-gamma-induced expression of chemokine CXC ligand 9 (CXCL9) and CXCL10 in human tumour cell lines. *Biochem J*, 376, 393-402.
- HOLMES, M. D., CHEN, W. Y., LI, L., HERTZMARK, E., SPIEGELMAN, D. & HANKINSON, S. E. 2010. Aspirin intake and survival after breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 1467-72.
- JANICKE, F., PACHE, L., SCHMITT, M., ULM, K., THOMSEN, C., PRECHTL, A. & GRAEFF, H. 1994. Both the cytosols and detergent extracts of breast cancer tissues are suited to evaluate the prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor type 1. *Cancer Res*, 54, 2527-30.

- JEDESZKO, C. & SLOANE, B. F. 2004. Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem*, 385, 1017-27.
- JI, R., LEE, C. M., GONZALES, L. W., YANG, Y., AKSOY, M. O., WANG, P., BRAILOIU, E., DUN, N., HURFORD, M. T. & KELSEN, S. G. 2008. Human type II pneumocyte chemotactic responses to CXCR3 activation are mediated by splice variant A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 294, L1187-96.
- K. STRUNZ, H. D., R. KREIENBERG, G. SAUER 2008. Vorhersage des Therapieansprechens beim Mammakarzinom. *Gynäkol Geburtshilfliche Rundsch* 2008;48:113-117 (DOI: 10.1159/000127392).
- KAJITANI, K., TANAKA, Y., ARIHIRO, K., KATAOKA, T. & OHDAN, H. 2012. Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 134, 139-55.
- KANDA, N., MITSUI, H. & WATANABE, S. 2004. Prostaglandin E(2) suppresses CCL27 production through EP2 and EP3 receptors in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol*, 114, 1403-9.
- KANDA, N. & WATANABE, S. 2002. Cyclooxygenase-2 inhibitor enhances whereas prostaglandin E2 inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa in epidermoid carcinoma A431. *J Invest Dermatol*, 119, 1080-9.
- KANDA, N. & WATANABE, S. 2007. Prolactin enhances interferon-gamma-induced production of CXC ligand 9 (CXCL9), CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. *Endocrinology*, 148, 2317-25.
- KARMALI, R. A., WELT, S., THALER, H. T. & LEFEVRE, F. 1983. Prostaglandins in breast cancer: relationship to disease stage and hormone status. *Br J Cancer*, 48, 689-96.
- KAROW, T. (ed.) 2010. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*
- KATO, M., KITAYAMA, J., KAZAMA, S. & NAGAWA, H. 2003. Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res*, 5, R144-50.
- KAUR, S., SASSANO, A., JOSEPH, A. M., MAJCHRZAK-KITA, B., EKLUND, E. A., VERMA, A., BRACHMANN, S. M., FISH, E. N. & PLATANIAS, L. C. 2008. Dual regulatory roles of phosphatidylinositol 3-kinase in IFN signaling. *J Immunol*, 181, 7316-23.
- KAWADA, K., HOSOGI, H., SONOSHITA, M., SAKASHITA, H., MANABE, T., SHIMAHARA, Y., SAKAI, Y., TAKABAYASHI, A., OSHIMA, M. & TAKETO, M. M. 2007. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene*, 26, 4679-88.
- KEELEY, E. C., MEHRAD, B. & STRIETER, R. M. 2010. CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv Cancer Res*, 106, 91-111.
- KOVRT, H. E., HOUOT, R., WEISKOPF, K., GOLDSTEIN, M. J., SCHEEREN, F., CZERWINSKI, D., COLEVAS, A. D., WENG, W. K., CLARKE, M. F., CARLSON, R. W., STOCKDALE, F. E., MOLLICK, J. A., CHEN, L. & LEVY, R. 2012. Stimulation of natural killer cells with a

- CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest*, 122, 1066-75.
- KONDO, T., ITO, F., NAKAZAWA, H., HORITA, S., OSAKA, Y. & TOMA, H. 2004. High expression of chemokine gene as a favorable prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol*, 171, 2171-5.
- KUBAREK, L. & JAGODZINSKI, P. P. 2007. Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 beta-estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *FEBS Lett*, 581, 1441-8.
- KUBAREK, L., KOZLOWSKA, A., PRZYBYLSKI, M., LIANERI, M. & JAGODZINSKI, P. P. 2009. Down-regulation of CXCR4 expression by tamoxifen is associated with DNA methyltransferase 3B up-regulation in MCF-7 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 63, 586-91.
- KUNDU, N. & FULTON, A. M. 2002. Selective cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer. *Cancer Res*, 62, 2343-6.
- KUNDU, N., WALSER, T. C., MA, X. & FULTON, A. M. 2005. Cyclooxygenase inhibitors modulate NK activities that control metastatic disease. *Cancer Immunol Immunother*, 54, 981-7.
- KUNDU, N., YANG, Q., DORSEY, R. & FULTON, A. M. 2001. Increased cyclooxygenase-2 (cox-2) expression and activity in a murine model of metastatic breast cancer. *Int J Cancer*, 93, 681-6.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAH, T. T., CERCEK, M., BLEJEC, A., KOS, J., GORODETSKY, E., SOMERS, R. & DASKAL, I. 2000. Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L, and other clinical indicators. *Clin Cancer Res*, 6, 578-84.
- LALA, P. K., PARHAR, R. S. & SINGH, P. 1986. Indomethacin therapy abrogates the prostaglandin-mediated suppression of natural killer activity in tumor-bearing mice and prevents tumor metastasis. *Cell Immunol*, 99, 108-18.
- LASAGNI, L., FRANCALANCI, M., ANNUNZIATO, F., LAZZERI, E., GIANNINI, S., COSMI, L., SAGRINATI, C., MAZZINGHI, B., ORLANDO, C., MAGGI, E., MARRA, F., ROMAGNANI, S., SERIO, M. & ROMAGNANI, P. 2003. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med*, 197, 1537-49.
- LEE, A. H., HAPPERFIELD, L. C., BOBROW, L. G. & MILLIS, R. R. 1997. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol*, 50, 669-73.
- LEIBSON, P. J. 1997. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity*, 6, 655-61.

- LEWIS, C. E. & POLLARD, J. W. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*, 66, 605-12.
- LI, Y. M., PAN, Y., WEI, Y., CHENG, X., ZHOU, B. P., TAN, M., ZHOU, X., XIA, W., HORTOBAGYI, G. N., YU, D. & HUNG, M. C. 2004. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell*, 6, 459-69.
- LIU, L. Y., BATES, M. E., JARJOUR, N. N., BUSSE, W. W., BERTICS, P. J. & KELLY, E. A. 2007. Generation of Th1 and Th2 chemokines by human eosinophils: evidence for a critical role of TNF-alpha. *J Immunol*, 179, 4840-8.
- LIU, M., MATSUMURA, N., MANDAI, M., LI, K., YAGI, H., BABA, T., SUZUKI, A., HAMANISHI, J., FUKUHARA, K. & KONISHI, I. 2009. Classification using hierarchical clustering of tumor-infiltrating immune cells identifies poor prognostic ovarian cancers with high levels of COX expression. *Mod Pathol*, 22, 373-84.
- LIU, X. H. & ROSE, D. P. 1996. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 56, 5125-7.
- LJUNGGREN, H. G. & KARRE, K. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med*, 162, 1745-59.
- LOETSCHER, P., SEITZ, M., CLARK-LEWIS, I., BAGGIOLINI, M. & MOSER, B. 1996. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J Immunol*, 156, 322-7.
- LOOS, T., DEKEYZER, L., STRUYF, S., SCHUTYSER, E., GIJSBERS, K., GOUWY, M., FRAEYMAN, A., PUT, W., RONSSE, I., GRILLET, B., OPDENAKKER, G., VAN DAMME, J. & PROOST, P. 2006. TLR ligands and cytokines induce CXCR3 ligands in endothelial cells: enhanced CXCL9 in autoimmune arthritis. *Lab Invest*, 86, 902-16.
- LUBOSHITS, G., SHINA, S., KAPLAN, O., ENGELBERG, S., NASS, D., LIFSHITZ-MERCER, B., CHAITCHIK, S., KEYDAR, I. & BEN-BARUCH, A. 1999. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res*, 59, 4681-7.
- LUSTBERG, M. B., POVOSKI, S. P., ZHAO, W., ZIEGLER, R. M., SUGIMOTO, Y., RUPPERT, A. S., LEHMAN, A. M., SHIELS, D. R., MROZEK, E., RAMASWAMY, B., LAYMAN, R. M., BRUEGGEMEIER, R. W. & SHAPIRO, C. L. 2011. Phase II trial of neoadjuvant exemestane in combination with celecoxib in postmenopausal women who have breast cancer. *Clin Breast Cancer*, 11, 221-7.
- LUSTER, A. D. & RAVETCH, J. V. 1987. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med*, 166, 1084-97.
- LUSTER, A. D., UNKELESS, J. C. & RAVETCH, J. V. 1985. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*, 315, 672-6.
- MA, X., NORSWORTHY, K., KUNDU, N., RODGERS, W. H., GIMOTTY, P. A., GOLOUBEVA, O., LIPSKY, M., LI, Y., HOLT, D. & FULTON, A. 2009. CXCR3 expression is associated

- with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. *Mol Cancer Ther*, 8, 490-8.
- MAGUIRE, T. M., SHERING, S. G., DUGGAN, C. M., MCDERMOTT, E. W., O'HIGGINS, N. J. & DUFFY, M. J. 1998. High levels of cathepsin B predict poor outcome in patients with breast cancer. *Int J Biol Markers*, 13, 139-44.
- MAJUMDER, S., ZHOU, L. Z., CHATURVEDI, P., BABCOCK, G., ARAS, S. & RANSOHOFF, R. M. 1998. Regulation of human IP-10 gene expression in astrocytoma cells by inflammatory cytokines. *J Neurosci Res*, 54, 169-80.
- MCILROY, A., CARON, G., BLANCHARD, S., FREMAUX, I., DULUC, D., DELNESTE, Y., CHEVAILLER, A. & JEANNIN, P. 2006. Histamine and prostaglandin E up-regulate the production of Th2-attracting chemokines (CCL17 and CCL22) and down-regulate IFN-gamma-induced CXCL10 production by immature human dendritic cells. *Immunology*, 117, 507-16.
- MCINNIS, K. A., BRITAIN, A., LAUSCH, R. N. & OAKES, J. E. 2005. Synthesis of alpha-chemokines IP-10, I-TAC, and MIG are differentially regulated in human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 1668-74.
- MERIC, J. B., ROTTEY, S., OLAUSSEN, K., SORIA, J. C., KHAYAT, D., RIXE, O. & SPANO, J. P. 2006. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol*, 59, 51-64.
- MILLER, L. J., KURTZMAN, S. H., WANG, Y., ANDERSON, K. H., LINDQUIST, R. R. & KREUTZER, D. L. 1998. Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue. *Anticancer Res*, 18, 77-81.
- MOKHTAR, N. M., CHENG, C. W., COOK, E., BIELBY, H., SMITH, S. K. & CHARNOCK-JONES, D. S. 2010. Progesterone regulates chemokine (C-X-C motif) ligand 14 transcript level in human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 16, 170-7.
- MULLER, A., HOMEY, B., SOTO, H., GE, N., CATRON, D., BUCHANAN, M. E., MCCLANAHAN, T., MURPHY, E., YUAN, W., WAGNER, S. N., BARRERA, J. L., MOHAR, A., VERASTEGUI, E. & ZLOTNIK, A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410, 50-6.
- MURAKAMI, T., CARDONES, A. R. & HWANG, S. T. 2004. Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J Dermatol Sci*, 36, 71-8.
- NARUMI, S., YONEYAMA, H., INADERA, H., NISHIOJI, K., ITOH, Y., OKANOUE, T. & MATSUSHIMA, K. 2000. TNF-alpha is a potent inducer for IFN-inducible protein-10 in hepatocytes and unaffected by GM-CSF in vivo, in contrast to IL-1beta and IFN-gamma. *Cytokine*, 12, 1007-16.
- NEVILLE, L. F., MATHIAK, G. & BAGASRA, O. 1997. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*, 8, 207-19.
- NING, Y., RIGGINS, R. B., MULLA, J. E., CHUNG, H., ZWART, A. & CLARKE, R. 2010. IFN-gamma restores breast cancer sensitivity to fulvestrant by regulating STAT1, IFN regulatory

- factor 1, NF-kappaB, BCL2 family members, and signaling to caspase-dependent apoptosis. *Mol Cancer Ther*, 9, 1274-85.
- O'HAYRE, M., SALANGA, C. L., HANDEL, T. M. & ALLEN, S. J. 2008. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J*, 409, 635-49.
- PALKOWETZ, K. H., ROYER, C. L., GAROFALO, R., RUDLOFF, H. E., SCHMALSTIEG, F. C., JR. & GOLDMAN, A. S. 1994. Production of interleukin-6 and interleukin-8 by human mammary gland epithelial cells. *J Reprod Immunol*, 26, 57-64.
- PAN, J., BURDICK, M. D., BELPERIO, J. A., XUE, Y. Y., GERARD, C., SHARMA, S., DUBINETT, S. M. & STRIETER, R. M. 2006. CXCR3/CXCR3 ligand biological axis impairs RENCA tumor growth by a mechanism of immunoangiostasis. *J Immunol*, 176, 1456-64.
- PANTSCHENKO, A. G., PUSHKAR, I., ANDERSON, K. H., WANG, Y., MILLER, L. J., KURTZMAN, S. H., BARROWS, G. & KREUTZER, D. L. 2003. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. *Int J Oncol*, 23, 269-84.
- PARKER, B. S., CIOCCA, D. R., BIDWELL, B. N., GAGO, F. E., FANELLI, M. A., GEORGE, J., SLAVIN, J. L., MOLLER, A., STEEL, R., POULIOT, N., ECKHARDT, B. L., HENDERSON, M. A. & ANDERSON, R. L. 2008. Primary tumour expression of the cysteine cathepsin inhibitor Stefin A inhibits distant metastasis in breast cancer. *J Pathol*, 214, 337-46.
- PERUSSIA, B. 1991. Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines. *Curr Opin Immunol*, 3, 49-55.
- PHILLIPS, R. J., BURDICK, M. D., LUTZ, M., BELPERIO, J. A., KEANE, M. P. & STRIETER, R. M. 2003. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med*, 167, 1676-86.
- PIETKIEWICZ, P. P., LUTKOWSKA, A., LIANERI, M. & JAGODZINSKI, P. P. 2010. Tamoxifen epigenetically modulates CXCL12 expression in MCF-7 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 64, 54-7.
- PODGORSKI, I. & SLOANE, B. F. 2003. Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem Soc Symp*, 263-76.
- PORCILE, C., BAJETTO, A., BARBIERI, F., BARBERO, S., BONAVIA, R., BIGLIERI, M., PIRANI, P., FLORIO, T. & SCHETTINI, G. 2005. Stromal cell-derived factor-1alpha (SDF-1alpha/CXCL12) stimulates ovarian cancer cell growth through the EGF receptor transactivation. *Exp Cell Res*, 308, 241-53.
- PROOST, P., VYNCKIER, A. K., MAHIEU, F., PUT, W., GRILLET, B., STRUYF, S., WUYTS, A., OPDENAKKER, G. & VAN DAMME, J. 2003. Microbial Toll-like receptor ligands differentially regulate CXCL10/IP-10 expression in fibroblasts and mononuclear leukocytes in synergy with IFN-gamma and provide a mechanism for enhanced synovial chemokine levels in septic arthritis. *Eur J Immunol*, 33, 3146-53.

- RANGER, G. S., THOMAS, V., JEWELL, A. & MOKBEL, K. 2004. Elevated cyclooxygenase-2 expression correlates with distant metastases in breast cancer. *Anticancer Res*, 24, 2349-51.
- RASSOW, J. H., KARIN 2006. *Biochemie*, Stuttgart, Alexander Bob, Konstantin Bob.
- REPNIK, U., STARR, A. E., OVERALL, C. M. & TURK, B. 2015. Cysteine cathepsins activate ELR chemokines and inactivate non-ELR chemokines. *J Biol Chem*.
- RICCARDI, C., SANTONI, A., BARLOZZARI, T., PUC CETTI, P. & HERBERMAN, R. B. 1980. In vivo natural reactivity of mice against tumor cells. *Int J Cancer*, 25, 475-86.
- RISTIMAKI, A., SIVULA, A., LUNDIN, J., LUNDIN, M., SALMINEN, T., HAGLUND, C., JOENSUU, H. & ISOLA, J. 2002. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*, 62, 632-5.
- ROBERT-KOCH-INITIUT. 2012. *Brustkrebs (Mammakarzinom)* [Online]. Robert Koch Insitut. Available:
<http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs.html>
 [Accessed 30.08.2012 2012].
- ROLLAND, P. H., MARTIN, P. M., JACQUEMIER, J., ROLLAND, A. M. & TOGA, M. 1980. Prostaglandin in human breast cancer: Evidence suggesting that an elevated prostaglandin production is a marker of high metastatic potential for neoplastic cells. *J Natl Cancer Inst*, 64, 1061-70.
- ROMAGNANI, P., ANNUNZIATO, F., LASAGNI, L., LAZZERI, E., BELTRAME, C., FRANCALANCI, M., UGUCCIONI, M., GALLI, G., COSMI, L., MAURENZIG, L., BAGGIOLINI, M., MAGGI, E., ROMAGNANI, S. & SERIO, M. 2001. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest*, 107, 53-63.
- ROMAGNANI, P., LASAGNI, L., ANNUNZIATO, F., SERIO, M. & ROMAGNANI, S. 2004. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol*, 25, 201-9.
- ROSE-HELLEKANT, T. A., ARENDT, L. M., SCHROEDER, M. D., GILCHRIST, K., SANDGREN, E. P. & SCHULER, L. A. 2003. Prolactin induces ERalpha-positive and ERalpha-negative mammary cancer in transgenic mice. *Oncogene*, 22, 4664-74.
- ROSHY, S., SLOANE, B. F. & MOIN, K. 2003. Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev*, 22, 271-86.
- ROTONDI, M., CHIOVATO, L., ROMAGNANI, S., SERIO, M. & ROMAGNANI, P. 2007. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr Rev*, 28, 492-520.
- ROTONDI, M., FALORNI, A., DE BELLIS, A., LAURETI, S., FERRUZZI, P., ROMAGNANI, P., BUONAMANO, A., LAZZERI, E., CRESCIOLI, C., MANNELLI, M., SANTEUSANIO, F., BELLASTELLA, A. & SERIO, M. 2005. Elevated serum interferon-gamma-inducible chemokine-10/CXC chemokine ligand-10 in autoimmune primary adrenal insufficiency and in vitro expression in human adrenal cells primary cultures after stimulation with proinflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 2357-63.

- RUGGIERO, V., TAVERNIER, J., FIERS, W. & BAGLIONI, C. 1986. Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-gamma. *J Immunol*, 136, 2445-50.
- SAD, S., MARCOTTE, R. & MOSMANN, T. R. 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8⁺ T cells into cytotoxic CD8⁺ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*, 2, 271-9.
- SAKAEDA, Y., HIROI, M., SHIMOJIMA, T., IGUCHI, M., KANEGAE, H. & OHMORI, Y. 2006. Sulindac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, selectively inhibits interferon-gamma-induced expression of the chemokine CXCL9 gene in mouse macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 339-44.
- SCHMID, B. C., RUDAS, M., REZNICZEK, G. A., LEODOLTER, S. & ZEILLINGER, R. 2004. CXCR4 is expressed in ductal carcinoma in situ of the breast and in atypical ductal hyperplasia. *Breast Cancer Res Treat*, 84, 247-50.
- SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T. & HUME, D. A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75, 163-89.
- SENTMAN, C. L., MEADOWS, S. K., WIRA, C. R. & ERIKSSON, M. 2004. Recruitment of uterine NK cells: induction of CXC chemokine ligands 10 and 11 in human endometrium by estradiol and progesterone. *J Immunol*, 173, 6760-6.
- SGADARI, C., FARBER, J. M., ANGIOLILLO, A. L., LIAO, F., TERUYA-FELDSTEIN, J., BURD, P. R., YAO, L., GUPTA, G., KANEGANE, C. & TOSATO, G. 1997. Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood*, 89, 2635-43.
- SHARMA, S., YANG, S. C., ZHU, L., RECKAMP, K., GARDNER, B., BARATELLI, F., HUANG, M., BATRA, R. K. & DUBINETT, S. M. 2005a. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4⁺ CD25⁺ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res*, 65, 5211-20.
- SHARMA, S., ZHU, L., YANG, S. C., ZHANG, L., LIN, J., HILLINGER, S., GARDNER, B., RECKAMP, K., STRIETER, R. M., HUANG, M., BATRA, R. K. & DUBINETT, S. M. 2005b. Cyclooxygenase 2 inhibition promotes IFN-gamma-dependent enhancement of antitumor responses. *J Immunol*, 175, 813-9.
- SHIN, S. Y., NAM, J. S., LIM, Y. & LEE, Y. H. 2010. TNFalpha-exposed bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote locomotion of MDA-MB-231 breast cancer cells through transcriptional activation of CXCR3 ligand chemokines. *J Biol Chem*, 285, 30731-40.
- SINHA, P., CLEMENTS, V. K., FULTON, A. M. & OSTRAND-ROSENBERG, S. 2007. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, 67, 4507-13.
- SLAMON, D. J., LEYLAND-JONES, B., SHAK, S., FUCHS, H., PATON, V., BAJAMONDE, A., FLEMING, T., EIERMANN, W., WOLTER, J., PEGRAM, M., BASELGA, J. & NORTON, L. 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344, 783-92.

- SMITH, M. C., LUKER, K. E., GARBOW, J. R., PRIOR, J. L., JACKSON, E., PIWNICA-WORMS, D. & LUKER, G. D. 2004. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res*, 64, 8604-12.
- SMYTH, M. J., HAYAKAWA, Y., TAKEDA, K. & YAGITA, H. 2002. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2, 850-61.
- SMYTH, M. J., KELLY, J. M., BAXTER, A. G., KORNER, H. & SEDGWICK, J. D. 1998. An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J Exp Med*, 188, 1611-9.
- SODHI, A. & TRIPATHI, A. 2008. Prolactin and growth hormone induce differential cytokine and chemokine profile in murine peritoneal macrophages in vitro: involvement of p-38 MAP kinase, STAT3 and NF-kappaB. *Cytokine*, 41, 162-73.
- SOSLOW, R. A., DANNENBERG, A. J., RUSH, D., WOERNER, B. M., KHAN, K. N., MASFERRER, J. & KOKI, A. T. 2000. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer*, 89, 2637-45.
- SPARMANN, A. & BAR-SAGI, D. 2004. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, 6, 447-58.
- SPECHT, K., HARBECK, N., SMIDA, J., ANNECKE, K., REICH, U., NAEHRIG, J., LANGER, R., MAGES, J., BUSCH, R., KRUSE, E., KLEIN-HITPASS, L., SCHMITT, M., KIECHLE, M. & HOEFLER, H. 2009a. Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 118, 45-56.
- SPECHT, K., HARBECK, N., SMIDA, J., ANNECKE, K., REICH, U., NÄHRIG, J., LANGER, R., MAGES, J., BUSCH, R., KRUSE, E., KLEIN-HITPASS, L., SCHMITT, M., KIECHLE, M. & HÖFLER, H. 2009b. Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*, 118, 45-56.
- STAGG, J., LOI, S., DIVISEKERA, U., NGIOW, S. F., DURET, H., YAGITA, H., TENG, M. W. & SMYTH, M. J. 2011. Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 7142-7.
- STRIETER, R. M., BELPERIO, J. A., BURDICK, M. D., SHARMA, S., DUBINETT, S. M. & KEANE, M. P. 2004a. CXC chemokines: angiogenesis, immunoangiostasis, and metastases in lung cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1028, 351-60.
- STRIETER, R. M., BELPERIO, J. A., PHILLIPS, R. J. & KEANE, M. P. 2004b. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol*, 14, 195-200.
- STRIETER, R. M., POLVERINI, P. J., KUNKEL, S. L., ARENBERG, D. A., BURDICK, M. D., KASPER, J., DZUIBA, J., VAN DAMME, J., WALZ, A., MARRIOTT, D. & ET AL. 1995. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, 270, 27348-57.
- SUNG, B., JHURANI, S., AHN, K. S., MASTUO, Y., YI, T., GUHA, S., LIU, M. & AGGARWAL, B. B. 2008. Zerumbone down-regulates chemokine receptor CXCR4 expression leading to

- inhibition of CXCL12-induced invasion of breast and pancreatic tumor cells. *Cancer Res*, 68, 8938-44.
- SUYAMA, T., FURUYA, M., NISHIYAMA, M., KASUYA, Y., KIMURA, S., ICHIKAWA, T., UEDA, T., NIKAIDO, T., ITO, H. & ISHIKURA, H. 2005. Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant and monokine induced by IFN-gamma and of their receptor CXC receptor 3 in human renal cell carcinoma. *Cancer*, 103, 258-67.
- TAKAHATA, Y., TAKADA, H., NOMURA, A., NAKAYAMA, H., OHSHIMA, K. & HARA, T. 2003. Detection of interferon-gamma-inducible chemokines in human milk. *Acta Paediatr*, 92, 659-65.
- TANNENBAUM, C. S., TUBBS, R., ARMSTRONG, D., FINKE, J. H., BUKOWSKI, R. M. & HAMILTON, T. A. 1998. The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. *J Immunol*, 161, 927-32.
- THOMSSSEN, C., SCHMITT, M., GORETZKI, L., OPPELT, P., PACHE, L., DETTMAR, P., JANICKE, F. & GRAEFF, H. 1995. Prognostic value of the cysteine proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1, 741-6.
- VANDERCAPPELLEN, J., VAN DAMME, J. & STRUYF, S. 2008. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*, 267, 226-44.
- VASILJEVA, O., KOROVIN, M., GAJDA, M., BRODOEFEL, H., BOJIC, L., KRUGER, A., SCHURIGT, U., SEVENICH, L., TURK, B., PETERS, C. & REINHECKEL, T. 2008. Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice. *Oncogene*, 27, 4191-9.
- VASILJEVA, O., PAPAZOGLU, A., KRUGER, A., BRODOEFEL, H., KOROVIN, M., DEUSSING, J., AUGUSTIN, N., NIELSEN, B. S., ALMHOLT, K., BOGYO, M., PETERS, C. & REINHECKEL, T. 2006. Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res*, 66, 5242-50.
- VICARI, A. P. & CAUX, C. 2002. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 143-54.
- WALKER, W. & ROTONDO, D. 2004. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. *Immunology*, 111, 298-305.
- WALSER, T. C., MA, X., KUNDU, N., DORSEY, R., GOLOUBEVA, O. & FULTON, A. M. 2007. Immune-mediated modulation of breast cancer growth and metastasis by the chemokine Mig (CXCL9) in a murine model. *J Immunother*, 30, 490-8.
- WALSER, T. C., RIFAT, S., MA, X., KUNDU, N., WARD, C., GOLOUBEVA, O., JOHNSON, M. G., MEDINA, J. C., COLLINS, T. L. & FULTON, A. M. 2006. Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. *Cancer Res*, 66, 7701-7.
- WALZ, D. A., WU, V. Y., DE LAMO, R., DENE, H. & MCCOY, L. E. 1977. Primary structure of human platelet factor 4. *Thromb Res*, 11, 893-8.

- WENDEL, M., GALANI, I. E., SURI-PAYER, E. & CERWENKA, A. 2008. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Res*, 68, 8437-45.
- WENNBO, H., GEBRE-MEDHIN, M., GRITLI-LINDE, A., OHLSSON, C., ISAKSSON, O. G. & TORNELL, J. 1997. Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. *J Clin Invest*, 100, 2744-51.
- WENZEL, J., TOMIUK, S., ZAHN, S., KUSTERS, D., VAHSEN, A., WIECHERT, A., MIKUS, S., BIRTH, M., SCHELER, M., VON BUBNOFF, D., BARON, J. M., MERK, H. F., MAUCH, C., KRIEG, T., BIEBER, T., BOSIO, A., HOFMANN, K., TUTING, T. & PETERS, B. 2008. Transcriptional profiling identifies an interferon-associated host immune response in invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Int J Cancer*, 123, 2605-15.
- WHO. February 2012. *Cancer* [Online]. World Health Organisation. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> [Accessed 30.08.2012 2012].
- WILTROUT, R. H., MATHIESON, B. J., TALMADGE, J. E., REYNOLDS, C. W., ZHANG, S. R., HERBERMAN, R. B. & ORTALDO, J. R. 1984. Augmentation of organ-associated natural killer activity by biological response modifiers. Isolation and characterization of large granular lymphocytes from the liver. *J Exp Med*, 160, 1431-49.
- WITHANA, N. P., BLUM, G., SAMENI, M., SLANEY, C., ANBALAGAN, A., OLIVE, M. B., BIDWELL, B. N., EDGINGTON, L., WANG, L., MOIN, K., SLOANE, B. F., ANDERSON, R. L., BOGYO, M. S. & PARKER, B. S. 2012. Cathepsin B inhibition limits bone metastasis in breast cancer. *Cancer Res*, 72, 1199-209.
- WOLPE, S. D. & CERAMI, A. 1989. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J*, 3, 2565-73.
- YANG, J., MANI, S. A., DONAHER, J. L., RAMASWAMY, S., ITZYKSON, R. A., COME, C., SAVAGNER, P., GITELMAN, I., RICHARDSON, A. & WEINBERG, R. A. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117, 927-39.
- YANG, J. & RICHMOND, A. 2004. The angiostatic activity of interferon-inducible protein-10/CXCL10 in human melanoma depends on binding to CXCR3 but not to glycosaminoglycan. *Mol Ther*, 9, 846-55.
- YOKOE, T., IINO, Y., TAKEI, H., HORIGUCHI, J., KOIBUCHI, Y., MAEMURA, M., OHWADA, S. & MORISHITA, Y. 1997. Changes of cytokines and thyroid function in patients with recurrent breast cancer. *Anticancer Res*, 17, 695-9.
- YOSHIE, O., IMAI, T. & NOMIYAMA, H. 2001. Chemokines in immunity. *Adv Immunol*, 78, 57-110.
- YOUNG, S. D., LAFRENIE, R. M. & CLEMONS, M. J. 2012. Phase ii trial of a metronomic schedule of docetaxel and capecitabine with concurrent celecoxib in patients with prior anthracycline exposure for metastatic breast cancer. *Curr Oncol*, 19, e75-83.

ZIPIN-ROITMAN, A., MESHEL, T., SAGI-ASSIF, O., SHALMON, B., AVIVI, C., PFEFFER, R. M., WITZ, I. P. & BEN-BARUCH, A. 2007. CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res*, 67, 3396-405.

ZLOTNIK, A. 2004. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol*, 14, 181-5.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Holger Bronger, der mich über den gesamten Zeitraum der Arbeit betreut, begleitet, aufgemuntert und unterstützt hat. Vielen Dank für die wiederholte geduldige Korrektur meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Kommentare und Anmerkungen. Seine kompetente fachliche und menschliche Unterstützung trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in der klinischen Forschergruppe der Frauenklinik der Technischen Universität München bedanke ich mich bei Prof.Dr. Manfred Schmitt.

Bei Alexandra Stöckel sowie Anita Welk bedanke ich mich für die fachliche Einführung in die Laborarbeit sowie deren stetige Unterstützung und Aufmunterung.

Bei all meinen Kolleginnen und Kollegen in der Klinischen Forschergruppe möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre stetige Hilfsbereitschaft bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, welche mir die Möglichkeit zu dieser Ausbildung gegeben und mich jederzeit unterstützt und beraten haben.