



**Die Regulation des Chemokinrezeptors CXCR4 durch
Chemotherapeutika in Myelomzelllinien**
The regulation of chemokinreceptor CXCR4 by chemotherapeutics
in
myeloma cell lines

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Louis Widmaier

aus

Stuttgart

Würzburg 2023

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. rer. nat. Grit Hein

1. Betreuer: Prof. med. Franz Jakob

2. Betreuer: Prof. med. Franziska Jundt

3. Betreuer: Prof. rer. nat. Torsten Blunk

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled "The regulation of chemokine receptor CXCR4 by chemotherapeutics in myeloma cell lines" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Leipzig, den 12.01.2023
Place, Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation "Die Regulation des Chemokinrezeptors CXCR4 durch Chemotherapeutika in Myelomzelllinien" eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Leipzig, den 12.01.2023
Ort, Datum

Unterschrift

Abstract

Untersucht wurde der Einfluss mehrerer Chemotherapeutika auf den Chemokinrezeptor CXCR4 in Myelomzelllinien auf Ebene des Promotors, der mRNA und der Rezeptorverteilung, wobei drei Substanzen (Etoposid, Bortezomib und Dexamethason) als potenzielle Suppressoren des Promotors ausgemacht werden konnten. Abhängig vom Myelom-Zelltyp und der Dosierung können so evtl. Rückschlüsse auf die beobachtete Suppression von CXCR4 bei erkrankten Patienten mit hoher CXCR4-Aktivität (hier: Malignes Myelom) durch die begleitende Chemotherapie gezogen werden, welche eine Diagnostik und Therapie bei diesen Patienten erschwert.

Hintergrund: Hintergrund für diese Arbeit waren Beobachtungen in klinischen Fallstudien von Lapa et al. am Universitätsklinikum Würzburg, die sich auf CXCR4 bezogen, welches u.a. bei Patienten mit Multiplem Myelom überexprimiert wird und dadurch bereits als Target für Diagnostik und Therapie in der Klinik Anwendung findet. Dabei konnte bei PET-CT Untersuchungen in der Nuklearmedizin beobachtet werden, dass es durch die begleitende Chemotherapie der Patienten zu einer Suppression des markierten CXCR4-Signals kam, so dass es nicht mehr zur Verlaufsbeobachtung und vor allem nicht mehr zur Radiotherapie und Therapiekontrolle verwendet werden konnte.

Um den Einfluss und mögliche Interaktionen der Chemotherapeutika auf CXCR4 zu untersuchen, war es Ziel dieser Arbeit, ein vergleichbares Szenario in-vitro nachzustellen und Einflüsse messbar zu machen, um so mögliche Ansätze und Verbesserungsvorschläge für die klinische Anwendung zu liefern.

Methoden/Ergebnisse: Hierfür wurden im ersten Teil INA-6 (Myelomzellen) und Mesenchymale Stammzellen (MSC) kultiviert, in Ko-Kultur gebracht und nach einer bestimmten Zeit wieder getrennt, um anschließend den gegenseitigen Einfluss in Bezug auf CXCR4 zu messen. Zudem wurde der Einfluss von Dexamethason untersucht. Es zeigte sich eine enge Bindung zwischen INA-6 und MSC sowie eine hohe CXCR4-Aktivität bei INA-6, jedoch konnte keine Induktion der CXCR4-Aktivität in MSC durch INA-6-Kontakt oder Dexamethason quantifiziert werden. Die Immunzytologie erwies sich aufgrund einer schweren Anfärbbarkeit von CXCR4 – auch mit verschiedensten Antikörpern und sogar Liganden-gekoppeltem Farbstoff– als kaum auswertbar, wobei eine Darstellung von CXCR4 generell aber gelang.

Der CXCR4-Promotor wurde mittels Software genauer analysiert, wobei einige relevante Bindestellen, u.a. für Glukokortikoide und NFκB gefunden wurden. Die Herstellung eines CXCR4-pGI4.14-Promotor-Konstrukts war erfolgreich, ebenso dessen Einschleusung in Myelomzellen. Auch gelang die Herstellung stabiler transfizierter INA-6, sodass mit diesen anschließend konstantere Ergebnisse erzielt werden konnten.

Im größten Teil der Arbeit wurden geeignete Chemotherapeutika-Konzentrationen ermittelt und in Viabilitäts- und Apoptose-Versuchen überprüft. Die Stimulationsversuche mit diesen zeigten variable Effekte abhängig vom Zelltyp (INA-6, MM1S), jedoch konnten Bortezomib, Etoposid und Dexamethason konzentrationsabhängig als starke Suppressoren der CXCR4-Aktivität ausgemacht werden, was sich v.a. auf Ebene der Promotoraktivität – gemessen mittels Luciferase - zeigte.

Interpretation: In-vitro konnten somit drei potenzielle Suppressoren der CXCR4-Aktivität ausgemacht werden: Etoposid, Bortezomib und Dexamethason. Zumindest beim INA-6-Zelltyp fiel dieser Effekt deutlich aus, wobei in der Klinik der entsprechende Zelltyp sowie die Dosierung der Medikamente berücksichtigt werden müssen. Hinzu kommen weitere Einflussfaktoren des menschlichen Körpers, die nicht berücksichtigt werden konnten. Die genauen Mechanismen der Suppression könnten sich

aus den Bindestellen des Promotors erklären, die von uns analysiert wurden, aber auf die in weiteren Arbeiten noch näher eingegangen werden muss.

Abstract

The influence of several chemotherapeutic agents on the chemokine receptor CXCR4 in myeloma cell lines at the level of the promoter, the mRNA and the receptor distribution was examined, whereby three substances (etoposide, bortezomib and dexamethasone) could be identified as potential suppressors of the promoter. Depending on the cell type and the dosage, conclusions can be drawn about the observed suppression of CXCR4 in patients with diseases with high CXCR4 activity (here: multiple myeloma) due to the accompanying chemotherapy, which impairs therapeutic applications like diagnostic imaging using PET/CT and may in particular abolish the chances of radiotherapeutic intervention in these patients.

Background: The background for this work were observations in clinical case studies by Lapa et al. at the University Hospital Würzburg, which referred to CXCR4, which is overexpressed in patients with multiple myeloma and is therefore already used as a target for diagnostics and therapy in the clinic. During PET-CT examinations in nuclear medicine, it could be observed that the accompanying chemotherapy of the patients led to a suppression of the marked CXCR4 signal, which is why it could no longer be used for monitoring the follow-up, but also was lost as a radiotherapeutic target.

In order to investigate the influence and possible interactions of chemotherapeutic agents on CXCR4, the aim of this work was to simulate a comparable scenario *in vitro* and to make influences measurable in order to provide possible approaches and suggestions for improvement for clinical application.

Methods/Conclusions: For this purpose, INA-6 (myeloma cells) and mesenchymal stem cells (MSC) were cultivated in the first part, brought into co-culture and separated again after a certain time in order to then measure the mutual influence with regard to CXCR4 expression. The influence of dexamethasone was also examined. There were intensive contacts between INA-6 and MSC and high CXCR4 activity in INA-6, but no induction of CXCR4 activity in MSC by INA-6 or dexamethasone could be quantified. The immunocytology turned out to be difficult due to the difficulty of staining CXCR4 - even with a wide variety of antibodies and ligand-coupled dyes - although CXCR4 was generally able to be represented.

The CXCR4 promoter was analyzed in more detail using the Genomatix software, and some relevant binding sites, including response elements for glucocorticoids and NFκB, were found. The production of a CXCR4-pGL4.14 luciferase-reporter construct was successful, as was its introduction into myeloma cells. The production of stably transfected INA-6 was also successful, so that more constant results could then be achieved.

In a large part of the work, suitable chemotherapeutic concentrations were determined and checked in viability and apoptosis tests. The stimulation experiments with these showed variable effects depending on the cell type (INA-6, MM1S). However, depending on the concentration, bortezomib, etoposide and dexamethasone could be identified as strong suppressors of CXCR4 activity, which was particularly evident at the level of activity of our luciferase-reporter construct.

Interpretation: Overall, three potential suppressors of CXCR4 activity could be identified *in-vitro*: etoposide, bortezomib and dexamethasone. At least with the INA-6 cell type, this effect was clear, although the corresponding cell type and the dosage of the medication must be taken into account in the clinic. In addition, there may be other influencing factors of the human organism *in vivo* that could not be considered. The exact mechanisms of suppression could be explained by the binding sites of the promoter, which we analyzed, but which will have to be discussed in more detail in further work.

Inhaltsverzeichnis

I.	Einführung	S.8
I.1	Das Multiple Myelom	8
I.2	Die Myelom-Knochenerkrankung	11
I.3	CXCR4	13
I.4	Theranostik von CXCR4	14
I.5	Hintergründe zu den Versuchen	16
I.6	Ziel der Arbeit	17
II.	Methodik	S.18
II.1	Zellkultur.....	18
II.1.1	Zellen	18
II.1.2	Zellmedium.....	19
II.1.2.1	MSC-Medium	19
II.1.2.2	INA-6-Medium	19
II.1.2.3	MM1S-Medium.....	19
II.1.3	Zellkultivierung.....	19
II.1.3.1	Zellkultur MSC.....	20
II.1.3.2	Zellkultur INA6	20
II.1.3.3	Zellkultur MM1S	20
II.2	Interaktion zwischen MSC und INA-6-Zellen.....	21
II.2.1	Zellen	21
II.2.1.1	MSCs	21
II.2.1.2	INA-6-Zellen	21
II.2.2	Versuchsansätze.....	22
II.2.2.1	Färben und Sorten der Zellen	22
II.2.2.2	RNA-Isolation	24
II.2.2.3	RNA-Messung	25
II.2.2.4	cDNA-Synthese	25

II.2.2.5 PCR: Vervielfältigung der Proben-cDNA für Gelelektrophorese.....	26
II.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	26
II.2.2.7 Real Time PCR	27
II.2.3 Immunzytologie	30
II.2.3.1 Durchführung	30
II.2.3.2 Liganden-/Proteinfärbung von CXCL12	33
II.3 In-Vitro Chemotherapie mit <i>dexa-BEAM</i>	34
II.3.1 Ansatz der Chemotherapeutika	34
II.3.2 Bestimmung der rel. Viabilität und Apoptoserate	35
II.4 Analyse der CXCR4-Promotoraktivität	37
II.4.1 <i>In silico</i> Promotoranalyse	37
II.4.2 Klonierung des CXCR4-Promotors	37
II.4.2.1 Schneiden von pBSISK+—CXCR4 und pGI4.14	37
II.4.2.2 Gelelektrophorese	38
II.4.2.3 DNA-Extraktion aus dem Gel	38
II.4.2.4 Ligation mit T4-DNA-Ligase	38
II.4.2.5 Transformation kompetenter E.coli	38
II.4.2.6 Ausplattieren auf LB-Platten	39
II.4.2.7 Minipräparation	39
II.4.2.8 Sequenzierung	39
II.4.2.9 DNA-Plasmid Präparation	40
II.4.3 Transiente und stabile Transfektion von Myelomzellen_	40
II.4.3.1 Hygromycin-Verträglichkeitstest	41
II.4.3.2 Transfektion der Myelomzellen.....	41
II.4.3.3 Herstellung stabiler transfizierter Zellen	42
II.5 Stimulationsversuche mit transfizierten Myelomzellen	42
II.5.1 Stimulation	42
II.5.2 Messung der Luciferaseaktivität	43
II.5.3 Auswertung	43
II.5.4 Stimulation stabiler Zellen	43
II.5.4.1 WST-1 Assay	44
II.6 Stimulation und Transkriptionsaktivität	44
II.6.1 Stimulation & Isolation	44

II.6.2 Nachweis der CXCR4-Expression	44
III. Ergebnisse	S.46
III.1 Interaktion zwischen MSC und INA-6	46
III.1.1 CXCR4-Aktivität auf RNA-Ebene (PCR)	46
III.1.2 Quantifizierung der CXCR4-Aktivität (qPCR)	47
III.1.3 CXCR4-Aktivität auf Proteinebene	48
III.1.3.1 Immunzytologie	48
III.1.3.2 Nachweis der CXCR4 Expression durch Verwendung des farbstoffmarkierten Liganden SDF1 α	51
III.2 In-Vitro Chemotherapie mit dexa-BEAM	53
III.3 Charakterisierung des CXCR4 Promotors	58
III.3.1 In silico Promotoranalyse mittels Genomatix MatInspector	58
III.3.2 Klonierung des Promotors mittels pGI4.14	59
III.3.3 Hygromycin-Verträglichkeitstest.....	59
III.3.4 Transfektion der Myelomzellen INA6 und MM1S.....	60
III.3.4.1 Herstellung stabiler transfizierter Zellen	62
III.4 CXCR4 Promotoranalysen in Myelomzellen	63
III.4.1 Transient transfizierte INA-6-Zellen	63
III.4.2 Stabil transfizierte INA-6-Zellen	64
III.5 Stimulation und Transkriptionsaktivität (RNA-Messung)	70
III.5.1 Quantifizierung der CXCR4-Aktivität (qPCR)	70
IV. Diskussion	S.73
IV.1 CXCR4-Expression im Myelom-MSC-Kulturmodell	73
IV.1.1 PCR-Nachweis der CXCR4-mRNA-Expression.....	73
IV.1.2 Nachweis der CXCR4 Proteinexpression	74
IV.1.2.1 Immunzytologie	74
IV.1.2.2 Nachweis der CXCR4 Expression durch Verwendung des farbstoffmarkierten Liganden SDF1 α	75
IV.2 In Vitro-Chemotherapie mit <i>dexa BEAM</i>	75
IV.3 Charakterisierung des CXCR4 Promotors	76

IV.3.1 <i>In silico</i> Promotoranalyse mittels Genomatix MatInspector	76
IV.3.2 Klonierung des Promotors mittels pGL4.14	77
IV.3.3 Hygromycin-Verträglichkeitstest	77
IV.3.4 Transfektion der Myelomzellen INA6 und MM1S.....	78
IV.3.4.1 Herstellung stabiler transfizierter Zellen	78
IV.4 CXCR4 Promotoranalysen in Myelomzellen	79
IV.5 Stimulation und Transkriptionsaktivität (RNA-Messung)	80
V. Anhang	S.84
V.1 Verwendete Materialien & Kits	84
V.1.1 Zellmedien	84
V.1.2 Zellkultur	84
V.1.3 PCR und qPCR	85
V.1.4 Gelelektrophorese	85
V.1.5 Immunzytologie	85
V.1.6 <i>dexa-BEAM</i> Chemotherapie	86
V.1.7 Promotorversuche	86
V.2 Abbildungsverzeichnis	87
V.3 Literaturübersicht	88
V.4 Genomatix MatInspector Analyse	93

I. Einführung

I.1 Multiples Myelom (*Morbus Kahler*)

Die Relevanz dieser Erkrankung spiegelt sich in Zahlen wider. So handelt es sich beim Multiplen Myelom um die häufigste maligne Erkrankung des Knochens und Knochenmarks mit einer jährlichen Inzidenz von etwa 6000 pro 100.000 Personen in Deutschland¹. Das mittlere Erkrankungsalter liegt dabei zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr, wobei mehr Männer als Frauen betroffen sind.

Das Multiple Myelom gehört zur Gruppe der aggressiven B-Zell-Lymphome, welches wiederum zu den Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt wird. Handelt es sich beim Plasmozytom um eine (noch) auf einen lokalen Knochenmarksabschnitt beschränkte Ausprägung, betrifft das Multiple Myelom (MM) den gesamten Körper mit Absiedelungen an verschiedensten Stellen, auch außerhalb des Knochenmarks².

Als Ausgangspunkt für die Entstehung wird die unkontrollierte Proliferation eines Plasmazellklons angenommen. Dieser maligne transformierte Plasmazellklon, hervorgegangen aus einem B-Lymphozyten, befindet sich primär im Knochenmark und produziert dort ungehemmt große Mengen monoklonaler Immunglobuline (v.a. IgA und IgG) oder Leichtketten (v.a. *kappa*- und *delta*-Typ), auch Paraproteine genannt. Auch werden Osteoklasten-aktivierende und Osteoblasten-hemmende Substanzen sezerniert, die die für diese Erkrankung typischen Osteolysen und die pathologische Osteoporose verursachen³.

Die Einteilung des MM erfolgt nach der Art des sezernierten Produkts, der Lokalisation, des Ausbreitungstyps und des jeweiligen Verlaufs⁴.

Die Symptome der Erkrankung leiten sich von ihrer Pathophysiologie ab und beruhen auf der ungehemmten Sezernierung der (defekten) Immunglobuline oder Paraproteine, die immunkompetent sind und zudem die übrige Synthese im Knochenmark verdrängen³. Durch den malignen Charakter kommt es zur Bildung von Metastasen im Knochenmark, Knochen und auch peripheren Organen.

Die PatientInnen leiden vor allem unter den Folgen der verdrängten Hämatopoese, die sich in einer Panzytopenie widerspiegeln kann sowie einer erhöhten Infektanfälligkeit durch einen sekundären Antikörpermangel. Dies führt zu einer ausgeprägten B-Symptomatik, also Gewichtsverlust, Fieber, Nachtschweiß und Abgeschlagenheit. Die weiteren Symptome² erklären sich aus der übermäßigen Fehlproduktion von Immunglobulinen und/oder deren Bestandteilen (leichte und schwere Ketten), die sich in Ablagerungen in den Nierentubuli bzw. einer Immunglobulin (IG)-assoziierten Amyloidose mit einem daraus folgenden nephrotischen Syndrom und einer Niereninsuffizienz widerspiegelt. Ein

¹ Zentrum für Krebsregisterdaten, RKI: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Multiples%20Myelom/multiples_myelom_node.html, 14.11.2020

² Patienten-Handbuch *Multiples Myelom*, Nat. Centrum für Tumorerkrankungen Heidelberg, Universitätsklinikum Heidelberg, 2018

³ Silbermann R, Roodman GD. Myeloma bone disease: Pathophysiology and management. *J Bone Oncol.* 2013 Apr 18;2(2):59-69. doi: 10.1016/j.jbo.2013.04.001. PMID: 26909272; PMCID: PMC4723362.

⁴ Onkopedia. *Letlinie Multiples Myelom*. [Online] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. [Zitat vom: 23. 09 2020.] file:///H:/Labor/Literatur/Multiples%20Myelom_Leitlinie%20%E2%80%94%20Onkopedia.html.

sehr belastendes und typisches Symptom für die PatientInnen stellen die ausgeprägten Knochenschmerzen dar, die durch den vermehrten Knochenabbau zustande kommen und bei ca. 90% der PatientInnen vorliegen¹¹. Es kommt zu spontanen pathologischen Frakturen, die v.a. die Wirbelsäule, den Schädel, das Becken und die langen Röhrenknochen betreffen, und einen starken Leidensdruck verursachen. Dieser Knochenabbau führt zudem zu einer vermehrten Kalzium-Freisetzung aus den Knochen, was zu einer Hyperkalzämie oder gar hyperkalzämischen Krise führen kann.

Der Manifestation der Erkrankung geht in der Regel über eine lange Vorlaufzeit eine meßbare monoklonale Gammopathie voraus, die als Vorstufe der malignen Erkrankung betrachtet werden kann⁵, die aber nicht zwingend im Verlauf des Lebens in eine maligne Krankheit übergehen muss. Was die Interaktion mit dem Knochen angeht, so muss konstatiert werden, dass es auch in dieser Phase der „Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz“, MGUS, bereits zu einem diffusen Knochenverlust mit erhöhter Inzidenz an Instabilitätsfrakturen kommen kann⁶. Auch eine Schädigung der Niere durch die pathologischen Proteine kann auftreten, in deren Gefolge sowohl eine Schädigung der Filtrationsleistung auftreten kann als auch ein Phosphatverlust-Syndrom / Fanconi-Syndrom, welches sich in einer Osteomalazie mit Frakturen manifestieren kann⁷. Diese verschiedenen Manifestationen führten zu der neuen Terminologie der „Monoclonal Gammopathy of undetermined significance MGUS““ oder Monoclonal Gammopathy of renal significance MGRS“ respektive „Monoclonal Gammopathy of skeletal significance MGSS“.

Zur Diagnostik können Labor, Bildgebung und Knochenmarks-Biopsie herangezogen werden⁸. Hinweise im Labor können die sekundäre Anämie, Hyperkalzämie, Kreatinin-Erhöhung oder eine „Sturzsenkung“ der Blutsenkungsgeschwindigkeit sein. Deutlich ist auch der in der Serumelektrophorese sichtbare M-Gradient im Sinne einer monoklonalen Gammopathie, wobei die vermehrte Sekretion von Immunglobulinen bzw. Leichtketten zu einer Erhöhung der Gammaglobulin-Fraktion führt. Diese Leichtketten können v.a. auch im Urin festgestellt werden.

⁵ Monoclonal gammopathy of undetermined significance and bone health outcomes: a systematic review and exploratory meta-analysis. Veronese N, Luchini C, Solmi M, Sergi G, Manzano E, Stubbs B. *J Bone Miner Metab.* 2018 Jan;36(1):128-132. doi: 10.1007/s00774-017-0817-8. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28243796

⁶ Bone disease in monoclonal gammopathy of undetermined significance: results from a screened population-based study. Thorsteinsdottir S, Lund SH, Lindqvist EK, Thordardottir M, Sigurdsson G, Costello R, Burton D, Steingrimsdottir H, Gudnason V, Eiriksdottir G, Siggeirsdottir K, Harris TB, Landgren O, Kristinsson SY. *Blood Adv.* 2017 Dec 21;1(27):2790-2798. doi: 10.1182/bloodadvances.2017010454. eCollection 2017 Dec 26.

⁷ Acquired Fanconi syndrome secondary to light chain deposition disease associated with monoclonal gammopathy of renal significance: A case report. Tu H, Mou L, Zhu L, Jiang Q, Gao DS, Hu Y. *Medicine (Baltimore).* 2018 Sep;97(36):e12027. doi: 10.1097/MD.0000000000012027. PMID: 30200082

⁸ Multiple Myeloma: 2018 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management, S. Vincent Rajkumar, *Am J Hematol;* 93(8): 981–1114. doi:10.1002/ajh.25117

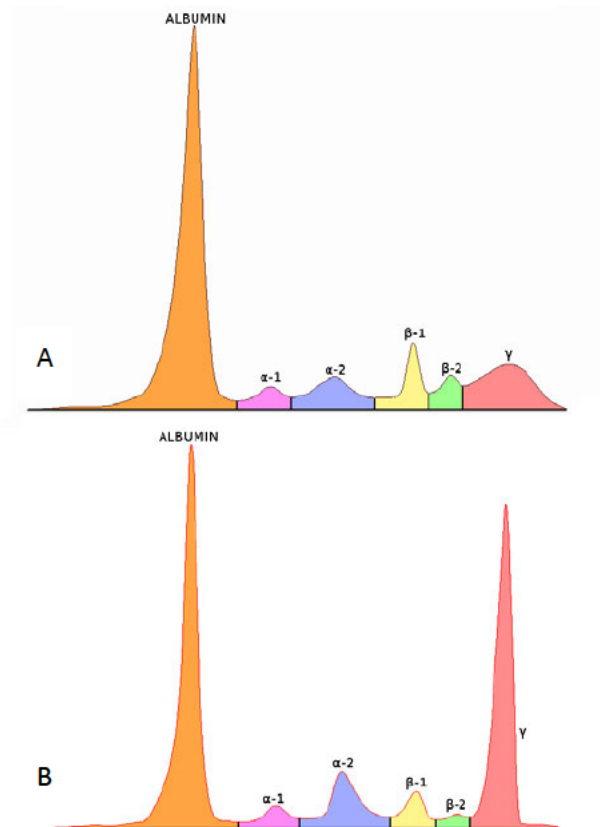


Abb. 1: **Serumelektrophorese mit sogenanntem „M-Gradient“** **A:** Normalbefund der Serumelektrophorese. **B:** dargestellt ist die deutlich erhöhte γ -Fraktion bei Erkrankungen mit Paraprotein-Erhöhung wie dem Multiplen Myelom.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b3/Serum_protein_electrophoresis_normal_and_paraprotein.png (18.01.2022)

Die Bildgebung ergänzt die Untersuchungen im Labor, wobei auf das ganze Spektrum der Möglichkeiten zurückgegriffen werden kann⁴. Als Standarduntersuchung gilt das Low-Dose-Ganzkörper-CT zur Diagnostik von Osteolysen. Auch die konventionelle Röntgendiagnostik nach dem „Pariser Schema“ gibt Hinweise auf Osteolysen. Das MRT zur Diagnostik extramedullärer Manifestationen und die Positron-Emissions-Tomografie (PET) zur Beurteilung der malignen Aktivität ergänzen die Bildgebung.

Als Goldstandard gilt nach wie vor die Knochenmarksbiopsie, wobei eine nestförmige Infiltration des Knochenmarks mit Plasmazellen (>10%) die Diagnose erhärtet und zusammen mit mindestens einem *SLiM-CRAB-Kriterium* und/oder einer extramedullären MM-Manifestation zur endgültigen Diagnose führt⁹.

Für die Einteilung des MM in Stadien und damit die Einschätzung der Prognose werden mehrere Parameter zusammengenommen und traditionell nach Durie und Salmon bzw. der ISS-Klassifikation eingeteilt¹⁰.

⁹ Patienten-Handbuch *Multiplres Myelom*, Nat. Centrum für Tumorerkrankungen Heidelberg, Universitätsklinikum Heidelberg, 2018, Seite 14

¹⁰ International myeloma foundation: <https://www.myeloma.org/international-staging-system-iss-revised-iss-r-iss>, <https://www.myeloma.org/durie-salmon-staging>, 14.11.2020

Nach wie vor stellt das MM eine schwere Erkrankung dar, deren Progress aber durch immer neue Therapieverfahren länger hinausgezögert werden kann¹¹. Die einzige kurative Therapieform stellt im Moment die allogene Stammzell-Transplantation dar, die jedoch nur bei jüngeren PatientInnen ohne Komorbiditäten zur Anwendung kommt. Für die übrige Therapie gibt es je nach Zentrum verschiedene Studienprotokolle, die sich an bestimmten Kriterien orientieren¹². Jedoch spielt das Patientenalter stets die wichtigste Rolle. Gegliedert ist die Therapie nach Induktion und Erhaltung. Bei jüngeren PatientInnen unter 60 Jahren und ohne Begleiterkrankungen erfolgt die Induktionstherapie i.d.R. mit Bortezomib und Dexamethason, gefolgt von einer autologen Stammzell-Transplantation. Die Erhaltungstherapie wird i.d.R. mit Lenalidomid und Steroiden durchgeführt, wobei ständig neue Therapieansätze auf den Markt kommen¹³. Ältere PatientInnen über 60 Jahre oder mit Komorbiditäten erhalten in der Regel eine reine Chemotherapie mit Melphalan und Prednisolon als Basis in Kombination mit Bortezomib oder Thalidomid oder Lenalidomid¹⁴. Ziel hierbei ist die Stabilisierung der Erkrankung, nicht die Heilung. Hinzu kommen unterstützenden Maßnahmen wie Bestrahlung, Gabe von Bisphosphonaten oder die Substitution fehlender Substanzen und andere Maßnahmen, die der Symptomlinderung dienen.

Auf die einzelnen Chemotherapeutika soll später noch einmal genauer eingegangen werden, da deren Auswahl für die Versuche eine wichtige Rolle spielten.

Das Multiple Myelom stellt demnach eine schwerwiegende Erkrankung dar, die generell lediglich mit einer Stammzelltransplantation zu heilen ist und meist mit einem hohen Leidensdruck bei den PatientInnen verbunden ist. Gerade die Tatsache, dass die Beteiligung des Knochens eine zentrale Rolle spielt, rückte diese Erkrankung in den Fokus dieser Forschungsarbeit.

I.2 Die Myelom-Knochenerkrankung

Pathophysiologisch stellt sich die Interaktion zwischen Mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Myelomzellen als ausschlaggebend für die Entstehung der multiplen Knochenmetastasen und Osteolysen heraus¹⁵, wobei sich in den letzten Jahren endokrine Signalwege als Schlüsselstelle für die Knochen-Tumor-Interaktion erwiesen haben. Das Mikroumgebung der Zellen wird dabei von einer Vielzahl an Signalmolekülen gesteuert, die neben der Differenzierung der MSC zu Osteoblasten über z.B. *RUNX2* und *Osterix* als Core-Transkriptionsfaktoren auch zur Regulierung der Osteoklasten-Aktivität über z.B. zwei grundlegende Osteoklasten-Transkriptionsfaktoren wie den *MCSF-Rezeptor* und *RANKL* beitragen¹⁶.

¹¹ Multiple Myeloma, Version 2.2016: Clinical Practice Guidelines in Oncology, Kenneth C. et al., J Natl Compr Canc Netw. 2015 November; 13(11): 1398–1435

¹² Therapy for Relapsed Multiple Myeloma: Guidelines From the Mayo Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy, Dingli et al., Mayo Clin Proc. 2017 April; 92(4): 578–598. doi:10.1016/j.mayocp.2017.01.003

¹³ Rodríguez-Lobato LG, Ganzetti M, Fernández de Larrea C, Hudecek M, Einsele H, Danhof S. CAR T-Cells in Multiple Myeloma: State of the Art and Future Directions. Front Oncol. 2020;10:1243. Published 2020 Jul 28. doi:10.3389/fonc.2020.01243

¹⁴ Endspurt Klinik Innere und Chirurgie, Skript 2, Blut, Blutbildung, Atmungssystem, George Thieme Verlag, 2. überarbeitete Auflage, S.60-63

¹⁵ Silbermann R, Roodman GD. Myeloma bone disease: Pathophysiology and management. J Bone Oncol. 2013 Apr 18;2(2):59-69. doi: 10.1016/j.jbo.2013.04.001. PMID: 26909272; PMCID: PMC4723362.

¹⁶ Hofbauer LC, Rachner TD, Coleman RE, Jakob F. Endocrine aspects of bone metastases. The lancet. Diabetes & Endocrinology. 2014 Jun;2(6):500-512. DOI: 10.1016/s2213-8587(13)70203-1

Liegt normalerweise im Gesunden eine Balance zwischen Knochenaufbau und -abbau vor, kommt es beim Multiplen Myelom über die vermehrte Stimulation der Osteoklasten durch MM-Zellen z.B. über *RANKL*-Faktor oder *MPI-1 α/β* oder die Hemmung von Osteoblasten über z.B. *DKK1* (*Dickkopf-1*), um nur einige zu nennen, zu einer Imbalance mit vermehrten Knochenabbau¹⁷. Die dabei freigesetzten Signalstoffe wie Zytokine und Wachstumsfaktoren führen ihrerseits wiederum zu einem weiteren Tumorwachstum (s. folgende Abbildung).

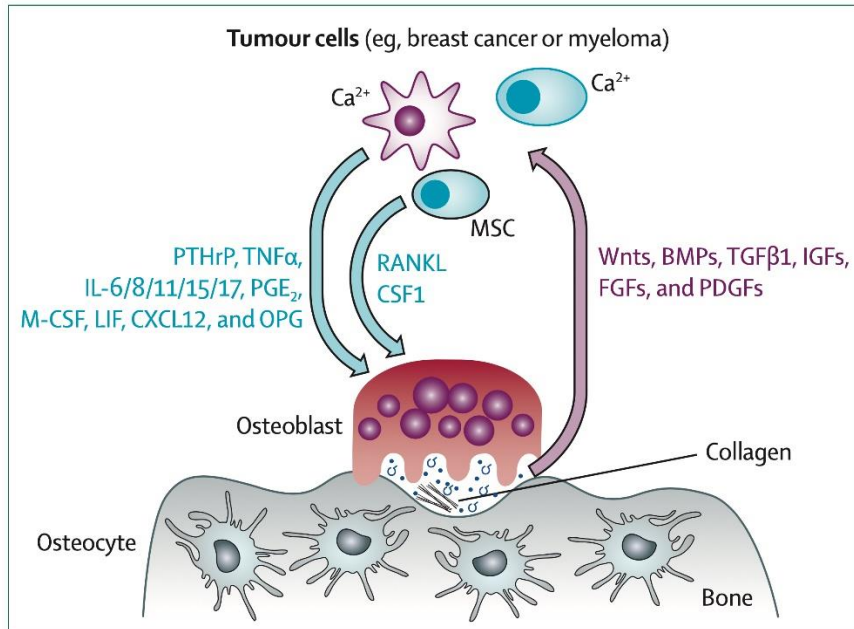


Abb. 2: **(In-) Direkte Interaktion zwischen Tumorzellen und Osteoklasten**

Hofbauer LC, Rachner TD, Coleman RE, Jakob F. Endocrine aspects of bone metastases. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*. 2014 Jun;2(6):500-512. DOI: 10.1016/s2213-8587(13)70203-1

Die Entdeckung dieser Signalstoffe und Interaktionen ermöglichte neue Zielstrukturen und Ansätze für die antiresorptive Therapie gegen vermehrten Knochenabbau und die Entstehung von Knochenmetastasen, wobei beispielhaft der *RANKL*-Inhibitor *Denosumab* zu erwähnen ist¹⁸.

Durch die direkte oder indirekte Interaktion der Myelomzellen mit den MSC und auch mit den reiferen skelettalen Zellen kommt es auch bei diesen selbst zu Veränderung durch Stimulation bestimmter Faktoren und Veränderungen des Microenvironments¹⁹. So konnte z.B. gezeigt werden, dass es bei MSC durch den direkten Zell-Zell-Kontakt in Ko-Kultur zu einer Überexpression des *KISS1*-Rezeptors (*KISS1R*) kommt²⁰.

¹⁷ Multiple Myeloma and Bone: The Fatal Interaction, Silvia Marino and G. David Roodman, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018;8:a031286

¹⁸ Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, Lichinitser M, Fujiwara Y, Yardley DA, Viniestra M, Fan M, Jiang Q, Dansey R, Jun S, Braun A. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J Clin Oncol*. 2010 Dec 10;28(35):5132-9. doi: 10.1200/JCO.2010.29.7101. Epub 2010 Nov 8. PMID: 21060033.

¹⁹ Fernando RC, Mazzotti DR, Azevedo H, et al. Transcriptome Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Myeloma Patients Reveals Downregulation of Genes Involved in Cell Cycle Progression, Immune Response, and Bone Metabolism. *Sci Rep*. 2019;9(1):1056. Published 2019 Jan 31. doi:10.1038/s41598-018-38314-8

²⁰ Dotterweich J, Tower RJ, Brandl A, et al. The *KISS1* Receptor as an In Vivo Microenvironment Imaging Biomarker of Multiple Myeloma Bone Disease. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155087. Published 2016 May 9. doi:10.1371/journal.pone.0155087

Neben dem *KISS1R* wurde dabei auch der CXCR4-Rezeptor untersucht, welcher in den Zellen des Knochenmarks weit verbreitet ist und auch beim Multiplen Myelom eine wichtige Rolle spielt²¹, und auf welchen im Folgenden näher eingegangen werden soll.

I.3 CXCR4

Beim CXCR4-Rezeptor, auch *CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4* oder *Stromal cell-derived factor 1 receptor* genannt, handelt es sich um einen Gi-Protein-gekoppelten Transmembran-Rezeptor, welcher das Chemokin *CXCL12*, auch *stromal cell-derived factor 1a (SDF1a)* genannt, als Liganden bindet. Seinen Effekt vermittelt der Rezeptor u.a. über den *MAPK*- und *β-Arrestin*-Signalweg, welche dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor in den Zellen nachgeschaltet sind. Der *CXCR4-CXCL12*-Pathway ist im menschlichen Körper weit verbreitet und spielt vor allem in der embryonalen Entwicklung eine entscheidende Rolle²². Nachgeschaltete Signalwege wie *RAS-MAPK*, *PI3K-AKT-mTOR*, *JAK-STAT* regulieren über Chemotaxis die Mobilisation und Migration der Zellen.

Hervorzuheben ist dabei die Rolle von CXCR4 bei der Adhärenz von hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen (*hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs)*) in Nischen des Knochenmarks. Diese CXCR4-exprimierenden Vorläuferzellen werden im Falle einer Verletzung, bei Zellstress oder einer notwendigen Regeneration mittels *CXCL12/CXCR4*-Signalweg in die Peripherie mobilisiert. Dabei besteht ein konstanter Fluss der Zellen zwischen Peripherie und Knochenmark, welcher über Endothelzellen und Stromazellen des Knochenmarks mittels *CXCL12* gesteuert wird.²³

Die Bedeutung für die Embryogenese konnte zudem in *knock-out*-Modellen von Mäusen gezeigt werden, bei denen ein Fehlen dieses Signalwegs zum embryonalen Tod der Mäuse führte²⁴.

Besonders häufig ist es zudem im Knochenmark, den Lymphknoten, Lunge, Herz und Leber zu finden.

Neben dem Einfluss auf die Migration von Stammzellen konnte die große Bedeutung des *CXCR4-CXCL12*-pathways auch bei der HIV-Infektion, der Inflammation, der rheumatoiden Arthritis, der Entstehung von Atherosklerose und der Aneurysma-Bildung aufgezeigt werden, um nur einige zu nennen²⁵. Beim HI-Virus erfolgt die Membranfusion des Virus mit der Wirtszelle über bestimmte Membran-Proteine, wobei auch CXCR4 als Co-Faktor neben CCR-5 eine wichtige Rolle spielt.²⁶ Dies könnte für eine mögliche Internalisierung des Rezeptors eine entscheidende Rolle spielen. Die Bedeutung dessen sieht man auch daran, dass der Inhibierung von CXCR4 in der Anti-HIV-Therapie

²¹ Ullah TR. The role of CXCR4 in multiple myeloma: Cells' journey from bone marrow to beyond. *J Bone Oncol*. 2019;17:100253. Published 2019 Jul 16. doi:10.1016/j.jbo.2019.100253

²² Kawaguchi N, Zhang TT, Nakanishi T. Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. *Cells*. 2019 Feb 20;8(2):185. doi: 10.3390/cells8020185. PMID: 30791675; PMCID: PMC6406665.

²³ Pawig L, Klasen C, Weber C, Bernhagen J, Noels H. Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives. *Front Immunol*. 2015 Aug 21;6:429. doi: 10.3389/fimmu.2015.00429. PMID: 26347749; PMCID: PMC4543903.

²⁴ Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996 Aug 15;382(6592):635-8. doi: 10.1038/382635a0. PMID: 8757135.

²⁵ Kircher M, Herhaus P, Schottelius M, et al. CXCR4-directed theranostics in oncology and inflammation. *Ann Nucl Med*. 2018;32(8):503-511. doi:10.1007/s12149-018-1290-8

²⁶ Xiao T, Cai Y, Chen B. HIV-1 Entry and Membrane Fusion Inhibitors. *Viruses*. 2021 Apr 23;13(5):735. doi: 10.3390/v13050735. PMID: 33922579; PMCID: PMC8146413

mit dem Antagonisten AMD3100 bereits eine konkrete klinische Rolle zukommt.²⁷ Zudem konnte im Mausmodell die Bedeutung des Signalwegs für die Regeneration und Verbesserung der Herzfunktion nach ischämischem Herzinfarkt gezeigt werden, da es im Vergleich zur Kontrollgruppe zur deutlichen Abnahme der kardialen Fibrosierung kam.²⁸

Entscheidend auch für die hier vorliegende Arbeit war v.a. die Bedeutung bei der Karzinogenese verschiedener Malignitäten²⁹, darunter Brust-, Lungen-, Kolorektal- und Prostatakrebs, und in erster Linie bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Dort führt der CXCR4-CXCL12-pathway über die Stimulation verschiedener Signalwege zur Veränderung des zellulären Microenvironments, was die Metastasierung, Immunsuppression und Zellproliferation zur Folge hat und damit maßgeblich am Tumorprogress beteiligt ist³⁰.

Mit diesem Hintergrundwissen über die herausragende Bedeutung des CXCR4-CXCL12-Signalwegs wurde dieser zum neuen Target in Diagnostik und Therapie, über welches man klinisch Einfluss auf die Erkrankung nehmen möchte.

I.4 Theranostik von CXCR4^{31 32 33 34}

Die besonders hohe Expression von CXCR4 bei hämatopoetischen Erkrankungen auf der Zelloberfläche und die damit einhergehende negative Prognose³⁵ machte man sich für eine CXCR4/CXCL12-gezielte Bildgebung zu eigen. Im Sinne der translationalen Medizin konnte CXCR4 in der Nuklearmedizin als geeignete Zielstruktur ausgemacht werden. Folglich kam es zur Entwicklung verschiedener radioaktiv markierter Moleküle, wobei sich [⁶⁸Ga] *Pentixafor*³⁶ und mit ¹⁷⁷Lu oder ⁹⁰Y gelabeltes *Pentixather*³⁷ als die in-vivo geeignetsten und heutzutage am meisten verwendeten Moleküle erwiesen, mit denen der CXCR4-Rezeptor gezielt angegangen werden kann. Die Bildgebung

²⁷ Poty S, Désogère P, Goze C, Boschetti F, D'huys T, Schols D, Cawthorne C, Archibald SJ, Maëcke HR, Denat F. New AMD3100 derivatives for CXCR4 chemokine receptor targeted molecular imaging studies: synthesis, anti-HIV-1 evaluation and binding affinities. *Dalton Trans.* 2015 Mar 21;44(11):5004-16. doi: 10.1039/c4dt02972k. PMID: 25640878.

²⁸ Sundararaman S, Miller TJ, Pastore JM, Kiedrowski M, Aras R, Penn MS. Plasmid-based transient human stromal cell-derived factor-1 gene transfer improves cardiac function in chronic heart failure. *Gene Ther.* 2011 Sep;18(9):867-73. doi: 10.1038/gt.2011.18. Epub 2011 Apr 7. PMID: 21472007; PMCID: PMC3169804.

²⁹ Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res.* 2014;124:31-82. doi:10.1016/B978-0-12-411638-2.00002-1

³⁰ Scala S, D'Alterio C, Milanese S, et al. New Insights on the Emerging Genomic Landscape of CXCR4 in Cancer: A Lesson from WHIM. *Vaccines (Basel).* 2020;8(2):164. Published 2020 Apr 3. doi:10.3390/vaccines8020164

³¹ Kircher M, Herhaus P, Schottelius M, et al. CXCR4-directed theranostics in oncology and inflammation. *Ann Nucl Med.* 2018;32(8):503-511. doi:10.1007/s12149-018-1290-8

³² Mesguich C, Zanotti-Fregonara P, Hindié E. New Perspectives Offered by Nuclear Medicine for the Imaging and Therapy of Multiple Myeloma. *Theranostics.* 2016;6(2):287-290. Published 2016 Jan 1. doi:10.7150/thno.14400

³³ Eckert F, Schilbach K, Klumpp L, et al. Potential Role of CXCR4 Targeting in the Context of Radiotherapy and Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:3018. Published 2018 Dec 21. doi:10.3389/fimmu.2018.03018

³⁴ CXCR4-targeted theranostics in oncology. Buck AK, Serfling SE, Lindner T, Hänscheid H, Schirbel A, Hahner S, Fassnacht M, Einsele H, Werner RA. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2022 Jun 8. doi: 10.1007/s00259-022-05849-y. Online ahead of print. PMID: 35674738

³⁵ Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B. CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2015;6(7):5022-5040. doi:10.18632/oncotarget.3217

³⁶ Lapa C, Schreder M, Schirbel A, et al. [⁶⁸Ga]Pentixafor-PET/CT for imaging of chemokine receptor CXCR4 expression in multiple myeloma - Comparison to [¹⁸F]FDG and laboratory values. *Theranostics.* 2017;7(1):205-212. Published 2017 Jan 1. doi:10.7150/thno.16576

³⁷ Habringer S, Lapa C, Herhaus P, et al. Dual Targeting of Acute Leukemia and Supporting Niche by CXCR4-Directed Theranostics. *Theranostics.* 2018;8(2):369-383. Published 2018 Jan 1. doi:10.7150/thno.21397

über PET-CT³⁸, mit der die radioaktiv markierten Stellen dargestellt werden können, ermöglicht v.a. die Darstellung zusätzlicher maligner Läsionen mit besonders hoher CXCR4-Aktivität bzw. das erneute Erkennen des Wiederauftretens nach Remission. In einigen Studien wurde das bereits an PatientInnen getestet, die an unterschiedlichen malignen hämatopoetischen Erkrankungen litten,³⁹ darunter akuter myeloischer Leukämie (AML), chronischer lymphatischer Leukämie (CLL), Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und dem Multiplen Myelom (MM). *Pentixather* wurde bereits als Therapeutikum in der Endoradiotherapie (ERT) verwendet⁴⁰, wobei sich jedoch im Gesamtüberleben noch keine signifikanten Unterschiede gezeigt hatten. Aktuell sind diese Strukturen und Moleküle im Rahmen der CXCR4-gerichteten Bildgebung und der Radionuklid-Therapie Gegenstand weiterer Forschungen.

Ein Problem, das sich bei den Heilversuchen an PatientInnen mit verschiedenen hämatopoetischen Erkrankungen im Verlauf zeigte, so auch bei *Lapa et al.*, war die Tatsache, dass die CXCR4-Expression sehr inhomogen war: die PatientInnen erhielten je nach Schema weiterhin ihre Chemotherapeutika, da eine Therapie mit *Pentixather* alleine noch nicht zugelassen oder logistisch schwierig war bzw. die PatientInnen in einem so fortgeschrittenen, aggressiven Stadium ihrer Erkrankung waren, dass auf eine begleitende Chemotherapie nicht verzichtet werden konnte. In der Folge kam es in einer kleinen Gruppe von drei PatientInnen zur Suppression der CXCR4-Aktivität, sodass diese nicht mehr als suffizienter Marker für die weitere Theranostik verwendet werden konnte⁴¹. Speziell zeigte sich das bei der Dosimetrie, mit der die Organ- und Tumorspezifische Dosis der Strahlung berechnet bzw. dargestellt werden sollte. Nach einmaliger Gabe des *dexa-BEAM*⁴²-Schemas (Dexamethason, Carmustin, Etoposid, Cytarabin, Melphalan) nach prä-therapeutischer Dosimetrie, konnte bei der erneuten Dosimetrie nach sieben Wochen keine CXCR4-Aktivität mehr festgestellt werden, obgleich die Erkrankung nach Beurteilung der Serumparameter noch auf demselben Stand wie zuvor verblieben war. *Dexa-BEAM* wurde dabei über fünf Tage verabreicht. Auch bei den anderen beiden PatientInnen konnten vergleichbare Effekte durch Gabe ähnlicher Chemotherapeutika beobachtet werden, die z.T. sogar histologisch bestätigt werden konnten, und die eine weitere Therapie mit CXCR4-gerichteten Therapeutika nicht mehr möglich machten. Dabei muss eine gewisse Heterogenität des Effekts der Chemotherapeutika, abhängig von Erkrankung und PatientIn, berücksichtigt werden, die z.T. auch zu einer Erholung der CXCR4-Aktivität führte.

³⁸ Sachpekidis C, Goldschmidt H, Dimitrakopoulou-Strauss A. Positron Emission Tomography (PET) Radiopharmaceuticals in Multiple Myeloma. *Molecules*. 2019;25(1):134. Published 2019 Dec 29. doi:10.3390/molecules25010134

³⁹ Wester HJ, Keller U, Schottelius M, et al. Disclosing the CXCR4 expression in lymphoproliferative diseases by targeted molecular imaging. *Theranostics*. 2015;5(6):618-630. Published 2015 Mar 1. doi:10.7150/thno.11251

⁴⁰ Lapa C, Herrmann K, Schirbel A, et al. CXCR4-directed endoradiotherapy induces high response rates in extramedullary relapsed Multiple Myeloma. *Theranostics*. 2017;7(6):1589-1597. Published 2017 Apr 8. doi:10.7150/thno.19050

⁴¹ Lapa et al., Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy, *BJH* Vol. 184 Issue 3 Pages 440-443, Feb. 2019, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15096>

⁴² Josting A, Reiser M, Wickramanayake PD, Rueffer U, Draube A, Söhngen D, Tesch H, Wolf J, Diehl V, Engert A. Dexamethasone, carmustine, etoposide, cytarabine, and melphalan (dexa-BEAM) followed by high-dose chemotherapy and stem cell rescue--a highly effective regimen for patients with refractory or relapsed indolent lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2000 Mar;37(1-2):115-23. doi: 10.3109/10428190009057634. PMID: 10721775.

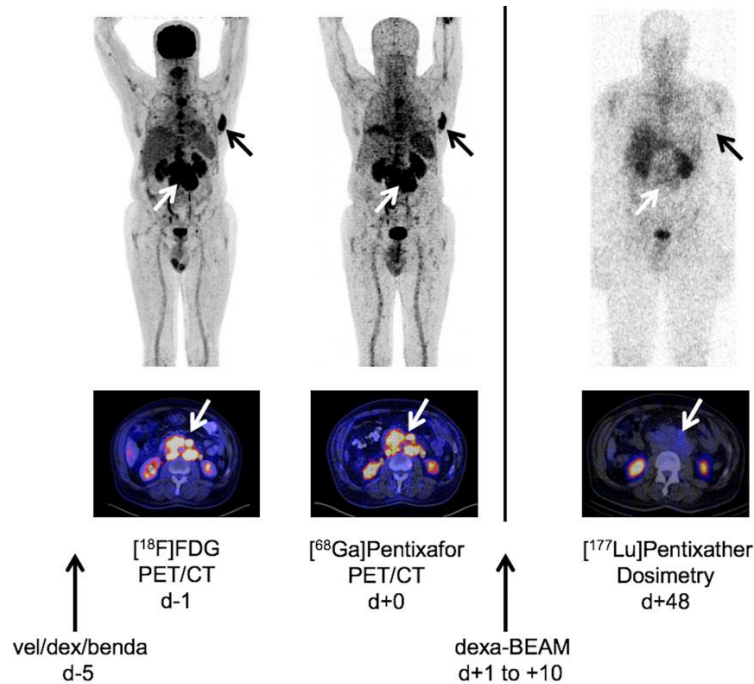


Abb. 3: Beispiel einer CXCR4-Herunterregulierung durch begleitende Chemotherapie beim refraktären MM (s.34). Klar zu erkennen sind die weniger ausgeprägten Areale in der Dosimetrie 47 Tage nach dexa-BEAM-Gabe, die auf eine Suppression des markierten CXCR4 schließen lassen. Dadurch ergibt sich eine eingeschränkte Beurteilbarkeit des Krankheitsprogresses. Aus Lapa et al., Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy, Supplementary information, BJH Vol. 184 Issue 3 Pages 440-443, Feb. 2019, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15096>

Ein weiterer Effekt in diesem Zusammenhang war, dass es in-vitro Beobachtungen gegeben hatte, bei denen es nach Gabe von Dexamethason zu einer Hochregulierung der CXCR4-Aktivität gekommen war⁴³. Diese Ergebnisse machte man sich zunutze, um so bei einem dieser drei PatientInnen eine erneute Hochregulierung zu induzieren, welche allerdings klinisch nicht nachgewiesen werden konnte.

Somit wurde zum ersten Mal beschrieben, dass es durch die begleitende Chemotherapie bei PatientInnen mit hämatopoetischen malignen Erkrankungen zu einer Herunterregulierung der CXCR4-Aktivität auf der Zelloberfläche kam, ohne dass jedoch ein entsprechendes Abtöten der malignen Zellen erfolgte, was angesichts des fortgeschrittenen Stadiums der PatientInnen einen herben Rückschlag im Sinne eines gescheiterten letzten Versuchs zur Stabilisierung der Erkrankung bedeutete.

I.5 Hintergründe zu den Versuchen

Dieser sich aus der Klinik ergebenden Fragestellung im Hinblick auf eine komplexe Beeinflussung der CXCR4-Aktivität auf molekularer Ebene, wie auch den Erkenntnissen, dass es in MSC zu einer vermeintlichen Induktion der CXCR4-Aktivität nach Zell-Zell-Kontakt kommt und sich dieser somit als möglicher Biomarker ergeben hatte, sollte in-vitro nachgegangen werden. Dabei wurde auf das gleiche *dexa-BEAM*-Schema zurückgegriffen, welches auch in der Klinik Anwendung fand, und

⁴³ Lapa et al., Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy, Supplementary information, BJH Vol. 184 Issue 3 Pages 440-443, Feb. 2019, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15096>

welches beispielhaft ein breites Spektrum verschiedener Chemotherapeutika widerspiegelt. Es umfasst Dexamethason, Carmustin, Etoposid, Cytarabin und Melphalan, welche noch um die ebenfalls häufig verwendeten Mittel Bortezomib und Bendamustin ergänzt wurden, die einem der PatientInnen zusätzlich zuvor verabreicht wurden.

Bei Dexamethason handelt es sich dabei um ein Steroid mit multiplen Effekten, u.a. der Immunsuppression. Carmustin gehört zur Klasse der zytostatisch wirkenden Alkylanzien, die mit der DNA über den Einbau verschiedener Alkylgruppen interagieren und die Zellteilung so blockieren. Dies kommt bei schweren fortgeschrittenen Krebserkrankungen zum Einsatz, ebenso wie Etoposid, welches die Topoisomerase II der Zellen hemmt. Cytarabin wird als fehlerhaftes Nukleotidanalogen in die DNA eingebaut und hemmt als Antimetabolit die weitere DNA-Synthese. Melphalan und Bendamustin wirken ebenfalls als Alkylanz, wohingegen Bortezomib als Proteasom-Inhibitor seinen zytostatischen Effekt über den NFκB-pathway entfaltet.

I.6 Ziel der Arbeit

Die Idee zu dieser Arbeit kam durch die vorherige Zusammenarbeit der Arbeitsgruppe um Prof. Regina Ebert am König-Ludwig-Haus Würzburg mit der von Prof. Lapa am Universitätsklinikum Würzburg zustande. In einer Arbeit der PhD-Studentin Julia Dotterweich hatte diese bereits Versuche an Myelomzellen (MM) und Mesenchymalen Stammzellen (MSC) durchgeführt und dabei den Einfluss auf verschiedene Rezeptoren untersucht, u.a. den *KISS1*-Rezeptor⁴⁴. Ein anderer Rezeptor, der CXCR4-Rezeptor, wurde dabei auch untersucht, wobei dieser auch für die Ärzte des Universitätsklinikums Würzburg interessant war, da er bereits in der Diagnostik und Therapie von PatientInnen mit refraktärem Multiplen Myelom eingesetzt wurde, sich aber in der Anwendung gewisse Auffälligkeiten ergaben, bei denen es zu einer Herunterregulierung der Rezeptoraktivität durch Gabe der begleitenden Chemotherapie kam⁴⁵. Demnach stellte die mir angebotene Promotionsarbeit die geeignete Schnittstelle zwischen Klinik und Grundlagenforschung dar, um den in der Klinik aufgetretenen Fragestellungen auf zellulärer und molekularer Ebene durch Untersuchung der Zell-Zell-Interaktionen und des Einflusses der Chemotherapeutika in Bezug auf CXCR4 nachzugehen.

In einem ersten Versuch sollte dabei genauer auf die Zell-Zell-Interaktion zwischen Myelomzellen und Mesenchymalen Stammzellen im Hinblick auf eine mögliche Induktion der CXCR4-Aktivität geachtet werden. Die MSC eigneten sich u.a. dadurch, dass die Arbeit mit Ihnen in unserem Labor bereits etabliert war^{46 47} und aufgrund der zuvor erwähnten Bedeutung im Zusammenspiel mit Myelomzellen. Für die Versuche wurde auf zwei in der Forschung am MM gut etablierte Myelomzelllinien zurückgegriffen, nämlich INA-6 und MM1S.

⁴⁴ Dotterweich J, Tower RJ, Brandl A, et al. The KISS1 Receptor as an In Vivo Microenvironment Imaging Biomarker of Multiple Myeloma Bone Disease. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155087. Published 2016 May 9. doi:10.1371/journal.pone.0155087

⁴⁵ Lapa et al., Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy, *BJH* Vol. 184 Issue 3 Pages 440-443, Feb. 2019, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15096>

⁴⁶ Prager P, Kunz M, Ebert R, Klein-Hitpass L, Sieker J, Barthel T, Jakob F, Konrads C, Steinert A. Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Anterior Cruciate Ligament: Characterization and Comparison of Cells from Young and Old Donors. *Knee Surg Relat Res*. 2018 Sep 1;30(3):193-205. doi: 10.5792/ksrr.17.067. PMID: 29554721; PMCID: PMC6122945.

⁴⁷ Ziouti F, Ebert R, Rummler M, Krug M, Müller-Deubert S, Lüdemann M, Jakob F, Willie BM, Jundt F. NOTCH Signaling Is Activated through Mechanical Strain in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells Int*. 2019 Feb 26;2019:5150634. doi: 10.1155/2019/5150634. PMID: 30936923; PMCID: PMC6413410.

Bei INA-6 Zellen handelt es sich Interleukin-6-abhängige Plasmazellen, bei denen Interleukin-6 eine wichtige Rolle in Wachstum und Überleben der Zellen spielt⁴⁸. Bei MM1S⁴⁹ handelt es sich um eine spezielle Reihe Glukokortikoid-sensitiver Myelomzellen, was sie für die Versuche und die Untersuchung der Effekte von Dexamethason geeignet erscheinen ließ, da Glukokortikoide für die Therapie des MM als besonders vielversprechend angesehen werden⁵⁰.

Die Auswirkungen der direkten Zell-Zell-Interaktion sollten auf Ebene der RNA mittels PCR sowie auf Ebene der Rezeptorverteilung auf der Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenz dargestellt werden. Wie bereits beim HI-Virus beschrieben, sollte auch eine mögliche Internalisierung und damit Maskierung des Rezeptors, welcher eine wichtige Rolle bei der Membranfusion von HIV mit der Wirtzelle spielt, in Betracht gezogen werden.⁵¹ Bei bestimmten Tumorentitäten konnte zudem eine Co-Internalisierung mit dem Oberflächenprotein CD47 beobachtet werden, was maßgeblichen Einfluss auf die Immunantwort hatte.⁵²

In einem zweiten Versuch sollte auf Ebene des CXCR4-Promotors zunächst eine Analyse per Datenbank erfolgen, die Hinweise auf mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen geben sollte. Zudem sollte der CXCR4-Promotor in die Zellen eingebracht werden und in einem dritten Versuch die Stimulation des Promotors mit verschiedenen Chemotherapeutika (s.oben, *dexa-BEAM*) auf diese wie auch die mRNA-Expression gemessen werden, um damit Aufschlüsse über mögliche Einflüsse in-vivo ziehen zu können, die ggf. eine weitere gezielte CXCR4-Dignostik und Therapie möglich machen.

II. Methodik

II.1 Zellkultur

II.1.1 Zellen

Die verwendeten Zellen umfassten Myelom-Zelllinien des Typs INA-6 und MM1S sowie primäre Mesenchymale Stammzellen (MSC). Die Myelom Zellen wurden dabei nicht eigenhändig aus Patientenmaterial gewonnen, sondern von kooperierenden Forschergruppen, in erster Linie der AG um Prof. Bargou (Zelllinien UKW-Universitätsklinikum Würzburg), zur Verfügung gestellt, und bei -80°C mittels flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die MSCs der Versuche stammten allesamt aus Patientenmaterial, das im König-Ludwig-Haus bei orthopädischen Hüftoperation gewonnen und von den Patienten nach schriftlicher Einwilligung zur Verfügung gestellt wurde. Für die Verwendung des Rest-Gewebematerials liegt ein positives Votum der Ethik-Kommission der Universität Würzburg vor

⁴⁸ Due to interleukin-6 type cytokine redundancy only glycoprotein 130 receptor blockade efficiently inhibits myeloma growth. *Haematologica*. 2017;102(2):381-390. doi:10.3324/haematol.2016.145060

⁴⁹ Greenstein S, Krett NL, Kurosawa Y, Ma C, Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC, Rosen ST. Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. *Exp Hematol*. 2003 Apr;31(4):271-82. doi: 10.1016/s0301-472x(03)00023-7. PMID: 12691914.

⁵⁰ Sola B, Renoir JM. Estrogenic or antiestrogenic therapies for multiple myeloma?. *Mol Cancer*. 2007;6:59. Published 2007 Sep 24. doi:10.1186/1476-4598-6-59

⁵¹ The biology of CCR5 and CXCR4. Alkhatib G. *Curr Opin HIV AIDS*. 2009 Mar;4(2):96-103. doi: 10.1097/COH.0b013e328324bbec. PMID: 19339947

⁵² Mezzapelle R, Leo M, Caprioglio F, Colley LS, Lamarca A, Sabatino L, Colantuoni V, Crippa MP, Bianchi ME. CXCR4/CXCL12 Activities in the Tumor Microenvironment and Implications for Tumor Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2022 May 6;14(9):2314. doi: 10.3390/cancers14092314. PMID: 35565443; PMCID: PMC9105267.

(Az 186/18). Die am Tag der jeweiligen Operation zugesandten Femur- und Spongiosa-Teile wurden nach Erhalt unverzüglich von einer Technischen Angestellten (TA) der Arbeitsgruppe um Prof. Regina Ebert bzw. Prof. Norbert Schütze nach standardisierten und hygienischen Bedingungen aufbereitet⁵³, auf Hepatitis und HIV-Infektiosität überprüft, und nach entsprechendem Aufteilungsschema in Medium ausgesät und inkubiert und nach ca. zwei Wochen, nach erfolgreicher Adhäsion und Wachstum, übergeben.

II.1.2 Zellmedium

II.1.2.1 MSC-Medium

Das verwendete Zellmedium für die MSCs bestand aus 500ml *F-12 Nutrient Mixture (Ham)* der Produktlinie *Gibco* von *Thermo Fisher Scientific*, welches sich für die Arbeit mit MSCs bei vorherigen Versuchen etabliert hatte. Zugesezt wurden diesem 100ml (20%) Fetales Kälberserum (FCS) (*Bio&Sell GmbH*), 500µl Gentamicin sowie 500µl Pyruvat (beides *Sigma Aldrich GmbH*). Gelagert wurde das Medium bei +2-8°C, und zur Verwendung vor jedem Einsatz auf 37°C erwärmt.

II.1.2.2 INA-6 Medium

Als Zellmedium für die INA-6 Zellen wurde ebenfalls *RPMI 1640 Medium* der Produktlinie *Gibco* der Firma *Thermo Fisher Scientific* verwendet, dem wir 50ml (10%) FCS, 5ml (1%) L-Glutamin, 5ml (1%) Penicillin/Streptomycin, 500µl Pyruvat sowie 2 ng/ml Interleukin-6 (IL-6) (*Miltenyi Biotec*) hinzusetzen. Das Komplettmedium wurde ebenfalls gekühlt bei +2-8°C gelagert.

II.1.2.3 MM1S Medium

Für die MM1S wurde ebenfalls *RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific)* genommen, allerdings wurde dem etwas weniger FCS (50ml, 10%) hinzugegeben. Zudem wurde es gleichfalls mit 5ml L-Glutamin sowie 5ml Penicillin/Streptomycin und 500µl Pyruvat ergänzt und bei +2-8°C gelagert.

II.1.3 Zellkultivierung

Generell wurden alle Zellen in Zellkulturflaschen der Reihe *EasyFlask* für adhärenzte Zellen der Firma *Thermo Fisher Scientific* kultiviert. Für die INA-6 Zellen, bei denen es sich um nicht-adhärenzte Suspensionszellen handelt, wurde auf spezielle unbehandelte Kulturflaschen verzichtet, um generell die gleichen Bedingungen für alle Zellen vorauszusetzen. Zudem handelt es sich bei INA-6 um sehr robuste und einfach zu kultivierende Zellen. Inkubiert wurden die Zellen in einem *Heracell 240i Inkubator (Thermo Fisher Scientific)* bei konstanten 37°C und einer CO₂ Zufuhr von 5%. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte stets in steriler Umgebung an einer Sicherheitswerkbank mit laminarer

⁵³ Regina Ebert, Peggy Benisch, Melanie Krug, Sabine Zeck, Jutta Meißner-Weigl, Andre Steinert, Martina Rauner, Lorenz Hofbauer, Franz Jakob, Acute phase serum amyloid A induces proinflammatory cytokines and mineralization via toll-like receptor 4 in mesenchymal stem cells, *Stem Cell Research*, Volume 15, Issue 1, 2015, Pages 231-239, ISSN 1873-5061, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.06.008>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506115000811>)

Luftströmung, außerdem mit Einmal-Pasteurpipetten, Einmal-Pipettenspitzen und autoklavierten Glaspipetten, sodass es bei den Versuchen nicht ein einziges Mal zu Verunreinigungen der Zellkulturen oder Zellmedien kam.

II.1.3.1 Zellkultur MSCs

Ein Mediumwechsel erfolgte abhängig vom Zellwachstum, aber in der Regel zweimal pro Woche, wobei das überstehende Medium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 25ml frisches Medium dazu gegeben wurde. Das Splitten der Zellen in eine neue Passage erfolgte in der Regel einmal pro Woche. Dabei wurde das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit 10ml PBS gewaschen, ohne dabei jedoch Zellen abzulösen. Nach erneutem Absaugen des PBS kamen 0,05% Trypsin-EDTA (*Life Technologies GmbH*) auf den Zellrasen, und das Ganze wurde gleichmäßig benetzt für ca. 5min im Inkubator inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe der doppelten Menge Medium gestoppt bzw. die gelockerten Zellen damit abgelöst. Das Gemisch wurde im Anschluss bei 1200rpm für 5min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, sodass lediglich die MSC zurückblieben. Erneut vermischt mit 5ml frischem Medium, wurden 25µl entnommen und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Das Zählen der Zellen erfolgte mit einer *Neubauer-Zählkammer* nach Zugabe von 50µl Trypanblau und 25µl PBS, sodass diese vollständig benetzt wurde. Unter dem Lichtmikroskop (LM) konnte so die Zellzahl bestimmt werden. Der Mittelwert aus den vier Quadranten wurde mit dem Verdünnungsfaktor (1:10) und anschließend mit dem Faktor der Kammer (10^4) multipliziert. Pro 175cm² Flasche wurden dabei 2×10^6 Zellen ausgesät. Das Volumen wurde auf 25ml mit frischem Medium aufgefüllt und die Flaschen anschließend beschriftet und wie oben beschrieben inkubiert.

II.1.3.2 Zellkultur INA-6

Durch das schnelle Wachstum der Myelom-Zellen war im Prinzip nie ein reiner Mediumwechsel notwendig, da die Zellen sehr bald wieder gesplittet werden mussten. Durch ihre nicht-adhärenenten Eigenschaften in den Kulturflaschen erübrigte sich ein Ablösen der Zellen. Es genügte, die Zellen gut durchzumischen und eine kleine Pipettenspitze dieser Zellsuspension für die Zählung zu entnehmen. Wie bereits oben beschrieben, wurde dafür die entsprechende Mischung mit PBS und Trypanblau hergestellt und eine Probe hiervon auf die Zählkammer aufgetragen. Je nachdem, wann man vorhatte, die Zellen erneut zu splitten bzw. für ein Experiment zu verwenden, wurden unterschiedliche Zellmengen ausgesät: für 1 Tag 4×10^5 Zellen/ml, für 2 Tage 2×10^5 Zellen/ml und für 3 Tage 1×10^5 Zellen/ml. Das restliche Volumen wurde auf 20ml mit Medium aufgefüllt. Die IL6-Zugabe sowie die Lagerung und Inkubation erfolgten wie oben beschrieben.

II.1.3.3 Zellkultur MM1S

Die MM1S wurden zweimal pro Woche gesplittet. Dabei war das Ziel, jeweils 3×10^5 Zellen/ml auszusäen. Durch das semi-adhärenente Verhalten der Zellen ergab sich die Besonderheit, dass die Zellen mittels Zellschaber vorsichtig vom Boden der Kulturflasche abgeschabt werden mussten. Zur Zählung wurde eine kleine Menge des Gemisches entnommen und - wie oben beschrieben - gezählt. Anschließend wurden auch hier die Zellen und frisches Medium im Volumen von insgesamt 30ml in neue 75cm²-Flaschen überführt, beschriftet und inkubiert, und das zu den gleichen Bedingungen wie bei den anderen Zellen.

II.2 Interaktion zwischen MSCs und INA-6 Zellen

Wie bei allen Versuchen wurde auch dieser Versuch in der Summe dreimal durchgeführt, um die mindestens geforderte Validität zu liefern. Mehr als drei unabhängige Experimente wurden aus Gründen der Zeit und Ressourcen nur dann durchgeführt, wenn eine Versuchsdurchführung nicht erfolgreich war.

Ziel war es hier, MSCs und INA-6-Zellen miteinander in Ko-Kultur zu bringen, zu inkubieren, und nach einer bestimmten Zeit wieder voneinander zu trennen, um anschließend mittels PCR, qPCR und Immunzytologie den Effekt der Ko-Kultur bezogen auf CXCR4 zu untersuchen.

Dabei wurden verschiedene Versuchsansätze untersucht: INA-6 Zellen alleine, INA-6 Zellen mit Dexamethason (Dexa, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH*) behandelt, INA-6 Zellen in Ko-Kultur mit MSCs, INA-6 Zellen in Ko-Kultur und MSCs mit Dexa behandelt, sowie MSCs alleine, MSCs mit Dexa behandelt, MSCs in Ko-Kultur mit INA-6 Zellen, MSCs in Ko-Kultur mit INA-6 Zellen mit Dexa behandelt.

II.2.1 Zellen

II.2.1.1 MSCs

Es wurden MSC von vier unterschiedlichen Spendern verwendet. Die Zellen wurden zuvor in 175cm² Flaschen kultiviert und nun abgelöst, wie es auch beim Splitten der Zellen der Fall war. Die gesamte Zellsuspension wurde über einen 70µM-Filter von Zellklumpen befreit und in zwei 50ml-Röhrchen überführt. Diese wurden bei 10000rpm für 5min zentrifugiert, das überschüssige Medium abgesaugt, und mit neuem Medium zur Hälfte aus INA-6-Medium, zur anderen Hälfte aus MSC-Medium aufgefüllt und zusammengegeben, sodass gleiche Bedingungen für alle Ansätze und später auch für beide Zelltypen in Ko-Kultur hergestellt werden konnten. Die Zellen wurden gezählt und die entsprechende Menge Zellsuspension, die der Anzahl von $1,2 \times 10^6$ MSCs entsprach, auf neue 25cm² Fläschchen gegeben und mit Halb/Halb-Medium auf 5ml aufgefüllt. Dies geschah 24h vor dem eigentlichen Versuchsansatz, um den Zellen Zeit zur Adhäsion und Verringerung des Zellstresses zu geben.

II.2.1.2 INA-6 Zellen

Für die Ko-Kulturen wurden jeweils viermal so viele INA-6 Zellen wie MSCs benötigt, um einen ausreichenden Kontakt und damit eine suffiziente Interaktion zu ermöglichen. Die INA-6 wurden erst am Versuchstag ausgesät bzw. zu den MSCs als Ko-Kultur gegeben. Dafür wurde die entsprechende Menge Zellsuspension nach Zählung der Zellen in 2x 50ml Röhrchen gegeben, zentrifugiert (5min bei 10000rpm), der Überstand abgesaugt und die Zellen erneut mit Halb/Halb-Medium aufgefüllt. Dabei wurde hier kein IL6 dazu gegeben, da die MSC selbst IL6 produzieren und in der Ko-Kultur die INA-6 Zellen mit diesem Wachstumsfaktor versorgen.

II.2.2 Versuchsansätze

Da jeweils der Effekt sowohl auf INA-6 als auch auf MSCs untersucht werden sollte, gab es pro Zelltyp je 4 Ansätze:

INA-6

1. INA-6 Zellen alleine: $4,8 \times 10^6$ INA-6 in 5ml Halb/Halb-Medium
2. INA-6 mit Dexamethason: $4,8 \times 10^6$ INA-6 in 5ml Halb/Halb Medium + $15 \mu\text{M}$ Dexamethason
3. INA-6 mit MSCs: $4,8 \times 10^6$ INA-6 auf $1,2 \times 10^6$ MSCs in 5ml Halb/Halb Medium
4. INA-6 mit MSCs und Dexamethason: $4,8 \times 10^6$ INA-6 auf $1,2 \times 10^6$ MSCs in 5ml Halb/Halb Medium + $15 \mu\text{M}$ Dexamethason

MSC

1. MSCs alleine: $1,2 \times 10^6$ MSCs in 5ml Halb/Halb Medium
2. MSCs mit Dexamethason: $1,2 \times 10^6$ MSCs in 5ml Halb/Halb Medium + $15 \mu\text{M}$ Dexamethason
3. MSCs mit INA-6 Zellen: $4,8 \times 10^6$ INA-6 auf $1,2 \times 10^6$ MSCs in 5ml Halb/Halb Medium
4. MSCs mit INA-6 und Dexamethason: $4,8 \times 10^6$ INA-6 auf $1,2 \times 10^6$ MSCs in 5ml Halb/Halb Medium + $15 \mu\text{M}$ Dexamethason

Dexamethason:

Wie bereits oben erwähnt, wurde für die Versuchsansätze eine Konzentration von $15 \mu\text{M}$ Dexamethason eingesetzt. Diese Konzentration wurde empirisch erhoben und in unserer Arbeitsgruppe bereits zuvor für Versuche verwendet. Da die Stammlösung in einer Konzentration von 10mM vorlag, wurde die zu verwendende Menge nach folgender Formel berechnet:

Volumen der Zellsuspension x $15 \mu\text{M}$ = 10mM x **Zugebende Menge**.

Bei einem Volumen von 5ml pro Fläschchen ergab sich somit die berechnete Menge von $7,5 \mu\text{l}$ Dexamethason pro Ansatz.

Die Versuchsansätze wurden beschriftet und bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ für 24h inkubiert. Dexamethason wurde dabei zum gleichen Zeitpunkt wie die Zugabe der INA-6 Zellen zu den MSC hinzugegeben.

II.2.2.1 Färben und Sorten der Zellen

Um die Zellen der Ko-Kultur wie gewünscht wieder voneinander zu trennen, um damit die jeweiligen Zellanalysen durchzuführen und dabei Verunreinigungen bzw. Verfälschungen durch unerwünschte Zellen zu vermeiden, wurde sich zunächst verschiedener Techniken beholfen, dies aber bald auf eine einzige ausreichende und präzise Technik beschränkt.

- Zellfärbung mit *CellTracker-Green*

MSC-Färbung

Nachdem die MSCs der verschiedenen Versuchsansätze jeweils 24h inkubiert hatten, erfolgte kurz vor Zugabe der INA-6 Zellen bzw. kurz vor dem Mediumwechsel eine Färbung der MSCs mit *CellTracker™ Green 5-chloromethylfluorescein diacetate* (CMFDA) (Lonza Group AG, Basel, Switzerland) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wurde eine 10mM Stocklösung Cell-Tracker Green (MG 484,86) verwendet, wobei 50µg/vial in 10,8µl DMSO gelöst wurden, sodass eine 5µM Arbeitslösung in serumfreiem Medium entstand. Von den Ansätzen mit MSCs wurde das Medium per Absaugen entfernt und mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Monolayer durch Zugabe vorgewärmter CellTracker Arbeitslösung bedeckt und das Ganze bei 37°C für 15min inkubiert. Als nächsten Schritt wurde die Färbelösung entfernt und mit Zellmedium gewaschen. Zuletzt wurde je nach Ansatz entweder reines Halb/Halb-Medium oder ebenfalls INA-6 Zellen hinzugegeben.

INA-6-Färbung

Auch hierfür wurde die *CellTracker-Green* Färbelösung (s. oben) verwendet, wobei durch das Lösen von 50µg in 10,8µl DMSO eine 5µM Arbeitslösung entstand. Dafür wurden die INA-6 für 5min bei 1200rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Färbelösung analog der MSCs hinzugegeben. Dies entsprach 5µl der Stocklösung, welche mit den INA6 in 10ml vorgewärmtem INA-6-Medium (ohne FCS) bei 37°C inkubiert wurde, und anschließend erneut für 5min bei 1200rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen mit 10ml INA-6-Medium gewaschen, erneut zentrifugiert und das Medium erneut wie oben entfernt. Zuletzt erfolgte die Zugabe der INA-6 Zellen zu den entsprechenden Ansätzen in Halb/Halb-Medium (ohne IL6) und die Addition von Dexamethason je nach Ansatz.

■ Sorten der Zellen: Microbeads-Technik

Das erneute Auftrennen der verschiedenen Zelltypen aus der Ko-Kultur erfolgte mittels *microbeads-Methode*: dabei bestand das Prinzip darin, das Oberflächenmolekül CD45 auf der Oberfläche der INA6 mit magnetischen Antikörpern zu markieren, um diese anschließend über den magnetischen Effekt entlang von Säulen wieder aufzutrennen (*Magnetic Activated Cell Sorting, MACS®, Miltenyi Biotech*). Dazu wurden simultan zwei Ansätze durchgeführt, die beide jedoch auf demselben Prinzip beruhten: beim „*Negativsort*“ sollten die MSCs behalten, die INA6 verworfen werden, beim „*Positivsort*“ genau andersherum. Dies liegt darin begründet, dass bis dato noch kein einheitlicher Marker für MSCs identifiziert wurde, sodass beides über CD45 Microbeads der INA-6 Zellen gesortet werden musste. Dabei wurde jeder Ansatz gesortet, auch wenn dieser keine Ko-Kultur enthielt, um eine möglichst vergleichbare Behandlung aller Zellgruppen zu erhalten und somit Verzerrungen durch die Durchführung zu verhindern.

Negativsort: LD-Säulen

Als erstes wurden die MSC-Ansätze trypsiniert, d.h. gewaschen, mit 4ml Trypsin überdeckt, für 5min bei 37°C inkubiert, und anschließend mit ca. 10ml Medium überschichtet. Wenn sich die Zellen dabei nicht einzeln abgelöst hatten, wurden sie über einen 70µm Filter von größeren Zellklumpen befreit. Anschließend kamen sie in ein 50ml Röhrchen, wurden zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Zum nun vorliegenden Pellet wurden je nach Ansatz 80µl Sorting-Puffer (*autoMACs running buffer, Miltenyi Bioec*) und 20µl CD45 MicroBeads hinzugegeben. Auch dies wurde für 15min bei 4°C inkubiert. Die anschließende Zugabe von 2ml Sorting-Puffer stoppte die Reaktion, sodass nochmal für

10min bei 1300rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt wurde. Anschließend kamen wieder 5ml Sorting-Puffer auf die Zellen.

Die Säulen, durch welche die Zellen laufen sollten, wurden in der Zwischenzeit mit 5ml Sorting-Puffer äquilibriert und in die magnetische Halterung eingespannt. Nachdem die 5ml durchgelaufen waren, kamen jeweils 5ml der Proben auf die Säulen und liefen vollständig hindurch. Um alle Zellen zu behalten, wurde zuletzt noch mit 2ml Sorting-Puffer nachgespült.

Im Fall des Negativsorts befanden sich die gewünschten MSCs in den Sammelröhrchen unter den Säulen. Die davon getrennten INA-6 Zellen wurden mit den Säulen zusammen entfernt. Aus den Sammelgefäßen konnten nun jeweils kleine Proben mit der Pipette entnommen und unter dem LM in der Hinsicht beurteilt werden, ob das Auftrennen der Zellen erfolgreich war.

Der Inhalt der Sammelröhrchen wurde abschließend zentrifugiert, und der Überstand entfernt; das Zellpellet im Anschluss zur Vorbereitung der RNA-Isolation mit 350µl-RA1-Puffer (*NuceloSpin Kit, Macherey und Nagel KG, Dürren, Germany*) und 1% beta-Mercaptoethanol (*AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany*) resuspendiert, in ein Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Positivsort: LS-Säulen

Das Auftrennen der Zellen beim Positivsort funktionierte wie beim Negativsort, nur dass im Schritt des Verwerfens der nicht benötigten Zellen diesmal die durch die Säulen gelaufenen MSCs verworfen, und die in den Säulen aufgefangenen INA-6 Zellen behalten wurden. Dazu wurden sie anders als beim Negativsort dreimal mit 3ml Puffer durchgespült und zuletzt mit dem beiliegenden Stempel und 5ml Medium aus der Säule in ein neues Sammelröhrchen gedrückt, die zuvor vom Magneten entfernt wurde. Dadurch erhielt man pro Ansatz je 5ml, die noch zentrifugiert und abgesaugt werden mussten. Auch hier wurde das Zellpellet wie oben mit RA1-Puffer und beta-Mercaptoethanol resuspendiert und in Gefäßen bei -20°C eingefroren.

Beim 4. Versuch wurde das Filtern über beide Säulen jeweils zweimal hintereinander durchgeführt, um ein besseres Sorting-Ergebnis zu erhalten und die verschiedenen Zelltypen besser voneinander trennen zu können.

II.2.2.2 RNA-Isolation (*NucleoSpin-RNA-Kit, Macherey-Nagel GmbH & Co.KG*)

Die zur Isolierung der aus den Zellen der verschiedenen Ansätze gewonnenen RNA musste zunächst filtriert werden, u.a. um die Viskosität zu verringern, weshalb die Proben jeweils für 1min bei 11000g über einen violetten *Nucleospin* Filter in ein Sammelröhrchen (2ml) zentrifugiert wurde.

Der Filter wurde entfernt und das entstandenen Lysat jeweils mit 350µl 70%igem Ethanol durch Auf- und Abpipettieren vermischt.

Die Bindung der RNA an die blaue *Nucleospin*-RNA-Säule erfolgte durch mehrmaliges Vermischen der Mischung und anschließend Auftragen auf die oben genannte Säule, welche in eine neue *collection tube* gegeben wurde. Das Ganze wurde für 30s bei 11000g zentrifugiert.

Zur Entsalzung der Membran des Röhrchens wurden 350µl *Membrane Desalting Puffer (MDB)* dazugegeben und wieder für 1min bei 11000g zentrifugiert, um bessere Bedingungen für den anschließenden Verdau zu schaffen.

Für den Verdau wurden pro Ansatz jeweils 10µl rekonstituierte rDNase und 90µl Reaktionspuffer für rDNase benötigt. Dieser Mix wurde gemischt und 95µl direkt auf das Zentrum der einliegenden Membran gegeben. Anschließend wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für 15min erneut zentrifugiert.

Bei den übrigen Schritten handelte es sich lediglich um die abschließenden Wasch- und Trocknungsschritte nach Angaben des Herstellers. Zur finalen Gewinnung der RNA wurde die RNA mit 60µl RNase-freiem Wasser zentrifugiert und die nunmehr gewonnene RNA bei 11000g erneut für 1min zentrifugiert, sodass pro Ansatz jeweils ein neues Gefäß bestand, das photometrisch gemessen werden konnte. Zur Aufbewahrung wurde die RNA bei -20°C gelagert.

II.2.2.3 RNA-Messung (*Eppendorf Biophotometer D30*)

Für die Messung der zuvor isolierten Proben wurde eine 1mm-Spezialküvette für 2µl Proben verwendet. Die Proben wurden während des gesamten Messvorgangs auf Eis gelagert. Als Referenz dienten 2µl DNase-freies Wasser, das auf eine µKüvette G1.0 (*Eppendorf*) gegeben und als „blank“ gemessen wurde. Hiernach wurden die 10 Proben des Versuchs einzeln mittels „sample“ gemessen. Waren die RNA-Konzentrationen zu hoch, wurde zur Verdünnung etwas reines Wasser hinzugegeben. Das Gerät ermittelte die Konzentration in µg/ml, sodass anhand dieser Konzentration über einen einfachen Dreisatz ausgerechnet werden konnte, wieviel Mikroliter der Probe 1µg reiner RNA entsprachen, was für die anschließende Herstellung der cDNA notwendig war. Dieses der Menge von 1µg RNA entsprechende Volumen musste anschließend noch mit Wasser auf insgesamt 17µl aufgefüllt werden.

II.2.2.4 cDNA-Synthese

Die Herstellung der cDNA erfolgte unter möglichst RNase-freien Bedingungen, d.h. unter Verwendung von Handschuhen sowie Pipettenspitzen mit Filtereinsatz. Zudem wurden die Proben und insbesondere die benötigten Enzyme auf Eis gelagert.

Wie bereits oben erwähnt, wurden von den 10 Proben jeweils 1µg RNA verwendet und mit H₂O auf 17µl aufgefüllt. Hinzu kamen 1µl 500ng/µl Oligo-dT (*Promega GmbH*), die in einem ersten Schritt für 5min bei 70°C in der PCR-Maschine (*peqSTAR 2×thermocycler, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany*) hybridisiert wurden.

Anschließend wurden jeder der Proben insgesamt 7µl eines speziellen PCR-Mix zugefügt, bestehend aus 5µl Reverse Transkriptase (RT) Puffer (10X, *Promega GmbH*), 200U/µl RT Enzym (*Promega GmbH, Mannheim, Germany*), 0,625µl 20mM dNTPs (*Promega GmbH*) und 0,375µl H₂O, sodass die reverse Transkription starten konnte. Diese lief für 1h bei 42°C, 10min bei 94°C und anschließend aufbewahrend bei 12°C.

In einem letzten Schritt und als Vorbereitung für die weitere Verwendung wurden die so gewonnene cDNA 1:2 durch die Zugabe von 25µl H₂O verdünnt.

II.2.2.5 PCR: Vervielfältigung der Proben-cDNA für die Gelelektrophorese

Für den 1. Versuch spielten in erster Linie drei Gene eine Rolle: *EEF1alpha* als Housekeeping-Gen, *IGKC3* als INA-6 spezifisches Gen zur Überprüfung des Zell-Sortings, und *CXCR4* als Zielgen, dessen Aktivität untersucht werden sollte.

Um diese Gene mittels Gelelektrophorese bzw. später qPCR darstellen zu können, mussten sie zunächst durch eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden. Dafür wurde jeweils ein spezieller Mix hergestellt:

EEF1a-Mix (Angaben pro Probe): 10µl Green GoTaq1 Flexi Buffer (1x) (*Promega GmbH*), 0,5µl 20mM dNTPs (*Promega GmbH*), 0,5µl sense Primer (5pmol), 0,5µl antisense Primer (5 pmol), 2µl MgCl₂ (1,7 mmol/l) (*Promega GmbH*), 0,2µl GoTaq1 DNA-Polymerase (1 U) (*Promega GmbH*), 34,3µl H₂O, 1µl cDNA

CXCR4-Mix: 10µl Green GoTaq1 Flexi Buffer (1x) (*Promega GmbH*), 0,5µl 20mM dNTPs (*Promega GmbH*), 0,5µl sense Primer (5 pmol), 0,5µl antisense Primer (5pmol), 10µl MgCl₂ (1,7mmol/l), 0,2µl GoTaq1 DNA-Polymerase (1 U) (*Promega GmbH*), 26,3µl H₂O, 1µl cDNA

IGKC3-Mix: 10µl Green GoTaq1 Flexi Buffer (1x) (*Promega GmbH*), 0,5µl 20mM dNTPs (*Promega GmbH*), 0,5µl sense Primer (5 pmol), 0,5µl antisense Primer (5pmol), 4µl MgCl₂ (1,7mmol/l), 0,2µl GoTaq1 DNA-Polymerase (1 U) (*Promega GmbH*), 32,3µl H₂O, 1µl cDNA

Somit erhielten wir die für die folgenden Schritte ausreichende DNA, die bei -20°C gelagert wurde.

Primer	Sequenz (5`-3`)	Produktlänge	Annealingtemp.	Zyklen
EEF1a sense	CTGTATTGGATTGCCACACG	369bp	55°C	25
EEF1a antisense	AGACCGTTCTTCCACCACTG			
CXCR4 sense	CATCCTGGTCATGGGTTACC	269bp	57°C	38
CXCR4 antisense	TCCTTGGCCTCTGACTGTTG			
IGKC3 sense	CAGGGCCAGTCAGAGTGTTA	ca. 240bp	58°C	32
IGKC3 antisense	AGGCTGCTGATTGTGAGAGT			

Abb. 4: **Übersicht der verwendeten PCR-Primer und deren Spezifikationen.** EEF1a als Haushaltsgen, CXCR4 als Zielgen und IGKC3 das für INA-6 spezifische Gen, welches einen Hinweis auf mögliche Verunreinigung lieferte.

II.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Darstellung der verschiedenen Proben wurde ein 1%iges Agarosegel angefertigt. Dafür wurden 0,5g Agarosepulver (*Biozym*) auf 50ml TBS-Puffer bzw. 1g auf 100ml gegeben. Dieses wurde in der Mikrowelle zum Kochen gebracht, entnommen, und 4µl bzw. 8µl 0.5x *GelRed1 Nucleic Acid Gel Stain (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Germany)* hinzugegeben, je nachdem, ob es sich um 50ml oder 100ml handelte. Mit einem Kamm mit entsprechender Kammeranzahl wurden die Taschen in das Gel geformt und dieses anschließend bei Zimmertemperatur in der Gelelektrophorese-Wanne für ca. 15-30min ausgehärtet.

Für die erste Tasche wurden 10µl eines 100bp Markers (*peqGOLD, VWR, Darmstadt*) verwendet. In die Taschen 2 bis 9 wurden jeweils 10µl des PCR-Produkts gegeben. Tasche 10 wurde mit einer Negativ-Probe (PCR-Mix ohne cDNA) befüllt. Anode und Kathode wurden angeschlossen, und für ca. 30min eine Spannung von 100V angelegt. Nach etwa einer halben Stunde wurde der Gelblock vorsichtig entnommen und in ein Geldokumentationssystem (*Fusion FX Spectra, Vilber LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell*) gelegt, mit dem ein Bild aufgenommen werden konnte. Das entstandene Bild wurde gespeichert und ausgedruckt.

II.2.2.7 Real Time PCR (*TOptical Thermocycler oder qTOWER3, Analytik Jena*)

Als Ergänzung zur Bestimmung der mRNA-Konzentration mittels konventioneller PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde den Versuchen noch die Bestimmung der Genaktivität mittels qPCR hinzugefügt, da es zur exakten Quantifizierung der RNA richtungsweisend erschien, eine quantitative Analyse vorzunehmen, da die Banden der Geldokumentation vergleichsweise wenig Aufschluss über die Expression des Rezeptors gaben.

Auch hierfür wurden zwecks Validität wieder pro Ansatz je drei Wiederholungen durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Proben verwendet, die auch schon für die konventionelle PCR benutzt wurden, nur dass mit speziellen Primern und unter bestimmten Bedingungen fortgefahren wurde.

qPCR-Primer-Tests

Zunächst musste für alle verwendeten Primer das Temperaturoptimum ermittelt werden, an dem sie ihre größte Effizienz besaßen.

Bestimmung der Effizienzen:

Hierfür musste eine reverse Transkription eines Mix aus verschiedenen cDNA-Proben der jeweiligen Zelltypen erfolgen, wobei mind. fünf Ansätze unverdünnt vermischt wurden, sodass ein Endvolumen über 100µl entstand.

Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 10 Konzentrationen von cDNA angesetzt (mit HPLC-H₂O):

Verdünnung	µl cDNA	µl H ₂ O
1:2	50	50
1:3.5	20	50
1:5	20	80
1:7.5	10	65

1:10	10	90
1:15	5	60
1:20	5	95
1:50	4	196
1:100	4	396
1:1000	10	90

Abb. 5: Verdünnungsreihe der cDNA zur Effizienzbestimmung

Als nächstes erfolgte der Ansatz des 3,5-fachen Mastermix pro Primer-Paar, welcher sich je nach Primer-Typ wie folgt zusammensetzte:

3,5facher Mastermix	Quantitect-Primer [μ l]	biomers-Primer (10 pmol/ μ l) [μ l]
Kappa SYBR FAST qPCR Universal (Peqlab)	35	35
Primer Quantitect (Qiagen)	5,25	-
Sense Primer (Biomers)	-	1,75
Antisense Primer (Biomers)	-	1,75
HPLC-H ₂ O	22,75	24,5
Endvolumen	= 63	= 63

Abb. 6: Übersicht Zusammensetzung Mastermix für qPCR

Pro Verdünnung ergab sich ein Eppendorf-Gefäß mit 63 μ l KAPA SYBR FAST Universal qPCR Master Mix (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany), dem 7 μ l cDNA hinzugesetzt wurde, was ein Endvolumen von 70 μ l pro Gefäß ergab. Dies wurde anschließend noch kurz gevortext und zentrifugiert.

Hiervon wurden je 20 μ l pro Ansatz hinzugegeben (0,2ml Low Profile 8er-Strips, weiß (Biozym, Art.:621935), Deckel: 8er-Flat Caps Strips, optical, clear, farblos (Biozym, Art.: 621816))

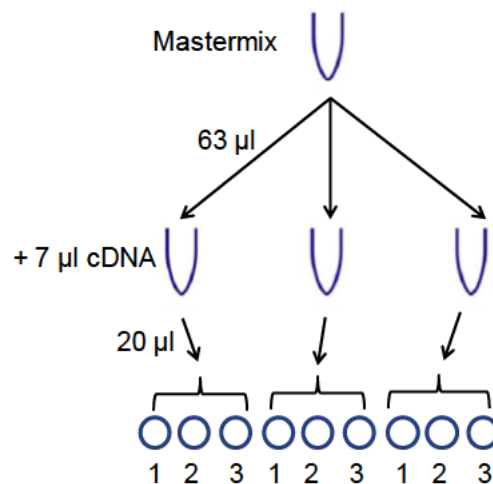


Abb. 7: Pipettierschema der Effizienzbestimmung

Nach Befüllen der Wells mit den Reagenzien wurde das qPCR-Programm gestartet. Dabei galten folgende Einstellungen: 94°C für 3min, 94°C für 10s, 60°C für 10s, 72°C für 10s (plus Messung). Dies wurde in 39 Zyklen wiederholt.

Es ergab sich eine Schmelzkurve mit 60-95°C in 0,5°C-Schritten, wobei die Temperatur jeweils für 6s gehalten wurde (plus Messung).

Die Berechnung der Effizienz erfolgte dann anhand der logCT-Werte und daran, bis zu welchem Wert eine suffiziente Schmelzkurve entstand.

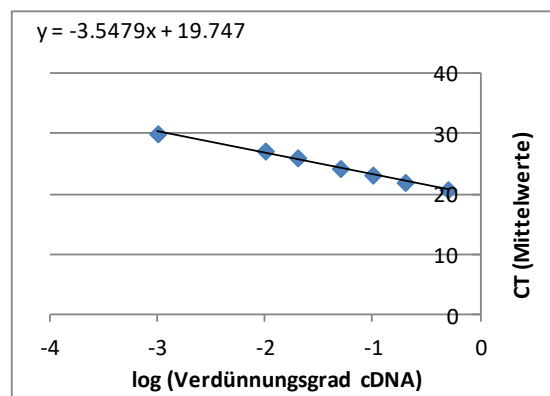


Abb. 8: Standard-Schmelzkurve (Beispiel) zur Effizienzbestimmung mittels qPCR

Als zufriedenstellend wurde eine Effizienz zwischen **1,6** und **2,4** mit einem Optimum bei 2,0 angesehen.

Dabei wurden folgende Effizienzen ermittelt:

RP27A: **2.01** (MSC), **1.52** (INA6) diese Werte waren bereits vorhanden.

CXCR4: **1.63** (MSC), **2.04** (INA6)

IGKC3: --- (MSC), **2,17** (INA6)

IGKC3 wurde für MSC nicht bestimmt, da diese von Natur aus diese Genaktivität nicht besitzen.

Durch diese Berechnungen konnte auf die entsprechenden Temperaturen zurückgeschlossen werden, bei denen die nachfolgenden Versuche durchzuführen waren.

Als optimale Temperaturen für die Durchführung der PCR ergab sich nach der Primer-Testung für CXCR4 **59°C**, für IGKC3 **60°C** und für RP27A **60°C** (diese war bereits getestet).

Mit diesen Parametern als Grundlage konnten die quantitativen Analysen der aus den Zellkulturen erhaltenen RNA-Mengen durchgeführt werden.

Die für die verschiedenen Gene benötigten Mixe stellten sich wie folgt zusammen:

1. **RPS27A** (*housekeeping Gen*): 10µl KAPA SYBR FAST Universal qPCR Master Mix (*Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany*), 0,5µl sense Primer RPS27a (*biomers, 1pmol*), 0,5µl antisense Primer RPS27a (*biomers, 1pmol*), 7µl H₂O + 2µl cDNA (1:10) = 20 µl pro Ansatz
2. **CXCR4**: 10µl KAPA SYBR FAST Universal qPCR Master Mix (*Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany*), 1,5µl Quantitect CXCR4 Primer (*Qiagen*), 6,5µl H₂O + 2µl cDNA (1:10) = 20 µl
3. **IGKC3**: 10µl KAPA SYBR FAST Universal qPCR Master Mix (*Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany*), 0,5µl sense-Primer IGKC3 (*biomers, 1pmol*), 0,5µl antisense-Primer IGKC3 (*biomers, 1pmol*), 7µl H₂O + 2µl cDNA (1:10) = 20 µl pro Ansatz

Bei jedem Gen galt es die ermittelte Temperatur einzustellen. Zur automatisierten Messung wurde das Programm „*T-Professional Thermocycler*“ (Biometra) verwendet.

Folgend wurden die Schmelzkurven analysiert, wobei die Ergebnisse mit der $\Delta\Delta\text{ct}$ Methode⁵⁴ berechnet und die Signifikanzen mit REST⁵⁵ (2009 V2.0.13, *Qiagen GmbH, Hilden, Germany*) bestimmt wurden. Insgesamt wurden die Messungen jeweils dreimal wiederholt.

II.2.3 CXCR4-Nachweis auf Proteinebene (Immunzytologie)

Die Immunzytologie wurde parallel zu den Durchführungen auf Ebene der DNA bei jedem der drei Versuchswiederholungen durchgeführt, um im Falle einer verminderten Rezeptoraktivität eine Internalisierung des Rezeptors von einer Suppression der Genaktivität bzw. des Promotors zu unterscheiden. Deshalb wurden die gleichen Versuchsansätze wie bei der PCR-Darstellung hier im Kleinformat mit weniger Zellen durchgeführt. Ziel war es, den Rezeptor, welcher sich transmembranär befindet, darzustellen.

II.2.3.1 Durchführung

Für die Versuche wurden pro Versuchsansatz jeweils drei Wells angesetzt, in die zuvor jeweils ein Deckgläschen gelegt wurde. Die Versuchsansätze wurden wie bei der Zellkultur (s.oben) durchgeführt.

Parallel zu den Zellkultur-Ansätzen wurden zudem identische Ansätze auf 12-Well-Platten ausgesät, um mögliche Effekte einer Ko-Kultur bzw. der Dexamethason-Zugabe nicht nur auf Ebene der CXCR4-mRNA, sondern auch der CXCR4-Proteinexpression und Rezeptoraktivität zu untersuchen, um z.B. auf eine mögliche Internalisierung des Rezeptors einzugehen.

Dabei wurden wie auch beim Zellkultur-Versuch zunächst die MSC-Ansätze ausgesät und erst nach 24h erfolgreicher Adhäsion wurden die INA-6 Zellen zugegeben bzw. starteten erst jetzt die Ansätze, in denen nur INA-6 zum Einsatz kamen. Es erfolgte eine weitere Inkubation für 24h. Dabei wurde die doppelte Menge an INA-6 Zellen in diesem Fall als ausreichend betrachtet, da es sich auf ein

⁵⁴ A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.

Pfaffl MW. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886

⁵⁵ Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):e36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36. PMID: 11972351

geringeres Volumen beschränkte und ein Zuviel an Zellen bei der Mikroskopie vermieden werden sollte. Bei den Ansätzen, bei denen keine INA-6 hinzugegeben wurden und damit nicht automatisch ein Mediumwechsel nach 24h erfolgte, wurde zum gleichen Zeitpunkt nach 24h ein Mediumwechsel mit 2ml Halb/Halb Medium durchgeführt.

Auf einer 12-well-Platte befanden sich somit pro Well:

1. MSC alleine: 2×10^4 MSC in 2ml Halb/Halb-Medium
2. MSC mit Dexa: 2×10^4 MSC in 2ml Halb/Halb Medium + $15 \mu\text{M}$ Dexamethason
3. MSC mit INA-6: 4×10^4 INA-6 (nach 24h) auf 2×10^4 MSCs in 2ml Halb/Halb-Medium
4. MSC mit INA-6 und Dexa: 4×10^4 INA-6 (nach 24h) auf 2×10^4 MSCs in 2ml Halb/Halb Medium + $15 \mu\text{M}$ Dexamethason

Auf einer zweiten 12-well Platte befanden sich damit pro Well:

1. INA-6 Zellen alleine: 4×10^4 INA-6 (nach 24h) in 2ml Halb/Halb-Medium
2. INA-6 mit Dexa: 4×10^4 INA-6 (nach 24h) in 2ml Halb/Halb-Medium + $15 \mu\text{M}$ Dexamethason

Dexamethason:

Wie bereits oben beschrieben, ergab sich auch hier die richtige Menge Dexamethason durch Berechnung mittels der obigen Formel, wobei sich eine Menge von $3 \mu\text{L}$ pro Ansatz ergab.

Da es sich bei MSCs bekanntlich um adhäsive Zellen handelt, konnte davon ausgegangen werden, dass die Adhäsion an die in den Wells befindlichen Deckgläschen automatisch erfolgte - was aber nach Ablauf der 24h nochmals mikroskopisch überprüft wurde.

Bei den INA-6 stellte sich das Ganze etwas komplizierter dar, da es sich dabei um Suspensionzellen handelt, und somit das Auftragen auf die Deckgläschen aktiv durchgeführt werden musste: hierfür wurde sich der „Zytospin“-Methode bedient, bei der die Zellen durch Zentrifugation auf spezielle Objektträger (*Thermo Scientific SuperFrost Plus Adhäsionsobjektträger*) aufgetragen wurden. Auch wurde vergleichbar mit den Ko-Kultur-Versuchen von der doppelten Menge INA-6 ausgegangen, um ausreichend Kontakt zwischen den verschiedenen Zelltypen herzustellen; allerdings musste die geeignete Menge für die Zentrifugation erst ermittelt werden*.

Beim weiteren Vorgehen wurde einem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Protokoll zur Immunzytologie** gefolgt: nach 48h wurde das überstehende Medium durch Absaugen mittels Glaspipette entfernt. Als nächstes wurden die Deckgläschen zweimal mit ca. 2ml PBS (pH7, Raumtemperatur) gewaschen, wobei diese vorsichtig auf der Rüttelplatte hin und her bewegt wurden, um eine gleichmäßige Waschung zu erhalten. Anschließend wurden die Zellen ebenfalls mit 2ml/Well eiskaltem Methanol, welches bei -20°C gelagert wurde, für ca. 5min inkubiert. Danach wurde das Methanol wieder vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden für ca. 10min luftgetrocknet.

*Da noch nicht ganz etabliert war, welche Anzahl an INA-6 für die Zentrifugation auf Deckgläschen am besten geeignet wäre, wurden drei verschiedene Mengen mit 500/300/100 μl getestet, um sich an die richtige Menge heranzutasten. Dazu wurde die entsprechende Anzahl an INA-6 zunächst für 5min bei 1600rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Es wurde zweimal mit PBS

gewaschen, um überschüssiges FCS zu entfernen, und somit Störungen im Antikörper-Nachweis zu verhindern. Dann wurde erneut zentrifugiert, gewaschen und der Überstand entfernt. Für die Zentrifugation mittels Zytospin wurde das INA-6-Zellpellet in 100µl PBS gelöst und die Objektträger entsprechend der Menge an verwendeten INA-6-Suspension beschriftet. Dabei wurde jeder Ansatz einmal mit und einmal ohne Dexamethason durchgeführt. 100µl INA-6 wurden für je 8min bei 1200rpm auf die speziellen *Superfrost* Deckgläschen zentrifugiert, die eine bessere Haftung garantierten, überschüssige Flüssigkeit per Filterpapier entfernt und anschließend für 10min in eiskaltem Methanol fixiert. Die so auf den Objektträgern fixierten INA-6 wurden bei -20°C gelagert.

** Bei den INA-6-Versuchen: aufgrund fehlender Wells, da sich die Zellen auf einem Objektträger befanden, mussten mit einem Fettstift Kreise um die Zellen gezogen werden, sodass die Lösungen auch auf den Zellen verblieben und nicht verliefen. Außerdem wurden die Deckgläschen beim Waschen in spezielle Wannen gegeben, wo sie komplett mit PBS bedeckt werden konnten.

Zur Färbung mittels Erstantikörper (**Primärer Antikörper 1.1** (CXCR4): zunächst CXCR4 Antikörper (4G10), sc-53534, monokl. Maus-IgG, *Santa Cruz Biotechnology*, dann **Primärer Antikörper 1.2**: rekombinanter Anti-CXCR4 monokl. Rabbit-IgG, [UMB2], ab124824 *abcam*), mussten die Zellen erneut gewaschen werden. Dies erfolgte dreimal mit ca. 2ml PBS pro Well wie oben, wobei jeder Waschvorgang auf der Rüttelplatte ca. 5min in Anspruch nahm. Die Zellmembranen wurden in einem nächsten Schritt durch Zugabe von 0,05%igem Tween (*Applichem*) (50µl in 100ml PBS) für ca. 15min inkubiert und damit permeabilisiert. Dieser Schritt wurde bei den folgenden Versuchen testweise weggelassen, da sich in diesem Fall CXCR4 transmembranär befand, und somit eine Permeabilisierung der Membran nicht sehr sinnvoll erschien. Anschließend wurde erneut zweimal mit 2ml/Well PBS für je 5min gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungen und verfälschte Antikörper (AK) -Interaktionen weitestgehend auszuschließen, wurde zum Blockieren 3%iges BSA (*Applichem*) in PBS (pH=7, frisch angesetzt) im Umfang von 2ml/Well für 30min hinzugegeben. Um überschüssiges BSA im Anschluss wieder zu entfernen, wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Zugabe von 0,5 bis 1ml des ersten Antikörpers erfolgte ebenfalls in PBS (pH=7) mit 1% BSA/Well, wobei zunächst die richtige AK-Konzentration ermittelt werden musste. Der so auf die Zellen gegebene Antikörper wurde dort bei ca. 4°C über Nacht im Kühlschrank belassen.

Der zweite Teil der AK-Färbung begann erneut mit dreimal Waschen mit 2ml PBS (pH=7) /Well bei Raumtemperatur für je 5min. Hiernach kamen ebenfalls 0,5 bis 1ml des Zweit-AK (**Sekundärer Antikörper 2**: Donkey Anti-Mouse IgG, *NorthernLights™* NL557-conjugate Antibody, gekoppelt mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff (Excitation= 557 nm, Emission= 574nm, *R&D-Systems*) wie beim ersten Antikörper in PBS mit 1% BSA/Well für 1-2h abgedunkelt auf die Deckgläschen, ohne sie dabei zu schütteln***. Später wurde auch noch ein mit grünem Fluoreszenzfarbstoff markierten sekundären Antikörper (1:400, Donkey Anti-Goat IgG *NorthernLights™* NL493-conjugated Antibody, Excitation= 493nm, Emission= 514nm, *R&D-Systems*) verwendet. Da von jedem Ansatz mind. zwei Deckgläschen bzw. Objektträger vorhanden waren, wurde stets mindesten eine Probe auch mit BSA 1% durchgeführt, also kein primärer, sondern lediglich der Sekundärantikörper verwendet, um unspezifische Bindungen aufzuzeigen. Anschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Zur abschließenden Kernfärbung, bei der die Zellkerne blau angefärbt wurden, wurden die Deckgläschen vorsichtig mit einer spitzen Pinzette aus den Wells genommen, die Unterseite abgewischt und diese mit der Zelloberseite in die *Vectashield*-Lösung (*VECTASHIELD* Antifade Mounting Medium mit DAPI, *Vector Laboratories*) auf den Objektträger gelegt, welche DAPI zur Kernfärbung enthielt.

Mit dem *Zeiss-Mikroskop Axio Observer 7* und den entsprechenden Lichtfiltern für Blau- (DAPI) und Rot- und Grünfluoreszenz (sekundär-AK) wurden geeignete Fluoreszenzaufnahmen gemacht, wobei das Ziel war, trotz variierender Bedingungen bei jeder Durchführung, Einstellungen wie *Exposure*, *Gain* und Kontrast einheitlich beizubehalten.

Die Bildbearbeitung wurde mit *ImageJ 1.52a (National Institute of Health, USA)* durchgeführt.

*** Nach Testung verschiedener Konzentrationen wurde sich beim Antikörper 1.1 letztlich für eine Konzentration von 1:400 entschieden, wobei auch 1:50 und 1:200 getestet wurden; beim AK1.2 für eine Konzentration von 1:250. Um unspezifische Reaktionen auszuschließen, wurde dabei auch mit Mausserum und BSA 1% als Kontrollen getestet, sodass sowohl unspezifische AK-Bindungen aus dem Serum als auch unspezifische Proteinbindungen mit Proteinen generell ausgeschlossen werden konnten. Die Konzentration des Mausserums entsprach dabei der der geringsten Verdünnung des Antikörpers, d.h. in diesem Fall einer Verdünnung von 1:50. Auf ein Volumen von 1ml kamen bei einer Verdünnung von 1:50 genau 20µl (4µg) des AK, was in diesem Fall 90µl des Mausserums entsprach.

Fortan wurden keine Färbungen mit Mausserum mehr durchgeführt, da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass eine unspezifische Bindung an den Rezeptor und damit eine Färbung stattfinden würde. Die Negativkontrolle mit BSA 1% wurde weiterhin durchgeführt.

II.2.3.2 Liganden-/Proteinfärbung von CXCL12

Neben einer direkten CXCR4-Anfärbung durch einen spezifischen Antikörper und anschließender Inkubation mit einem sekundären AK wurde als alternative Methode zudem die Möglichkeit getestet, über ein Farbstoff-gelabeltes SDF-1a (CXCL12) Protein (*Miltenyi Biotec*, research grade, 100µg, 8kDa), dem spezifischen Liganden für CXCR4, diesen darzustellen und somit den physiologischen Mechanismus widerzuspiegeln. Zunächst wurde dieses Vorgehen nur an INA-6 getestet, später auch an Ko-Kulturen (mit MSC) bzw. an MM1S.

Als Vorbereitung auf die Färbung wurde das in lyophilisierter Form gelieferte Protein (100µg) zunächst mit 100µl PBS gelöst, sodass eine passende Arbeitslösung vorlag. Das Labeln des Proteins erfolgte mit dem *Alexa Fluor 555 Microscale Protein Labeling Kit (A30007, Thermo Fisher)*. Es wurden 4,62µl *reactive dye* zum Liganden hinzugegeben. Dies wurde durch die im Protokoll erhaltene Formel wie

folgt berechnet:
$$\frac{\mu\text{g Protein}}{\text{Protein MW}} \times \frac{1000 \times \text{MR}}{8,11}$$
 (MW= molecular weight [Da], MR= protein molar ratio, 8.11= reactive dye stock solution concentration)

Dabei ergab sich für uns eine Farbstoffmenge von 4,62µl.

Parallel hierzu wurde BSA mit dem Farbstoff gelabelt, welches dann als Negativkontrolle eingesetzt wurde.

Die anschließende Bestimmung des gelabelten und gefilterten Proteingehalts erfolgte mittels *Bradford* Proteinbestimmung (*RotiQuant Protein Assay, Carl Roth*) mit einer 5µl-Probe bei einem Standard von 0-1-2-3-4-5µl BSA unter Verwendung eines *Glomax ELISA Readers (Promega)*. Die anschließende Berechnung wurde in *Excel* durchgeführt, die Aufbewahrung erfolgte bei 2-6°C im Kühlschrank und lichtgeschützt.

Die auf die Proben zu gebende Menge betrug 10^{-7} M (= 100nM)⁵⁶, d.h. in diesem konkreten Fall 0,81µl/300µL PBS.

Die eigentliche Färbung, die zunächst nur an INA-6 durchgeführt wurde, um die Technik zu verinnerlichen und das Vorgehen auch mit anderen und komplexeren Zellkombinationen durchzuführen, erfolgte angelehnt an das laborinterne Protokoll *Färbung mit Alexa-Farbstoff*:

1. 20.000 Zellen pro Ansatz (1x mit Ligand, 1x mit BSA= neg. Kontrolle) aus der normalen Zellkultur wurden verwendet und jeweils in ein Mikroreaktionsgefäß gegeben.
2. Es wurde abzentrifugiert (2000rpm, 5min), und dann 2x mit PBS gewaschen.
3. Stimuliert wurde u.a. mit 100nM gelabeltem BSA bzw. 100nM gelabeltem SDF-1 Liganden (2,7µL einer 1:10-verdünnten Probe auf 100µL PBS), wobei verschiedene Konzentrationen getestet wurden. 1µM erzielte die besten Ergebnisse. Dies wurde auf Eis und lichtgeschützt für ca. 15min auf der Schüttelplatte bei mittlerer Frequenz geschüttelt.
4. Nach Zugabe der Moleküle wurde erneut 2x2min bzw. 4x1min mit PBS gewaschen
5. Die getesteten Suspensionszellen (100µL) wurden ebenfalls über die *Zytospin*-Technik bei 1200rpm für 8min auf *Superfrost*-Objektträger aufgetragen und anschließend mit dem Fettstift eingekreist, um ein Verschwimmen zu verhindern.
6. Anschließend erfolgte die Fixierung in eiskaltem Methanol für 10min, dann das Trocknen an der Luft.
7. Die Zellen wurden mit Vectashield (inkl. DAPI) gefärbt und die Deckgläschen auf Objektträger montiert.
8. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte bei 2-6°C.
9. Die Mikroskopie erfolgte mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (*Leica DMI8, Leica Microsystems*)

Später wurde die Färbung auch an MSC mit SDF-1a Konzentrationen von 0,1µM und 1µM getestet. Die Durchführung blieb dabei dieselbe.

II.3 In-Vitro Chemotherapie mit *dexa-BEAM*

II.3.1 Ansatz der Chemotherapeutika

Um den Einfluss von Chemotherapeutika auf die Expression von CXCR4 in Myelomzellen in-vitro zu untersuchen, wurden zunächst die geeigneten Konzentrationen bestimmt, mit denen diese

⁵⁶ Mishra RK, Shum AK, Platanias LC, Miller RJ, Schiltz GE. Discovery and characterization of novel small-molecule CXCR4 receptor agonists and antagonists. *Sci Rep.* 2016;6:30155. Published 2016 Jul 26. doi:10.1038/srep30155

behandelt werden sollten. Die einzelnen Substanzen wurden dabei der Publikation von *Lapa et al.*⁵⁷ entnommen.

Der Ausdruck *dexa-BEAM* steht dabei für die Substanzen *Dexamethason*, *Carmustin*, *Etoposid*, *Cytarabin* und *Mephalan*. Hinzu kamen noch die Substanzen *Bortezomib* und *Bendamustin*, die in der klinischen Anwendung oft ergänzend gegeben werden.

Geeignete Konzentrationen wurden empirisch aus zuvor in unserem Labor bereits verwendeten Konzentrationen ermittelt oder danach verwendet, wie sie in vergleichbaren Studien in der Zellkultur eingesetzt wurden^{58 59}.

Die verwendeten Medikamente wurden wie folgt gelöst:

1. **Etoposid** (25mg): Mol.masse: 588,56 g/mol, Lsg: Chloroform:Methanol = 1:1, max. 25mg/ml bzw. **100mM**, Die entsprechende Menge erhielten wir mit 0,43ml. Die Aufbahrungstemperatur betrug 4-8°C.
2. **Carmustin** (25mg): Mol.masse: 214,05 g/mol, Lsg: 50% EtOH, bis max. 150mg/ml bzw. **20mM**, 5,84ml enthielten die entsprechende Menge. Gelagert wurde bei -20°C.
3. **Dexamethason** (10mM), BioReagent, Sigma Aldrich GmbH, gelöst in Ethanol. Gelagert wurde bei 4-8°C.
4. **Cytarabin** (50mg): Mol.masse: 243,22 g/mol, Lsg.: Wasser max. 24,32mg/ml bzw. 100mM oder in DMSO max. 12,16mg/ml bzw. 50mM
Es wurde sich für die Lösung in H₂O entschieden, um möglichst wenig Verfälschung durch das Lösungsmittel zu erhalten. 2,056ml enthielten die entsprechende Menge. Aufbewahrt wurde bei 4-8°C.
5. **Melphalan** (50mg): Mol.masse: 309,7 g/mol, Lsg.: 1eq HCl max. 6,1 mg/ml bzw. 20mM oder in DMSO max. 6,1mg/ml bzw. 20mM.
Es wurde sich für DMSO entschieden und 8,072ml zur Herstellung der Lösung benötigt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.
6. **Bortezomib** (2,6µM): Mol.masse: 384,34 g/mol, 3,3-3,8 mg/ml bei pH 2-6,5
Eine bereits angesetzte Lösung, die uns aus der Medizinischen Klinik II, Universitätsklinikum Würzburg übergeben wurde, enthielt 2,6µM in Wasser und konnte bei 4-8°C aufbewahrt werden.
7. **Bendamustin hydrochl.** (10mg): Mol.masse: 421,74 g/mol in Wasser max. 9,87 mg/ml bzw. **25mM** oder in DMSO: max. 39,47 mg/ml bzw. 100mM. Die Lösung erfolgte in H₂O mit 0,949ml. Gelagert wurde ebenfalls bei 4-8° C.

II.3.2 Bestimmung der relativen Viabilität und Apoptoserate

Um die richtigen Konzentrationen zu ermitteln, mit denen die Zellen - vergleichbar mit denen im Körper der PatientInnen- behandeln werden sollten, mussten zunächst die passenden

⁵⁷ Lapa et al., Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy, *BJH* Vol. 184 Issue 3 Pages 440-443, Feb. 2019, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15096>

⁵⁸ Liu N, Wang C, Wang L, Gao L, Cheng H, Tang G, Hu X, Wang J. Valproic acid enhances the antileukemic effect of cytarabine by triggering cell apoptosis. *Int J Mol Med*. 2016 Jun;37(6):1686-96. doi: 10.3892/ijmm.2016.2552. Epub 2016 Apr 8. PMID: 27082972.

⁵⁹ Sakagami H, Hara Y, Shi H, et al. Change in Anticancer Drug Sensitivity During Neuronal Differentiation of PC12 Cells. *In Vivo*. 2018;32(4):765-770. doi:10.21873/invivo.11306

Konzentrationen für die Zellkulturen bestimmt werden. Dabei sollte die Konzentration erhalten werden, bei der die Zellen ihre Proliferation drosseln, aber gleichzeitig nicht übermäßig in Apoptose übergehen. Dafür wurden Apoptose- und Viabilitäts-Messungen unter Verwendung des *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assays* und des *CaspaseGlo® 3/7 Assays* (beide Promega) durchgeführt.

Für jede Messungen wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, um eine ausreichende Validität zu erhalten. Es wurden 96-Well-Platten (*Greiner*) verwendet, wobei für jede Konzentration die rel. Viabilität und Apoptoserate in Triplikaten bestimmt wurde.

Pro Well wurden 1000 INA-6 Zellen bzw. 1500 MM1S Zellen ausgesät. Die Zellen wurden durch Abzentrifugieren aus den Zellkulturen und Resuspension im entsprechenden Medium erhalten, sodass jedes Well mit 50µl Zellsuspension befüllt wurden. Die äußersten Reihen wurden lediglich mit Medium (50µl) befüllt, um einer Verdunstung der Versuchsreihen entgegenzuwirken.

Nach 24h, nachdem sich die Zellen vom Stress erholt hatten, wurden die Medikamente, die zuvor gelöst wurden, in der entsprechenden Konzentration hinzugegeben, jeweils verdünnt in 50µl Medium, sodass sich insgesamt 100µl in jedem Well befanden.

Außerdem wurde immer jeweils gegen den unbehandelten Zelltyp getestet, d.h. in Triplikaten wurde die Apoptoserate und die Viabilität der Zellen ohne Medikamentenzugabe bestimmt.

Nach 24h Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂, insgesamt also 48h nach Ansetzen der Versuchsreihen, wurde die rel. Viabilität bzw. Apoptoserate nach Zugabe von 100µl desjeweiligen Reagenzes bestimmt. Nach 10min Inkubationszeit wurden die Viabilitäts-Ansätze gemessen, nach 30min die Apoptose-Ansätze, und die Ergebnisse mittels *Luminometer (Orion II, Berthold Detection Systems)* gemessen.

Die Medikamente wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Cytarabin in den Konzentrationen 2nM-100nM, Melphalan in den Konzentrationen 0,001µM-10µM, Etoposid in den Konzentrationen 0,001µM-10µM, Carmustin in den Konzentrationen 0,05µM-20µM, Bortezomib in den Konzentrationen 0,5nM-20µM, Bendamustin in den Konzentrationen 0,2µM-100µM und Dexamethason in den Konzentrationen 5µM-5mM.

Dabei wurden auch immer die entsprechenden Lösungsmittel in der höchsten der verwendeten Chemotherapeutika-Konzentrationen mitgetestet, um deren Einfluss herausfiltern zu können. Außerdem erfolgte die Messung stets an einer unbehandelten Kontroll-Gruppe.

INA-6 und MM1S wurden dabei in gleicher Weise getestet.

Bei einzelnen Chemotherapeutika wurden nachträglich noch Nachmessungen bzw. Zwischenmessungen im Konzentrationsspektrum angestellt, um deren Wirkungsbereich noch weiter einzugrenzen bzw. spezifischere Konzentrationen zu ermitteln.

Für die Auswertung verwendeten wir das Programm *Excel* von Microsoft.

Aus den Messwerten wurde jeweils der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Der besseren Auswertbarkeit und Darstellbarkeit wegen wurden die berechneten Werte jeweils auf die der Kontrolle bezogen, welche gleich 1 gesetzt wurde. So waren Veränderungen der Zellen in Relation zur Kontrollgruppe besser darstellbar.

Mittels t-Tests für ungepaarte Stichproben wurde die Abweichung der Mittelwerte vom Standardmittelwert bestimmt und so die Konzentrationen der Medikamente ausfindig gemacht, die einen signifikanten Effekt auf Apoptose und/oder Proliferation hatten.

Anhand dieser Auswertungen wurde definiert, welche Konzentrationen verwendet wurden, um die Zellen zu stimulieren und die Rezeptorexpression von CXCR4 zu untersuchen, d.h. wie sich diese unter Medikamenteneinfluss verhalten würde.

II.4 Charakterisierung des CXCR4 Promotors

II.4.1 In-silico Promotoranalyse mittels Genomatix MatInspector

Die Software *Genomatix MatInspector* (© Intrexon Bioinformatics Germany GmbH 1998-2018), die befristet zur Verfügung stand, um die vorliegende CXCR4-Promotorsequenz darin einzulesen, wurde verwendet, um diese auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen zu untersuchen, in der Hoffnung, Überschneidungen mit ähnlichen Strukturen bei den Chemotherapeutika zu finden.

Die Auswertung der Software ergab eine Reihe von Bindestellen, die zur Diskussion der eingesetzten Medikamente und deren Wirkungen herangezogen wurde bzw. die für weitere Promotoranalysen bei zukünftigen Forschungsarbeiten als Grundlage dienen könnten.

II.4.2 Klonierung des CXCR4-Promotors in den Luciferasevektor pGL4.14

1984 Basenpaare der CXCR4 Promotorsequenz wurden der NCBI Genbank entnommen (*Accession number AJ224869.1, Position 745 - 2728*), kommerziell durch die Firma *BioCat* synthetisiert und in den Vektor *pBluescript II SK+* zwischen die Schnittstellen *Clal* (ATCGAT) und *Xbal* (TCTAGA) kloniert.

Um die CXCR4-Promotoraktivität untersuchen zu können, wurde der CXCR4-Promotor in den Luciferasevektor pGL4.14 (*Promega*) kloniert, in *E.coli*-Bakterien (*NEBalpha* (NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency), *New England BioLabs*) vermehrt und anschließend mittels Transfektion in ein Zellmodell überführt, stimuliert und die Aktivität bestimmt.

Durchführung:

II.4.2.1 Schneiden von pBSIISK+—CXCR4 und pGL4.14 mittels **XhoI** und **KpnI**

Das pBSIISK+—CXCR4 Plasmid mit ca. 5kb Länge wurde bei -20°C gelöst in 40µl H₂O aufbewahrt. Um das CXCR4 Insert in den pGL4.14 Vektor umzuklonieren, wurden beide Vektoren mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *KpnI* (beides *New England Biolabs*) verdaut. Folgende Reaktionen wurden angesetzt:

pBSIISK+—CXCR4 Mix:

Bei einer Konzentration von 2,38µg/µl wurden für den Mix mit 20µg ca. 8µl benötigt, dazu wurden 2µl des Restriktionsenzym *KpnI* (10000U/ml), 1,5µl des Enzyms *XhoI* (20000U/ml), 3µl des Puffers 1.1 (*New England Biolabs*) und 15,5µl H₂O gegeben. Alles zusammen wurde für 2h bei 37°C inkubiert.

pGL4.14 Mix:

Bei einer Konzentration von 3,47µg/µl wurde für 20µg 6µl pGL4.14 Plasmid benötigt. 2µl *KpnI*, 1,5µl *XhoI*, 3µl Puffer 1.1 und 17,5µl H₂O wurden zugegeben und die Reaktion wurde für 2h bei 37°C inkubiert.

II.4.2.2 Gelelektrophorese

Die beiden Ansätze wurden jeweils komplett in zwei Taschen eines 4% Agarosegels aufgetragen, wobei je die erste Tasche für 10µl Loading Puffer vorgesehen war. Die Banden wurden bei 100V für ca. 30min aufgetrennt, sodass diese danach unter UV-Licht visualisiert und ausgeschnitten werden konnten, wobei die kleinere Bande den CXCR4 Promotor und die größere Bande das geschnittene pGL4.14 darstellte.

II.4.2.3 DNA-Extraktion aus dem Gel

Die Gelextraktion der DNA erfolgte mit dem *peqGOLD Gel Extraktions Kit (Peqlab, VWR)* nach Herstellerangaben. Die in Aliquots befindlichen Gelstücke wurden jeweils separat behandelt. Die Gelstücke wurden gewogen und etwa das gleiche Volumen Binding Puffer hinzugegeben. Dann wurde für 7min bei 55-65°C inkubiert, alle 2-3min durch Schütteln oder Vortexen dazu beigetragen, dass sich das Gel schneller komplett auflöst. Eine spezielle *PerfectBind DNA Column* wurde beladen (max. 750µl), sodass eine Bindung der DNA an die darin enthaltene Silikamembran stattfinden konnte, wobei darauf geachtet werden sollte, dass die Pufferfarbe stets gelb blieb, um eine perfekte Bindung zu ermöglichen. Für 1min wurde mit 10000g zentrifugiert. Zur Entfernung von Kontaminationen wurden zwei- bis dreimal Zentrifugations-Waschschritte mit speziellen Puffern durchgeführt, wobei nach jedem Schritt für 1min bei 10000g zentrifugiert wurde: einmal wurde mit 300µl Binding Puffer gewaschen, dann zweimal mit 600µl CG Wash Puffer, der jedes Mal für 2-3min inkubieren sollte. Durch erneutes Zentrifugieren wie oben sollte die Säule trocken zentrifugiert werden, was einen essenziellen Schritt darstellte. Der letzte Schritt war die Elution der noch gebundenen DNA durch einfache Gabe von 30-50µl RNase-freies H₂O, sodass am Ende die isolierte DNA aus den Plasmiden vorlag.

II.4.2.4 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Für die Ligation des CXCR4-Promotorfragments mit dem pGL4.14 Plasmid (pGL4.14-CXCR4-Prom) wurde das Ligations-Protokoll für T4-DNA-Ligase (M0202, 400000U/ml, *New England BioLabs Inc.*) verwendet. Der Ligationsmix bestand aus 2µl Ligase-Puffer, 1µl Ligase, 1µl pGL4.14 (*XhoI/KpnI* geschnitten), 5µl CXCR4-Promotor (*XhoI/KpnI* geschnitten) und 11µl H₂O, was insgesamt 20µl ergab. Das Verhältnis von Promotor zu Plasmid von 5:1 erhöhte dabei die Chancen auf eine erfolgreiche Ligation. Das Gemisch wurde bei 16°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10min bei 65°C hitzeinaktiviert und 1-5µl sodann für die Transformation von 50µl kompetenter Zellen eingesetzt.

II.4.2.5 Transformation kompetenter E.coli

Auch die kompetenten Bakterien wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut. Es wurden 5µl des Ligations-Mix zu 50µl Bakterien gegeben und vorsichtig gemischt. Die folgende Temperaturfolge galt es streng einzuhalten: zunächst 30min auf Eis, dann 30s bei 42°C „heat shock“, darauf wieder 2min

auf Eis. Es wurden 250µl SOC-Medium (*New England Biolabs*) hinzugegeben und das Ganze für eine Stunde bei 37°C geschüttelt.

II.4.2.6 Ausplattieren auf LB-Platten

Die ligierten und transformierten Bakterien wurden mittels eines abgeflamten Glasspatels auf runde Petrischalen mit LB Agar-Nährmedium aufgetragen und wuchsen dort in 24h zu Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) heran. LB-Platten wurden wie folgt angesetzt: 10g Tryptone, 5g yeast extract, 10g NaCl (alles *Applichem*) wurden in ca. 900ml sterilem H₂O gelöst, der pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt und auf 1000ml aufgefüllt. Es wurden 20g Bactoagar auf 1l zugegeben, das Gemisch wurde autoklaviert und dann abgekühlt. Anschließend wurde das sterile Antibiotikum, in diesem Fall Ampicillin, in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugegeben. Pro Petrischale wurde so viel Medium hinzugegeben bis der Boden bedeckt war. Mögliche Luftblasen wurden durch Abflammen entfernt. Anschließend wurde es abgekühlt, eingetütet und bei 4°C umgedreht gelagert.

II.4.2.7 Minipräparation

Von diesen Platten wurden mittels einer dünnen 0,5-10µl Pipettenspitze 10 Kolonien gepickt und diese jeweils in ein Snap-Cap-Behältnis überführt, das mit je 2ml LB-Medium (*Applichem*) und 100 µg/ml Ampicillin (*Sigma Aldrich*) befüllt war. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C und 300rpm, wobei die Deckel nur leicht aufgesetzt wurden, um genug O₂ an die Bakterien herankommen zu lassen. Eine erfolgte Trübung des LB-Mediums am nächsten Tag war dabei Hinweis auf eine Vermehrung von positiv selektierten Bakterien, die erfolgreich mit Plasmid und damit auch Ampicillin-Resistenz transformiert wurden, was ihr Wachstum im Medium erklärte. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *NucleoBond Plasmid mini Kits* der Firma *Macherey und Nagel* nach Angaben des Herstellers isoliert (siehe unten).

II.4.2.8 Sequenzierung (CXCR4-Promotor in pGI4.14)

Die Sequenzierung wurde mit den Primern RV3 (*Promega*) und dem Primer SeqLuc2 (5'-tcatggctttgtgcagctgc-3') unter Verwendung des *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits* (*Life Technologies GmbH*) durchgeführt. Es wurden pro Ansatz je 5µl DNA, 4µl BigDye Mix, 2µl Seq.puffer, 1µl Prime, 8µl H₂O eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte in einem Thermocycler.

Die Aufreinigung der sequenzierten DNA erfolgte über eine *NucleoSpin™ Tissue Säule* (Nr. 740523-250, *Macherey-Nagel*).

- 1) Zunächst wurde die Säule vorbereitet: dafür wurden 30min zuvor 600µl Aqua bidest auf die Säule gegeben, anschließend wurde für 2min bei 3000rpm zentrifugiert.
- 2) Die Säule wurde in ein neues Mikrogefäß überführt. Hierauf wurden 20µl des PCR-Produkts aufgetragen und bei 3000rpm für 6min zentrifugiert.
- 3) Für das Ausfällen der DNA wurden 2µl 3M Na-Acetat, pH 4,8 hinzugegeben, zudem 80µl 96%igen EtOH. Nach 15min bei 14000rpm wurde der Überstand verworfen.
- 4) Das Pellet wurde mit 200µl 70%ige EtOH gewaschen und für 3min bei 14000rpm zentrifugiert. Das EtOH wurde entfernt, das getrocknete Pellet abgenommen und eingefroren.

- 5) Für die Sequenzierung wurde das Pellet in 30ml Hi-Di-Formamid (*Thermo Fisher*) gelöst.
Die Analyse der sequenzierten DNA erfolgte in der Humangenetik des Biozentrums der Universität Würzburg.

II.4.2.9 DNA-Plasmid Präparation

Erfolgte eine Trübung des Snap-Cap-Inhalts, wurde dieser in einen Erlenmeier-Kolben in 200ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und erneut für mehrere Stunden bzw. über Nacht bei 37°C inkubiert und abzentrifugiert, sodass nur noch das Zellpellet übrigblieb. Die Re-Suspension und anschließende Aufreinigung über Filter erfolgte nach dem Protokoll zur Plasmid-DNA-Präparation, genauer der Isolation von highcopy-plasmid DNA aus *E.coli* von *Macherey-Nagel* (s. *NucleoBond Xtra Maxi kit for transfection-grade plasmid DNA*) nach Angaben des Herstellers.

Das gewonnene DNA-Pellet wurde in 25µl RNAse-freiem H₂O resuspendiert und die Konzentration mittels Photometer in einer 1mm-Küvette gemessen.

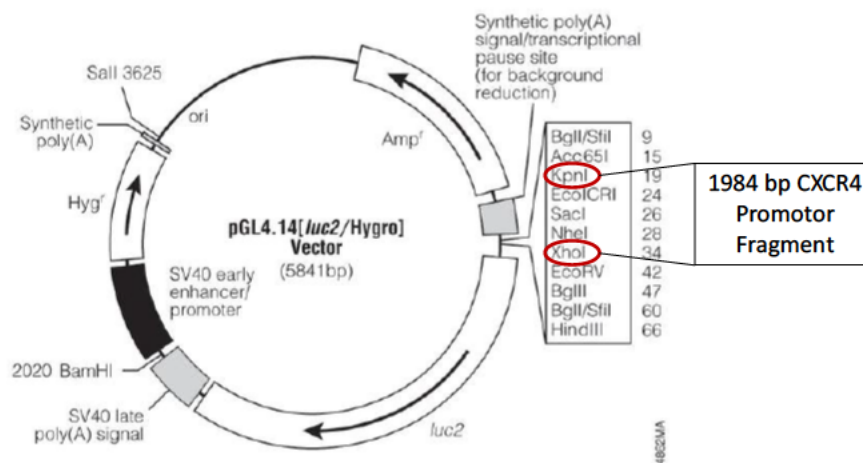


Abb. 9: CXCR4 Promotorfragment im Luciferase Reportervektor pGL4.14 (pGL4.14-CXCR4-Prom). Ziel war es, den CXCR4-Promotor in den pGL4.14-Vektor einzuschleusen, um über dessen gekoppelte Luciferase-Funktion anschließend die Promotoraktivität messbar zu machen. Dabei wurden der Promotorabschnitt mittels der Restriktionsenzyme KpnI und XhoI sowie der T4-DNA-Ligase eingebracht. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl414-vector.pdf?rev=8a70ce538f95465a958e10a3c82db41d&la=en> (modifiziert, 20.02.22)

II.4.3 Transiente und stabile Transfektion von Myelomzellen

Für die Stimulationsversuche und die Testung der CXCR4 Promotoraktivität musste das pGL4.14-CXCR4 Plasmid zunächst in die Myelomzellen eingebracht werden. Angelehnt an das Paper von Prof. Bargou⁶⁰, Uni-Klinikum Würzburg, wurde dafür die Methode der Elektroporation gewählt. Myelomzellen vom Typ INA-6 und MM1S ließen sich demnach besonders leicht transfizieren. Anschließend wurden direkt im Anschluss die transient transfizierten Zellen getestet. Um jedoch verlässlichere Ergebnisse zu erhalten, war es das Ziel, diese Versuche auch an stabilen transfizierten

⁶⁰ Steinbrunn T, Chatterjee M, Bargou RC, Stühmer T. Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation—an appraisal. *PLoS One*. 2014;9(6):e97443. Published 2014 Jun 5. doi:10.1371/journal.pone.0097443

Zellen durchzuführen. Hierzu wurde das pGL4.14-CXCR4-Promotor-Konstrukt sowie der pGL4.14 Leervektor mit dem Restriktionsenzym wie oben linearisiert. Die Durchführung erfolgte analog wie im Kapitel II.4.2 beschrieben.

II.4.3.1 Hygromycin-Verträglichkeitstest

Zunächst wurden die Effekte verschiedener Konzentrationen von Hygromycin (*Thermo Fisher Scientific*) auf die INA-6 und MM1S Myelomzellen getestet. Denn zur Herstellung von stabilen Zellen für weitere Versuche wurde sich dem Prinzip der positiven Selektion derjenigen Zellen bedient, die durch die Einschleusung der Plasmid-DNA neben dem Promotor ebenfalls einen Abschnitt erworben hatten, der eine Antibiotika-Resistenz gegenüber Hygromycin besaß.

Für die **INA-6**-Zellen wurde eine 12-Well-Platte verwendet, wovon 6 Wells mit 2×10^5 Zellen/Well mit je 2ml Medium und entsprechend 20 ng/ml IL6 belegt wurden. Der Kontrollgruppe wurde kein Hygromycin hinzugegeben, wohl aber alle anderen Zellkulturen. Hygromycin wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 200µg/ml, 400µg/ml, 800µg/ml, 1,6 mg/ml.

Unter regelmäßiger Beobachtung wurde das Zellwachstum mittels regelmäßiger Zentrifugation, Mediumwechsel und erneuter Hygromycin-Zugabe kontrolliert. Entsprechend des beobachteten Zellwachstums wurde eine passende Konzentration ausgewählt, wobei keine komplette Eradikation des Zellrasens, aber eine starke Hemmung mit anschließendem erneutem Wachstum angestrebt wurde.

Mit **MM1S** wurde wie mit INA-6 (s. oben) verfahren. Im Prinzip stellte sich der Versuch ebenso dar, nur wurden andere Konzentrationen verwendet, denn die Zellen reagierten bereits bei einer geringeren Konzentration sensibel auf Hygromycin. Es wurden die Konzentrationen 200µg/ml, 400µg/ml, 800µg/ml, 1,6mg/ml, 3,2mg/ml getestet. Es erfolgte ebenso regelmäßiges Splitten sowie Mediumwechsel und Neuzugabe von Hygromycin in der 12-Well-Platte.

II.4.3.2 Transfektion der Myelomzellen (Elektroporation)

Das Einbringen des pGL4.14-CXCR4 Promotor Plasmids in die Myelomzelllinien INA-6 und MM1S erfolgte mittels Elektroporation. Es wurden folgende vier Ansätze gewählt: zirkulärer sowie linearisierter pGL4.14 Leervektor, zirkuläres sowie linearisiertes pGL4.14-CXCR4-Prom. Konstrukt. Als Mix wurden die Zellen (2×10^6 Zellen pro Ansatz) zusammen mit entsprechendem Medium (350µl, ohne FCS und ohne Penicillin/Streptomycin) und 10µg der jeweiligen DNA zusammengegeben. Dieses Gemisch wurde in Elektroporations-Küvetten mit Deckel (*BioRad*) gegeben, die zuvor mit 70%igem Alkohol gereinigt wurden. Die Elektroporation wurde angelehnt an das zitierte Paper bei 180V (INA-6) bzw. 200V (MM1S), 975µF und einem Impuls von ca. 10ms mit einem *GenePulser II* (*BioRad*) durchgeführt.

Für die transiente Transfektion wurden zunächst verschiedene Mengen an Zellen für die Transfektion getestet, um die Elektroportion möglichst effizient zu gestalten. Deshalb wurden sowohl 4×10^6 Zellen als auch 2×10^6 Zellen transfiziert und die Ergebnisse als Ausgangspunkt für die weiteren Transfektionen verglichen. Die transfizierten Zellen wurden mit 10ml Medium resuspendiert und je

1ml des transfizierten Zellgemisches (INA-6 mit IL6) in ein Well gegeben. Dabei wurde eine 24-Well-Platte verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ für 24h.

Zur Selektion stabiler Zellen wurde die gesamte Menge an transfizierten Zellen (350µl) jeweils in 50cm² Flaschen mit 5ml Medium und der entsprechenden Menge an IL6 bei INA-6 Zellen überführt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24h Inkubation wurden 400µg/ml (INA-6) bzw. 250µg/ml (MM1S) Hygromycin hinzugegeben, um lediglich die erfolgreich transfizierten Zellen zu selektieren. Die positive Selektion der resistenten und damit positiv transfizierten Zellen wurde zunächst visuell durch das Lichtmikroskop (LM) bestimmt. Dort wurde bei dieser Konzentration anfangs ein Absterben der meisten Zellen beobachtet, dann ein opportunistisches Wachstum der resistenten Zellen. Nach einem zwischenzeitlichen Wechsel der Konzentration wurde die ursprünglich gewählte Konzentration jedoch beibehalten. Nach 4 Tagen wurde jeweils 1ml Zellsuspension aus jedem Ansatz zur Luciferasebestimmung entnommen, diese mit PBS gewaschen und nach Zentrifugation in 1ml 1x *Pierce Luciferase Cell Lysis Puffer* resuspendiert. Für die Luciferasemessung (siehe unten) wurden je 20µl verwendet. Nach 5 und 6 Tagen erfolgte die erneute Abnahme von jeweils 1ml zur Verlaufskontrolle der Luciferaseaktivität und damit der Menge des enthaltenen Plasmids. Mit dem *Roti Quant Protein Assay* wurde, wie oben bereits beschrieben, nach Angaben des Herstellers die jeweilige Proteinmenge in jedem Ansatz und damit die ungefähre Zellzahl bestimmt. Zur Ermittlung der tatsächlichen Luciferaseaktivität bezogen auf das enthaltene Protein und damit indirekt die Zellmenge wurde zuletzt die Luciferaseaktivität relativ zur Proteinmenge bestimmt.

II.4.3.3 Herstellung stabiler transfizierter Zellen

Entsprechend der Verträglichkeitstests mit Hygromycin wurden die Zellen nach erfolgter Transfektion mit den jeweils ermittelten Konzentrationen (s. Ergebnisteil) behandelt. Dabei erfolgte in regelmäßigen Abständen der Mediumwechsel mit erneuter Hygromycin-Zugabe.

Zur Überprüfung des Erfolgs der Transfektion und der Beibehaltung des eingeschleusten CXCR4-Abschnitts, wurden in regelmäßigen Abständen Zellen entnommen und die Luciferase-Aktivität bestimmt.

Bei deutlich erhöhter Luciferase-Aktivität bezogen auf die enthaltene Proteinmenge über einen längeren Zeitraum konnte von einer Resistenz gegenüber Hygromycin und damit erfolgreichem Erhalt stabiler transfizierter Zellen ausgegangen werden.

II.5 Stimulationsversuche mit transfizierten Myelomzellen

Da zunächst keine stabilen transfizierten Zellen vorlagen, wurden die Versuche zu Beginn an den per Elektroporation transient transfizierten Zellen durchgeführt. Dies erfolgte wie oben beschrieben. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden in einem späteren Schritt mit denen der stabilen Zellen verglichen. Die Stimulation der Zellen erfolgte 24h nach Elektroporation, nach weiteren 48h wurde die CXCR4 Promotoraktivität gemessen.

II.5.1 Stimulation

Die Kontrolle bildeten transfizierte, aber lediglich mit Zellmedium beimpfte Zellen, auf welche kein Medikament gegeben wurde.

Die verwendete Medikamentendosis wurde von den zuvor in den Viabilitäts- und Apoptose-Messungen bestimmten Konzentrationen abgeleitet. Für die Versuche wurden die Medikamente Carmustin in der Konzentration 1µM, Bendamustin in der Konzentration 40µM, Melphalan in der Konzentration 2µM, Etoposid in den Konzentrationen 0,05-0,1µM, Bortezomib in den Konzentrationen 0,6nM-0,5µM, Cytarabin in den Konzentrationen 0,1-0,5µM, sowie Dexamethason in den Konzentrationen 2-5µM verwendet. Da sich durch deren Zugabe das Volumen pro Well verdoppelte, wurde für jede Zugabe die doppelte Menge jedes Medikaments berechnet, um auf dieselbe Konzentration zu kommen. Zur Kontrolle wurden Zellen auch mit dem jeweiligen Lösungsmittel behandelt. Die Analyse erfolgte zunächst in Einzelwerten, später jedoch in Triplikaten, wobei jeder Wert doppelt bestimmt wurde.

II.5.2 Messung der Luciferaseaktivität

Für die Messungen der Lumineszenz wurde je 1ml jedes Ansatzes entnommen und in ein Aliquot gegeben. Nach 5min bei 2000rpm wurde es mit 1ml PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 2000rpm für 5min und Zugabe von 150µL *Pierce Luciferase Cell Lysis Puffer* wurde alles durchmischt und bei -20°C für 24h aufbewahrt. Jedem der Aliquots wurden 20µl entnommen und auf eine 96 Well-Platte überführt. Mithilfe eines *Orion II Luminometers (Berthold Detection System)* wurden jeweils 150µl Luciferasereagenz (*Luciferase Assay Promega*) injiziert und direkt im Anschluss die Lumineszenz gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte analog, wie oben bereits beschrieben, mit dem *RotiQuant Protein Assay*.

II.5.3 Auswertung

Die dadurch erhaltenen Daten wurden mittels *Excel* ausgewertet. Dabei wurde immer aus zwei Messwerten, sowohl bei der Proteinmenge als auch der Luciferase-Werte, ein Mittelwert gebildet, welcher in Relation zueinander gebracht wurde. Die Werte wurden grafisch als Säulendiagramme aufgetragen und beschriftet. Wurden dabei mehrere Wiederholungen eines Versuches durchgeführt, wurden zudem t-Test und Standardabweichung bestimmt und grafisch ergänzt, vergleichbar mit der Durchführung bei den Viabilitäts- und Apoptose-Bestimmungen.

II.5.4 Stimulation stabiler Zellen

Es gelang der erfolgreiche Erhalt stabiler INA-6-Zellen nach Transfektion mit linearisiertem CXCR4-Genabschnitt. Analog der Durchführung bei den transient transfizierten Zellen erfolgte die Stimulation mit verschiedenen Substanzen und Lösungsmitteln, wobei die mit dem CXCR4.pGL4.14-Promotor transfizierten mit den lediglich mit pGL4.14-transfizierten Zellen verglichen wurden und jeweils auch einmal lediglich mit Medium behandelt wurde, um eine Kontrolle zu gewährleisten.

Da uns zum Zeitpunkt des Erhalts der stabilen Zellen bereits Vorkenntnisse zur Stimulation vorlagen, erfolgte diese hier mit einer begrenzteren Auswahl an Substanzen bzw. mit denen, die sich als Vielversprechendste, also am wirksamsten erwiesen hatten.

Die Luciferase-Aktivität wurde auch hier im Verhältnis zur Proteinmenge berechnet.

II.5.4.1 WST-1 Assay

Ergänzend wurde hier noch ein WST-Assay (*Roche*, # 11644807001) durchgeführt, um den Einfluss der Substanzen auf Zellproliferation, -viabilität und -toxizität zu messen. Die Durchführung erfolgte dabei nach Angaben des Herstellers, u.a. bei einem pH-Wert von 8, einer Endverdünnung von 1:10 pro Well und einer Wellenlänge zur Extinktionsmessung von 440-480nm.

An Tag 1 erfolgte die Aussaat von 1000 Zellen/ 100µl auf 96-Well-Platten (transparent), an Tag 2 die Stimulation. Die Messungen fanden nach 48h durch Zugabe von jeweils 10µl WST-Reagenz und nach Inkubation für 30min im Brutschrank statt, wobei für die Messung im Glo-Max eine Wellenlänge von 450nm und für die Referenz 600nm verwendet wurden.

Diese kalorimetrische Methode -wie auch schon bei den Viabilitätsmessungen zuvor- bot eine gute, nicht-radioaktive Möglichkeit zur indirekten Quantifizierung der Zellzahl und damit Verhinderung eines übermäßigen Abtötens der Zellen durch zu hohe Konzentrationen.

II.6 Stimulation und Transkriptions-Aktivität (RNA-Messung)

Neben dem Effekt, den die verschiedenen Medikamente des *dexa-Beam-Schemas* auf die Myelomzellen in Bezug auf deren Promotoraktivität haben oder nicht haben, wurde auch deren Einfluss auf RNA-Ebene im Sinne einer Induktion der CXCR4-Expression und damit vermehrten RNA-Bildung, vergleichbar wie bei Versuch 1, untersucht. Der Versuch wurde dreimal sowohl für INA-6 als auch für MM1S durchgeführt.

II.6.1 Stimulation & Isolation

Vergleichbar mit den Stimulationsversuchen der Promotoraktivität, wurden die Zellen 24h nach Aussaat stimuliert und die RNA nach weiteren 48h isoliert. Pro Ansatz wurden 5×10^5 Zellen verwendet und mit 5ml in ein 50cm² Fläschchen gegeben. Danach wurden die Zellen für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es erfolgte die gleiche Stimulation wie in den vorherigen Versuchen mit Carmustin, Bendamustin, Melphalan, Etoposid, Bortezomib, Cytarabin und Dexamethason sowie mit dem jeweiligen Lösungsmittel als Kontrolle. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem NucleoSpin-RNA Kit nach Angaben des Herstellers (siehe oben). Aufbewahrt wurde die gewonnene RNA bei -20°C.

II.6.2 Nachweis der CXCR4-Expression

RNA-Isolation und Messung stellten sich ebenso dar wie in den Ko-Kultur-Versuchen zu Beginn. Auf gleiche Weise wurde auch die entsprechende cDNA hergestellt, die qPCR-Ansätze vorbereitet und jeweils dreimal die qPCR durchlaufen. Zusätzlich wurde der Versuch mit der Darstellung der RNA-Abschnitte über eine Gelelektrophorese ergänzt (siehe oben).

III. Ergebnisse

III.1 Interaktion zwischen MSC und INA-6-Zellen

Um den Einfluss von Dexamethason auf die CXCR4 Expression in MSC und Myelomzellen zu analysieren, wurde eine Ko-Kultur angesetzt und nach 48 h Inkubation die CXCR4 Expression mittels konventioneller PCR, qPCR und immunzytochemischer Verfahren analysiert.

Untersucht wurden dabei jeweils INA-6, MSC und deren Ko-Kulturen, wobei teilweise auch Dexamethason hinzugeben wurde, um die Zellen zu stimulieren. Auch die nicht-adhärenenten INA-6 Zellen der Ko-Kultur-Ansätze wurde untersucht. So konnte die enthaltene RNA nach Extraktion als Bande qualitativ und über deren Stärke auch semi-quantitativ dargestellt werden.

III.1.1 CXCR4-Expression auf RNA-Ebene (PCR)

Generell zeigte sich eine erhöhte CXCR4-Expression in den INA-6-Ansätzen. Diese konnten z.T. durch kräftigere Banden dargestellt werden. MSCs wiesen demnach eine geringere CXCR4-Expression auf. Eine Induktion der CXCR4-Expression in MSC durch INA-6 konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, da diese aufgrund der starken Bindung nicht mehr voneinander getrennt werden konnten, so dass es zu Verunreinigungen und damit keiner speziell den MSC zuzuschreibenden CXCR4-Expression kam. Diese Verunreinigung erfolgte über den Nachweis der IGKC3 (*Immunoglobulin kappa constant 3*) Expression.

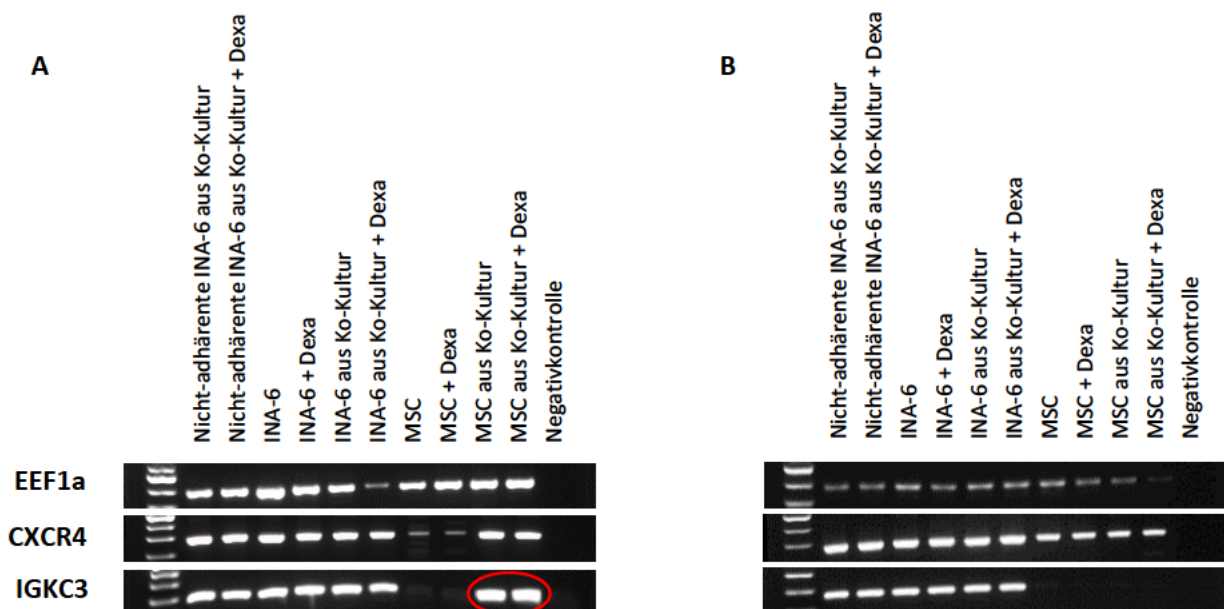


Abb. 10: **CXCR4 Gelelektrophorese MSC und INA-6**, **A:** Nachweis der CXCR4- und IGKC3-Expression in INA-6 und MSC sowie deren Ko-Kultur. Markiert ist die deutlich sichtbare Expression von IGKC3 bei den MSC aus Ko-Kultur. **B:** Nachweis der CXCR4- und IGKC3-Expression in INA6 und MSC. Keine IGKC3-Expression in den MSC-Ansätzen aus Ko-Kultur. Gezeigt sind repräsentative Gele. Die Versuche wurden viermal durchgeführt mit mind. je zwei Messpunkten. *IGKC3= Immunoglobulin kappa constant 3*, *EEF1a= eukaryotic elongation factor 1a*, *Dexa= Dexamethason*.

Auch der Einfluss von Dexamethason auf CXCR4 konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, auch wenn in einem Ansatz eine deutlich stärkere Bande bei der Zugabe von Dexamethason nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dies ist aber lediglich als Indiz zu sehen, da nicht in allen vier

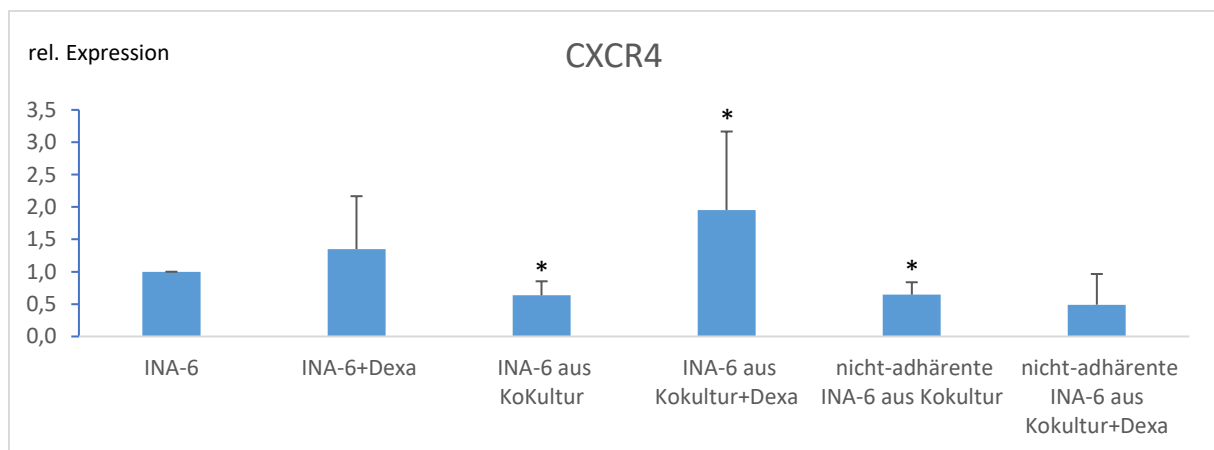
Versuchen reproduzierbar. Die Ergebnisse der semi-quantitativen Analyse waren zu ungenau, sodass die CXCR4 Expression im Anschluss mittels qPCR analysiert wurde.

III.1.2 Quantifizierung der CXCR4-Expression (qPCR)

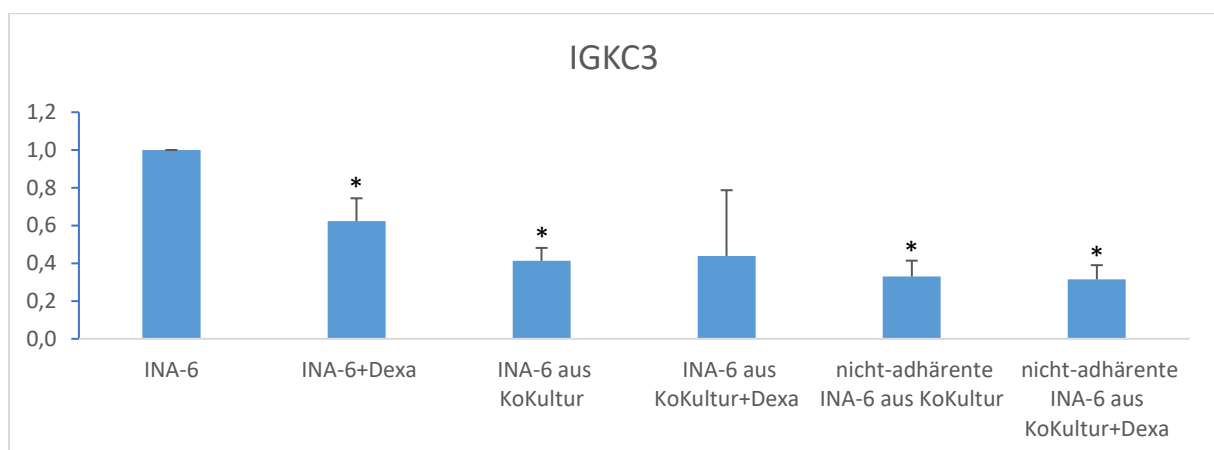
Zur genaueren Quantifizierung der CXCR4-Expression wurden die identischen Versuchsansätze mittels Real-Time PCR analysiert, um so eine genaue Vergleichbarkeit zu erhalten.

Bei den **INA-6** konnte ein signifikanter Effekt bzgl. der CXCR4-Expression der Zellen aus dem Ansatz der INA-6 aus Ko-Kultur und dem der nicht-adhärenen Zellen der Ko-Kultur beobachtet werden, wobei beides wahrscheinlich am ehesten auf eine insgesamt geringere Zahl an INA-6 zurückzuführen ist. Ein signifikanter Effekt ($\alpha = 5\%$) von Dexamethason (Ko-Kultur im Vergleich zu Ko-Kultur + Dexa) ließ sich nicht nachweisen.

A



B



*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 11: **INA-6, A: Relative CXCR4-RNA-Expression in verschiedenen Ansätzen.** Es zeigten sich unterschiedliche CXCR4-Expressionen je nach Ansatz, wobei diese niedriger war in den Ko-Kultur- und Ko-Kultur-Ansätzen mit nicht-adhärenen INA-6. Zu einer signifikanten Zunahme der Expression kam es bei dem zusätzlich mit Dexamethason (Dexa) stimuliertem Ko-Kultur-Ansatz. Diese Veränderungen sind relativ zu der von unbehandelten INA-6 zu sehen. **B: relative IGKC3-RNA-**

Expression in verschiedenen Ansätzen. Es zeigten sich signifikante Effekte der IGKC3-Expression (*Immunoglobulin kappa constant 3*), ein für INA-6 typisches Gen. Dabei zeigten die Ansätze mit INA6 aus Ko-Kulturen ein signifikant niedrigeres Expressionsmuster. Aber auch die Zugabe von Dexa bei INA-6 zeigte eine signifikant niedrigere Expression. In keinem der Ansätze kam es zu einer Erhöhung. (Relative Expression= die Expression des Ziel-Gens (CXCR4/IGKC3) im Verhältnis zur Expression des Haushaltsgens RPS27A, *ribosomal protein S27a*). Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit je drei Messpunkten unter Angabe der Standardabweichung, student's t-test, *p < 0,05.

Bei den **MSC** zeigte sich kein signifikanter Effekt bezogen auf die Kontrolle. Weder Dexamethason noch die Ko-Kultur führten zu einer signifikanten Zu- oder Abnahme der CXCR4-Expression, wobei jedoch eine gewisse Schwankungsbreite bei der Ko-Kultur beobachtet werden konnte (Standardabweichung), weshalb ein möglicher Effekt nicht ausgeschlossen werden kann. Ein eindeutiger Effekt war jedoch nicht quantifizierbar.

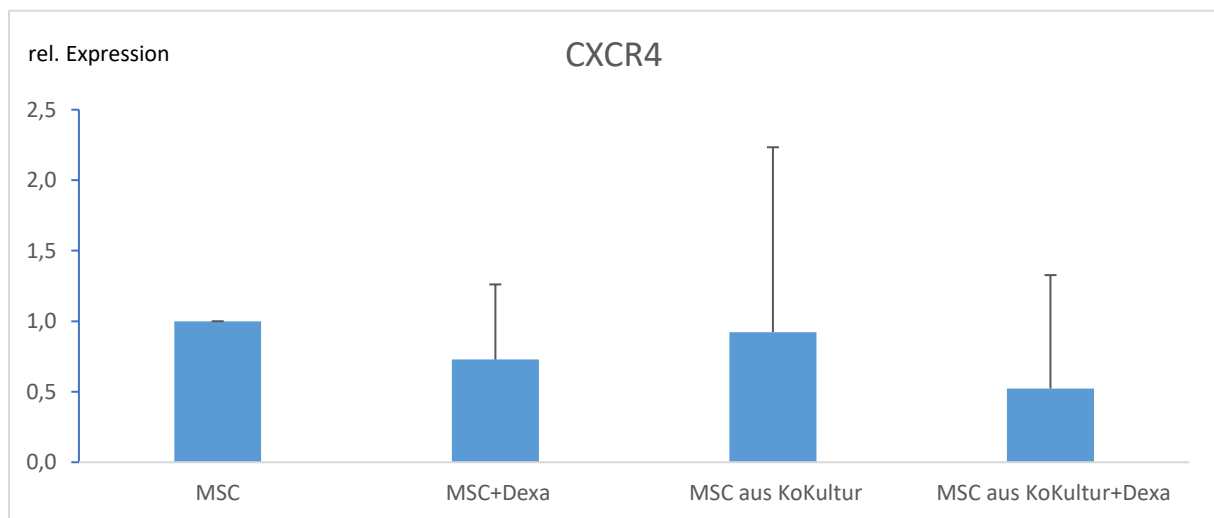


Abb. 12: **MSC, relative CXCR4-RNA-Expression in verschiedenen Ansätzen.** Bei den Ansätzen mit MSC zeigten sich keine signifikanten Effekte in der Beeinflussung der CXCR4-Expression, aber z.T. eine breite Streuung der Messungen. (Relative Expression= die Expression des Ziel-Gens (CXCR4) im Verhältnis zur Expression des Haushaltsgens RPS27A, *ribosomal protein S27a*). Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit je drei Messpunkten unter Angabe der Standardabweichung, student's t-test, *p < 0,05. Dexa= Dexamethason.

III.1.3 CXCR4-Nachweis auf Proteinebene

III.1.3.1 Immunzytologie

In einem nächsten Schritt wurde CXCR4 durch immunzytochemische Verfahren auf Proteinebene nachgewiesen, um Veränderungen der Rezeptorverteilung und -menge auf der Zelloberfläche sichtbar zu machen. Hierbei zeigten sich grundsätzliche Unterschiede je nach Zellart, wobei sich die immunzytochemische Färbung von CXCR4 grundsätzlich als schwierig erwies. Im Folgenden soll auf die Versuche und die Ergebnisse mit INA-6, MSC und die Ko-Kultur eingegangen werden.

In einem ersten Schritt konnte an den **INA-6**-Zellen gezeigt werden, dass der membranständige CXCR4 Rezeptor auf Proteinebene nachgewiesen werden kann. Jedoch zeigte sich beim Blockieren mit Mausserum eine unspezifische Bindung des sekundären AK. Es konnte aber gegenüber der Negativprobe (nur Sekundär-AK) eine Anfärbbarkeit gezeigt werden, sodass immerhin von einer erfolgreichen Darstellung des CXCR4-AK ausgegangen werden konnte.

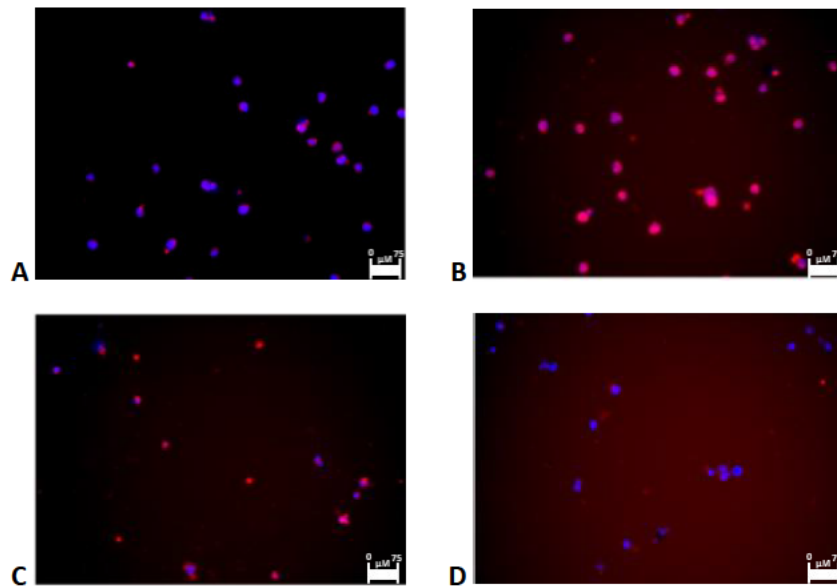


Abb. 13: INA-6, Immunzytologie CXCR4. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. Zu erkennen ist eine erfolgreiche Farbmarkierung der INA-6 mittels mit rotem Farbstoff gekoppeltem sekundärem Antikörper in **A** (INA-6, Verdünnung des sekundären Antikörpers mit 1:50) nach primärem AK. Auch in einer Verdünnung von 1:200 in **B** (INA-6) konnte der CXCR4 der INA-6 gut sichtbar gemacht werden. Bei **C** erfolgte allerdings ebenfalls eine Färbung, wobei hier kein primärer Antikörper verwendet wurde (Kontrolle einer unspezifischen Bindung, INA-6, sekundärer Antikörper in einer 1:50-Verdünnung). Bei der Kontrollprobe mit 1% BSA in **D** (INA-6, sekundärer Antikörper mit 1:50) erfolgte keine Färbung. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

In weiteren Durchführungen kam es zu einer größeren Varianz der Ergebnisse, weshalb die Menge der zu färbenden INA-6-Zellen variiert wurde. Da auch dies keinen Erfolg brachte, wurde alternativ ein weiterer mit grünem Farbstoff-gekoppelter Sekundär-Antikörper verwendet.

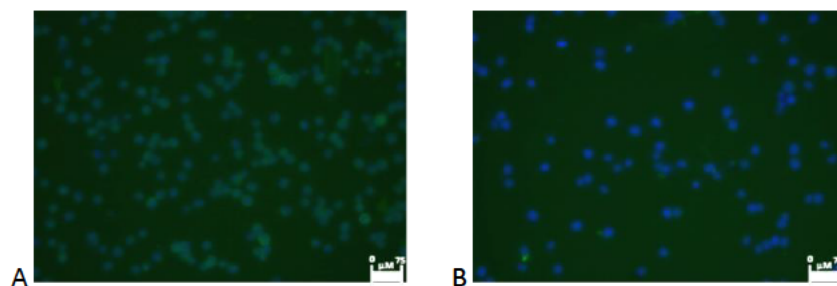


Abb. 14: INA-6, Immunzytologie CXCR4, mit grünem Farbstoff gekoppelter sekundärer AK. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. Bei Verwendung eines weiteren sekundären AK konnte ebenfalls CXCR4 in INA-6 (300µl) in **A** detektiert werden, wobei der Antikörper mit einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde. Diese blieb bei der negativen Kontrolle in **B** aus, wobei gleiche Bedingungen herrschten (300µl INA-6, 1:200 Verdünnung des sekundären Antikörpers und 1% BSA). Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

Es konnte erneut eine Expression des Rezeptors detektiert werden, der bei der „Negativprobe“, d.h. der Färbung ohne primären Antikörper ausfiel, sodass von einer positiven Rezeptorfärbung ausgegangen werden konnte. Bei Zugabe von Dexamethason blieb diese Färbung allerdings erneut aus.

Bei der immunzytologischen Färbung der MSC zeigte sich keine signifikante Färbung und kein Unterschied zu den Kontrollen ohne primären AK. Eine stärkere Färbung konnte nur durch eine verlängerte Expositionszeit erzielt werden, wobei diese am ehesten auf eine unspezifische Hintergrundfärbung zurückzuführen war. Auch durch Blockieren mit BSA, was hier noch einmal durchgeführt wurde, ergab sich keine Bindung an den Rezeptor, da dieser kaum oder gar nicht in MSC exprimiert zu sein schien.

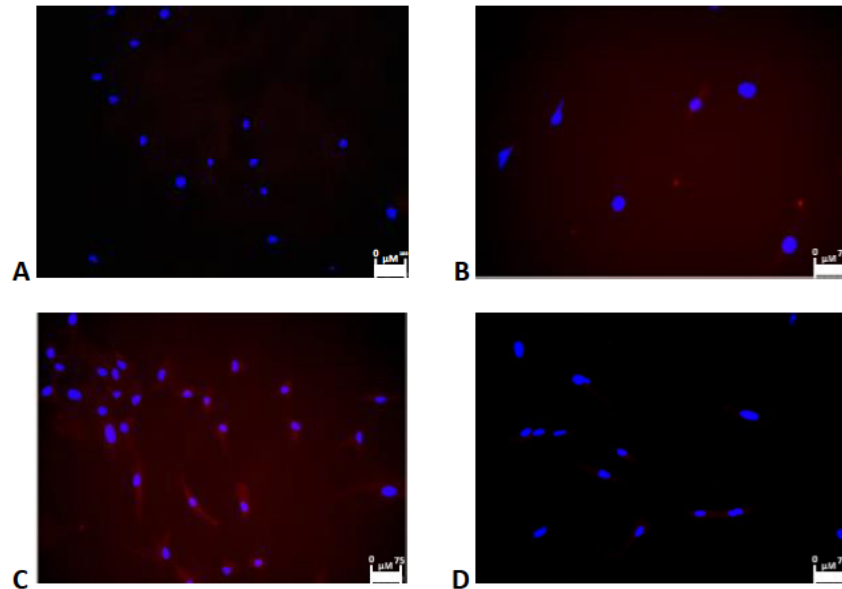


Abb. 15: MSC, Immunzytologie CXCR4. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. Bei den MSC in A, bei denen ebenfalls ein mit rotem Farbstoff gekoppelter sekundärer Antikörper (1:400) verwendet wurde, zeigte sich keine deutliche Anfärbbarkeit von CXCR4 im Vergleich zur Kontrolle in B mit 1% BSA, wobei gleiche Bedingungen herrschten. Auch bei Zugabe von Dexamethason zur Untersuchung dessen Einfluss konnte bei C (mit rotem Farbstoff gekoppeltem sekundärem Antikörper, 1:400) kein deutlicher Unterschied zur Kontrolle ohne primären Antikörper in D (BSA 1%, 1:400) festgestellt werden. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

Auch ein weiterer primärer Antikörper (*abcam*, *UMB2*) lieferte keine überzeugende Färbung, da sich kein signifikanter Unterschied gegenüber der Negativprobe zeigte.

In diesen Versuchen wurden INA-6 und MSC zusammengebracht, um deren gegenseitigen Einfluss auf CXCR4 auf Ebene der Rezeptor-Expression in Ko-Kultur nachzuvollziehen. Dabei zeigte sich vor allem eine sehr starke Bindung der INA-6 an die MSC.

Die zunächst noch mit dem mit rotem Farbstoff gekoppelten sekundär-AK durchgeführten Versuche brachten keine zufriedenstellenden Ergebnisse, wie auch schon bei den Versuchen mit MSC zuvor (Daten nicht gezeigt). Ein verändernder Einfluss von Dexamethason konnte im Vergleich zu den anderen Ansätzen nicht aufgezeigt werden.

Gut zu sehen war jedoch hier wie auch in den folgenden Versuchen die Anheftung der INA-6 an die MSC, sodass erstmals deren starke Bindung der Zellen in Ko-Kultur bildmorphologisch dargestellt werden konnte.

In anderen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte die enge Bindung zwischen MSC und Myelomzellen mittels holotomographischer Aufnahme (*Nanolive-Mikroskop*) genauer dargestellt werden.

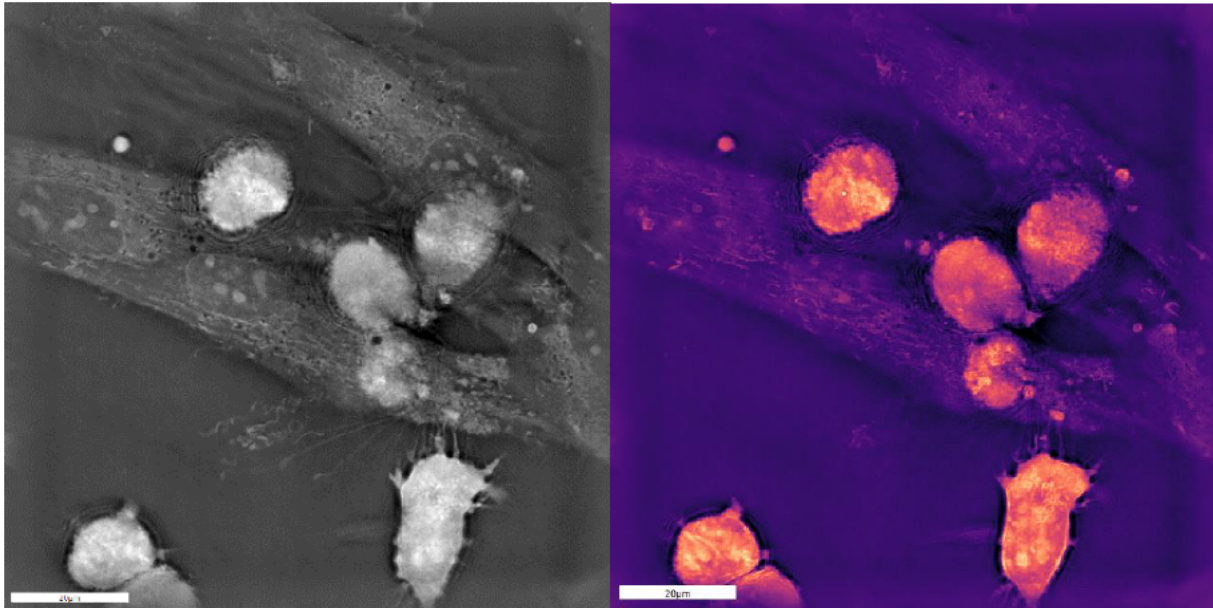


Abb. 16: **holotomographische Aufnahme MSC-MM-Interaktion**, schwarz-weiß und in Farbe. Gut zu erkennen sind die deutlich kleineren runden Myelomzellen (Plasmazellen), von denen mehrere auf einer deutlich größeren, strangförmigen MSC-Zelle anhaften.

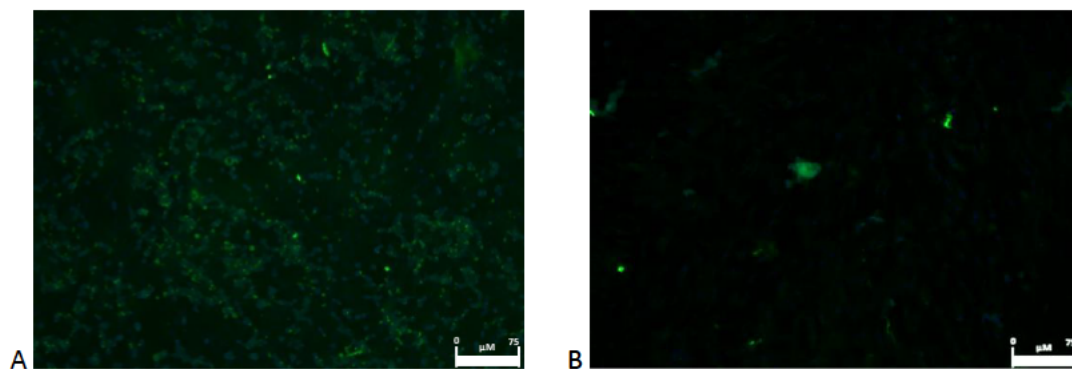


Abb. 17: **INA-6-MSC-Kokultur mit starkem Färbeunterschied. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.** Bei erneuter Durchführung der Ko-Kultur-Versuche mit einem neuen sekundären Antikörper mit gekoppeltem grünem Farbstoff konnte bei einer Verdünnung von 1:200 eine deutlich stärkere Anfärbbarkeit von CXCR4 in **A** im Vergleich zur Kontrolle mit 1% BSA in **B** unter gleichen Bedingungen festgestellt werden.

Insgesamt konnte durch das Aussäen der Zellen auf die Deckgläschen deutlich die Interaktion der INA6 und MSC aufgezeigt werden. Im Vergleich zu den MSC zeigten die INA6 eine oberflächliche Färbung sowohl mit rotem als auch mit grünem Farbstoff gekoppeltem sekundärem Antikörper, die sich gegenüber der der Negativkontrolle abhob. Auch in Ko-Kultur ließ sich die Oberfläche anfärben. Es zeigt sich jedoch oft eine starke Hintergrundfärbung, sodass die Spezifität der Färbungen in Frage gestellt werden muss. Damit konnte die Expression des CXCR4-Rezeptors und dessen Beeinflussung auf der Zelloberfläche nicht eindeutig dargestellt werden. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

III.1.3.2 Nachweis der CXCR4 Expression durch Verwendung des farbstoffmarkierten Liganden SDF1 α

Zur Spezifizierung der Ergebnisse und genaueren Darstellung des CXCR4-Rezeptors wurde deshalb im Anschluss das Verfahren noch einmal angepasst, sodass nun zur Darstellung des CXCR4 der farbstoffmarkierte Ligand SDF1 α eingesetzt und die Zellen damit behandelt wurden. Zunächst wurde die optimale Menge an markiertem Protein bestimmt, die für die Färbungen verwendet werden sollte: dabei zeigten sich die besten Ergebnisse bei einer 1 μ M-Lösung des Liganden.

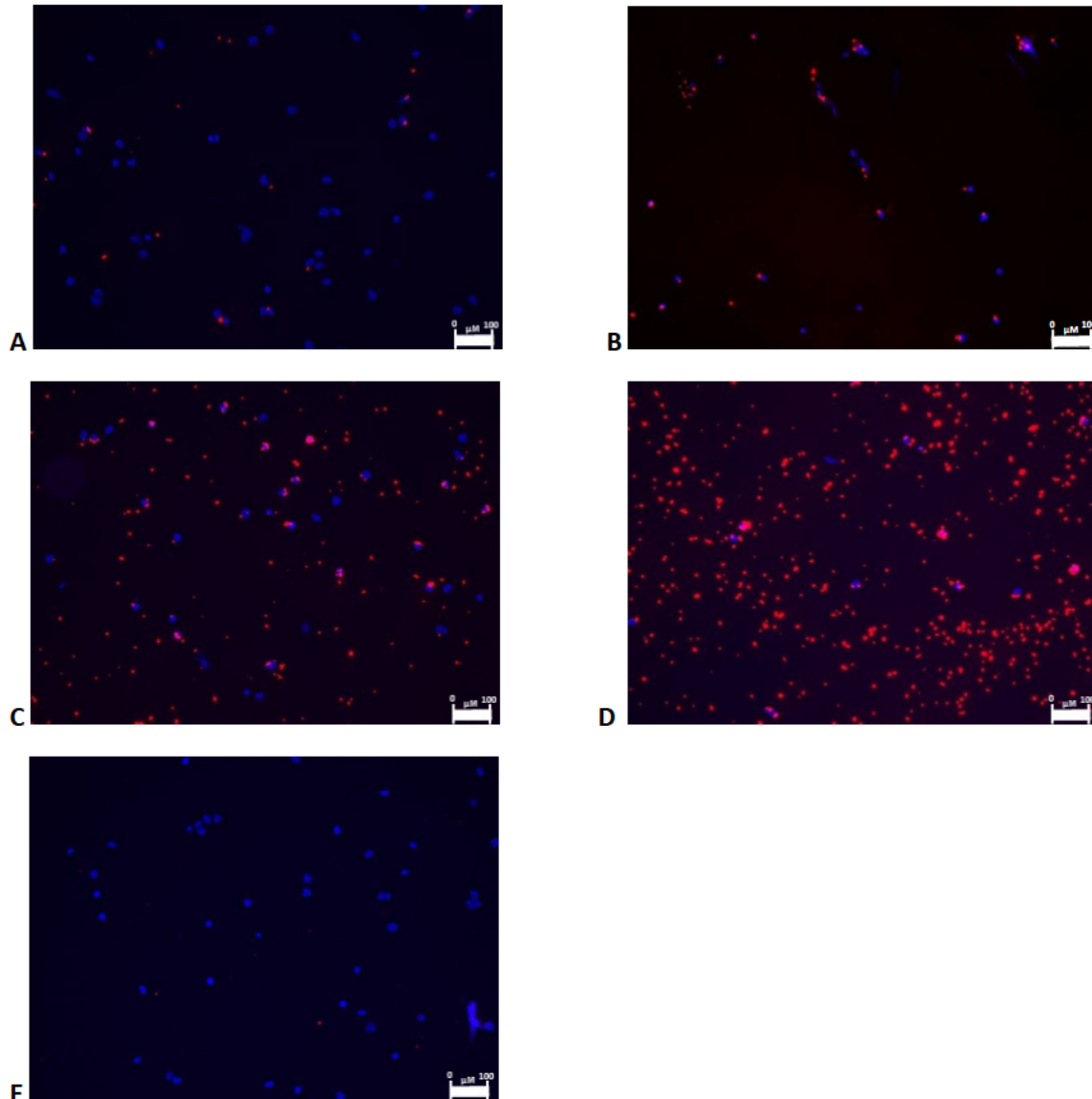


Abb. 18: INA-6, CXCR4-Markierung mit SDF1 α . Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. Durch Verwendung von SDF1 α (CXCL12) sollte indirekt der CXCR4-Rezeptor angefärbt werden, da die direkte Färbung keine konsistenten Ergebnisse lieferte. Dafür wurde SDF1 α mit gekoppeltem rotem Farbstoff in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet: **A** mit 0,1 μ M, **B** mit 1 μ M, **C** mit 2 μ M und **D** mit 4 μ M. Dabei zeigte sich eine positive Färbung bei allen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle in **E** mit 1% BSA, wobei die Stärke der Färbung mit steigender Konzentration zunahm, sich allerdings auch vermehrt Färbeartefakte bemerkbar machten, sodass weiterhin nicht die höchste Konzentration verwendet wurde. Es wurden fünf unabhängige Experimente durchgeführt.

Bei der SDF1 α -Färbung wurde zunächst die entsprechende Konzentration getestet, wobei sich bei einer höheren Konzentration des Farbstoffs auch eine höhere Verschmutzung im Sinne freier Farbstoffanteile und einer höheren Hintergrundfärbung zeigte. Die weiteren Ansätze wurden mit einer Konzentration von 1 μ M durchgeführt. Da sich oft auch Zellbruchstücke anfärbten, die eine natürlich Verteilung des Rezeptors auf der Zelloberfläche nicht rückschließen ließ, wurde zwischendurch das Verfahren geändert: zuerst wurden die Zellen nun per Zytospin auf den

Objektträger aufgebracht, und nicht erst, nachdem diese angefärbt wurden. Dadurch konnte die Färbung schonender vollzogen, ein mögliches Abscheren des Farbstoffes so weitestgehend verhindert werden. Auch das Schütteln während der Inkubation des Farbstoffs wurde weggelassen, sodass eine möglichst schonende Inkubation an den Rezeptor erfolgen konnte.

Bei Versuchen mit MM1S und SDF1 α in einer Konzentration von 1 μ M zeigte sich keine deutliche Färbung von CXCR4 im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Weitere Färbeversuche wurden nicht unternommen.

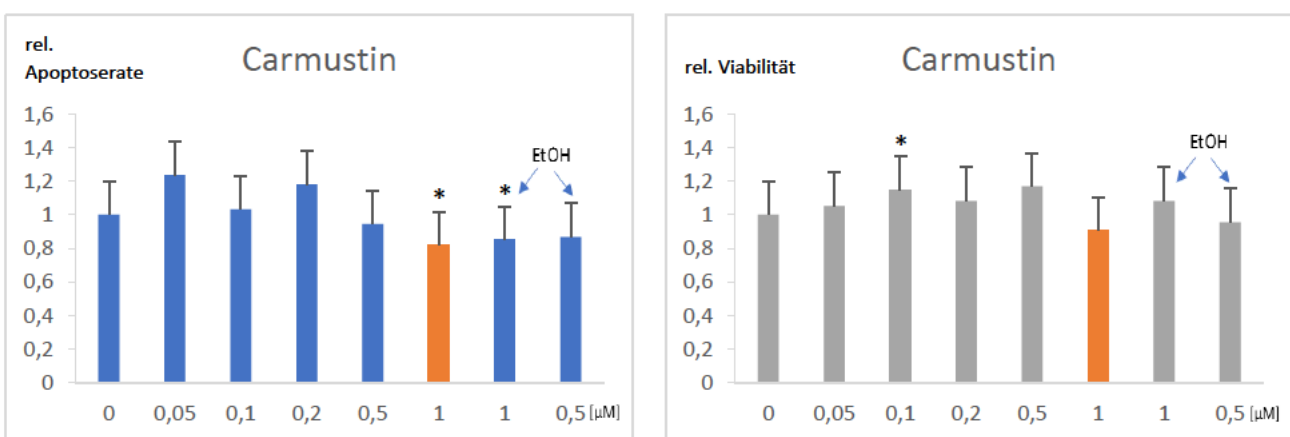
III.2 In-Vitro Chemotherapie mit dexamethason-BeAM

Zur Dosisfindung der für die weiteren Stimulationsversuche verwendeten Chemotherapeutika, angelehnt an das dexamethason-BeAM-Schema, wurden hier die INA-6 und MM1S bzgl. Apoptose- und Viabilitätsverhalten zunächst getestet und die bestmögliche Konzentration ermittelt.

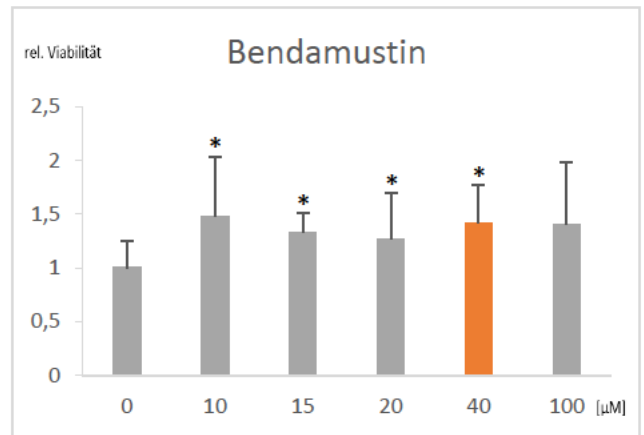
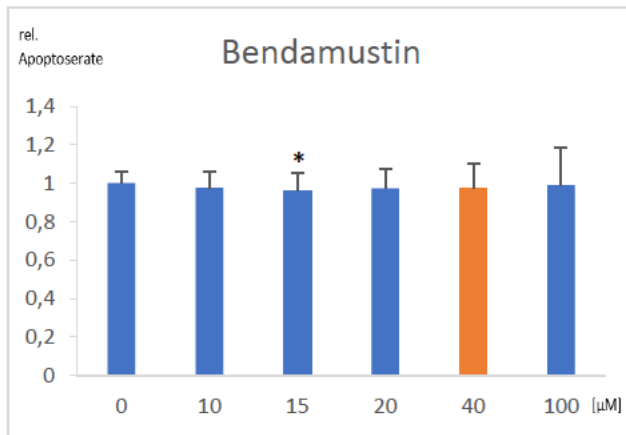
Im Gesamtergebnis wurden die zuvor in den einzelnen Viabilitäts- und Apoptosemessungen bestimmten Ergebnisse zusammengefasst. Die Werte jeder Durchführung wurden dabei auf den Kontrollwert (=1) bezogen. Von allen Werten gemeinsam wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Zur Beurteilung der Signifikanz wurde jeweils ein t-Test durchgeführt mit dem Signifikanzniveau kleiner 0,05. Signifikante Ergebnisse wurden zur besseren Erkennbarkeit mit einem Sternchen (*) versehen. Aus den zuvor in den einzelnen Versuchen gewonnenen Apoptose- und Proliferationswerten wurden der Übersicht halber Diagramme mit allen getesteten Konzentrationen eines Medikaments hergestellt. Der Fokus lag dabei in erster Linie auf der gemessenen Viabilität, da ja Konzentrationen ausgemacht werden sollten, bei denen die Zellen nicht übermäßig abstarben, sondern bei denen lediglich die CXCR4-Aktivität verringert werden sollte, wie es auch in der klinischen Anwendung beobachtet wurde.

Apoptose- und Viabilitätsmessungen in INA-6 Zellen

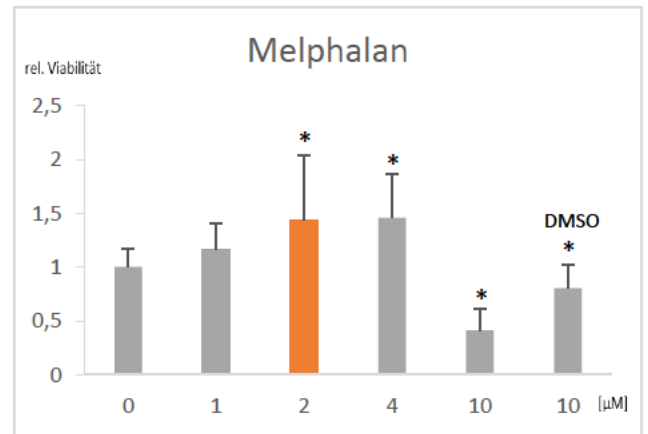
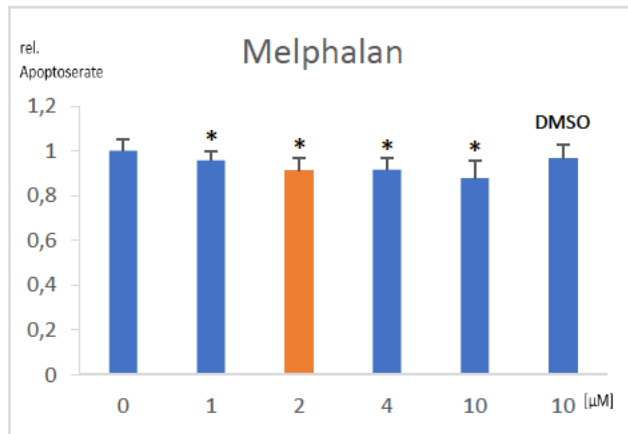
A



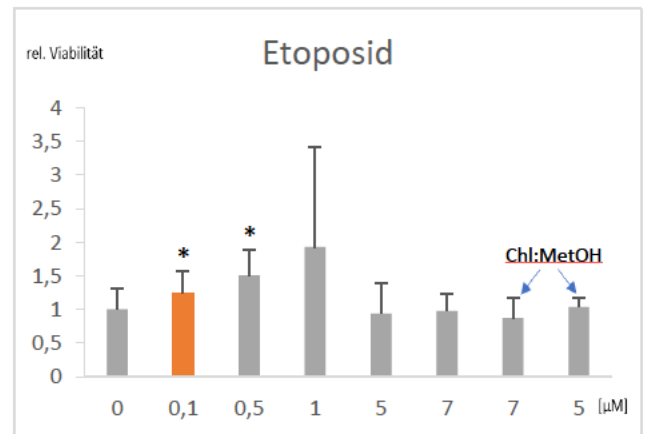
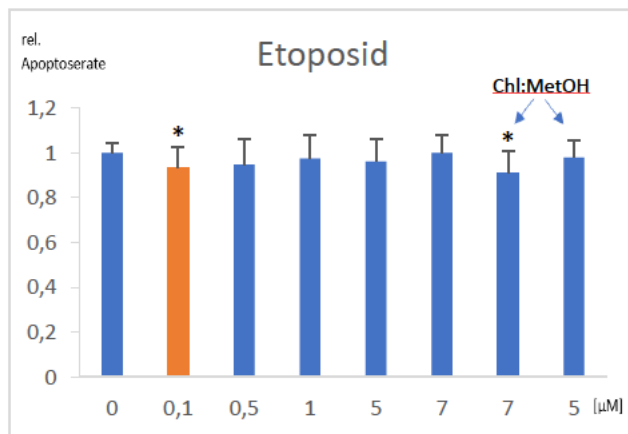
B



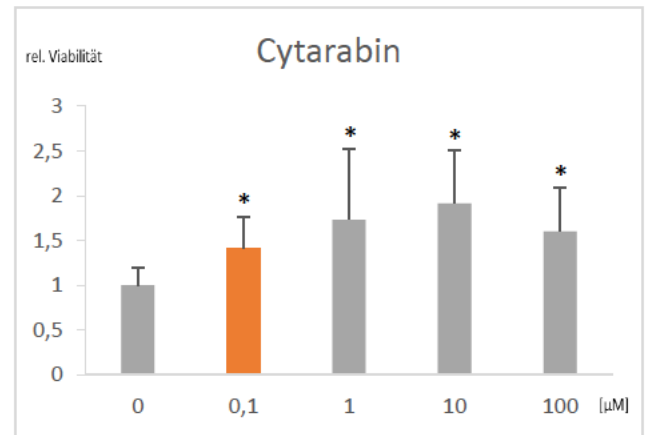
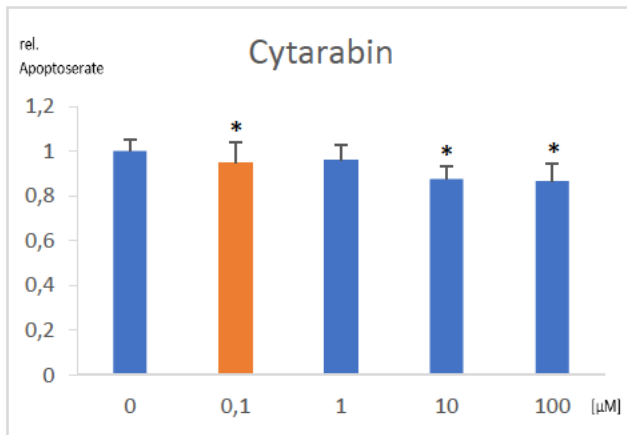
C



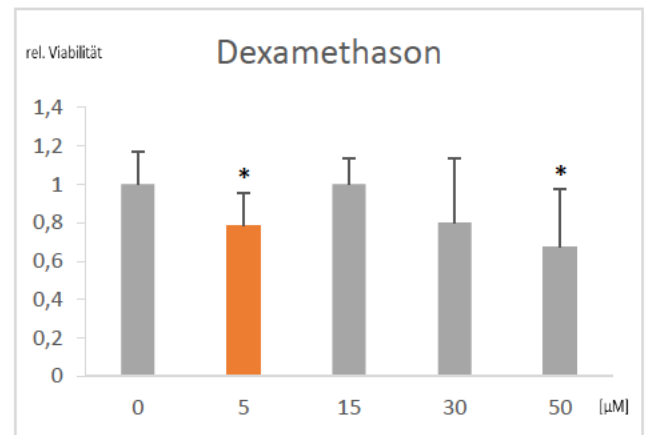
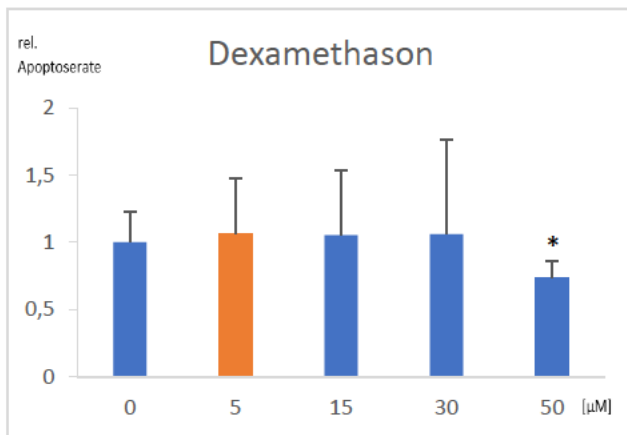
D



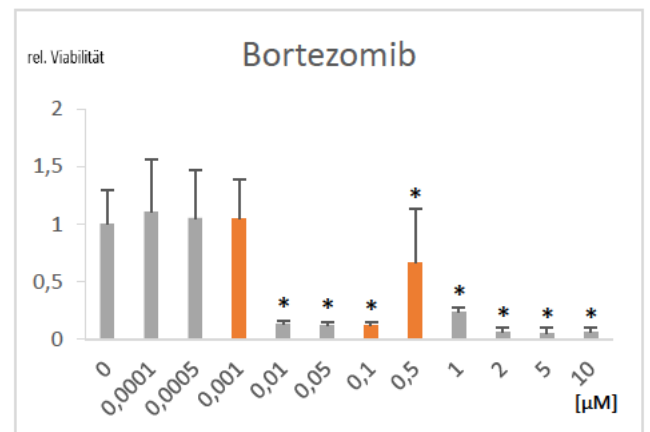
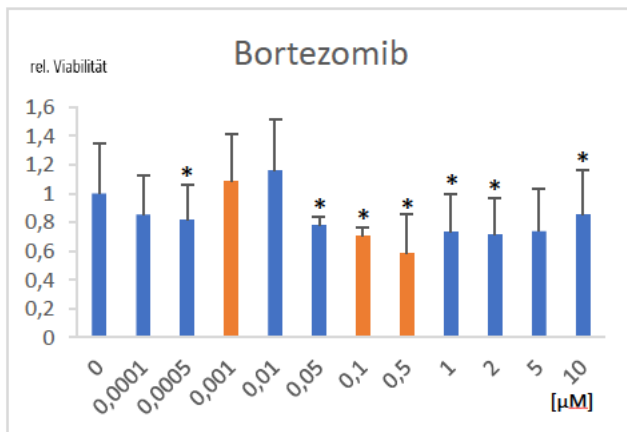
E



F



G



* signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 19: INA6, Viabilitäts- und Apoptosemessungen **A:** Carmustin, **B:** Bendamustin, **C:** Melphalan, **D:** Etoposid, **E:** Cytarabin, **F:** Dexamethason, **G:** Bortezomib. Gezeigt sind die konzentrationsabhängigen Auswirkungen verschiedener Chemotherapeutika auf die Apoptoserate und Viabilität von INA-6 bezogen auf eine jeweils unbehandelte Kontrollgruppe (=1). Signifikante Ergebnisse wurden dabei mit Sternchen (*) markiert. Ziel war es, möglichst geeignete Konzentrationen für die weiteren Versuche zu ermitteln. Die für die Versuche ausgewählten Konzentrationen sind dabei in den oben gezeigten Diagrammen orange markiert. (* $p < 0,05$, student's t-Test, Standardabweichung gezeigt). EtOH= Ethanol, MetOH= Methanol, Chl= Chlor, DMSO= Dimethylsulfoxid.

Die Bestimmung einer geeigneten Konzentration jedes Chemotherapeutikums stellte sich bei INA-6 als schwierig heraus, da die Zellen je nach Versuch sehr unterschiedlich auf die Konzentrationen reagierten.

Das Auswahlprinzip stellte sich wie folgt dar: hatte ein Chemotherapeutikum eine starke Wirkung im Sinne einer Verringerung der Proliferationsrate, wurde diejenige gewählt, die die Proliferationsrate auf ca. 80% des Ausgangswertes verringerte. Hatte ein Wirkstoff keine signifikante Wirkung, weder auf Proliferation noch Apoptose, wurde die höchste getestete Konzentration gewählt. Zeigte sich eine Reaktion lediglich im Sinne eines Anstiegs der Apoptose, wählten wir jene, die einen ca. 20%igen Anstieg verursachte, damit eine anschließend ggf. beobachtete verringerte Rezeptoraktivität nicht auf einen Mangel an Zellen zurückgeführt werden konnte.

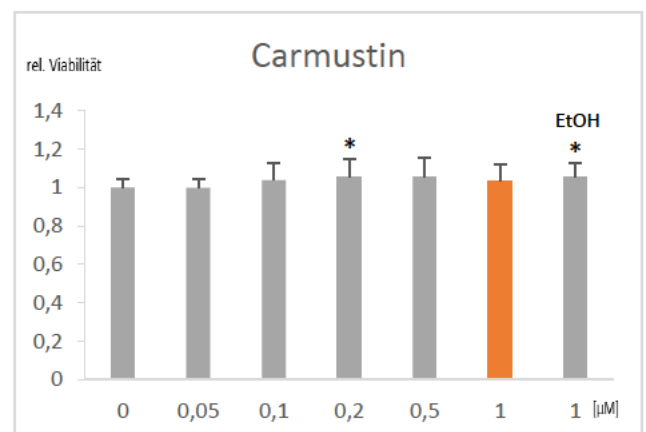
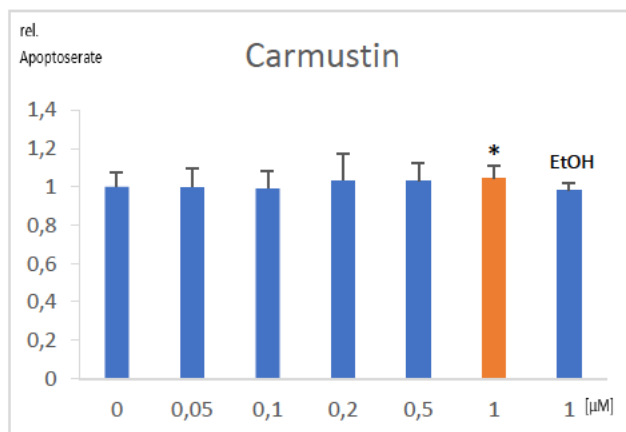
Ggf. wurden bei einigen Wirkstoffen im Nachhinein noch Zwischenmessungen durchgeführt, um den jeweils beobachteten Effekt noch weiter einzugrenzen bzw. ein Annähern an die geeignete Konzentration zu ermöglichen.

Die vielversprechendsten Effekte zeigten dabei **Melphalan, Dexamethason und Bortezomib**. Bei anderen Wirkstoffen wurden unter den verwendeten Konzentrationen auch inverse Effekte im Sinne einer Zunahme der Proliferationsrate bei zunehmender Konzentration beobachtet, so z.B. bei Bendamustin und Cytarabin.

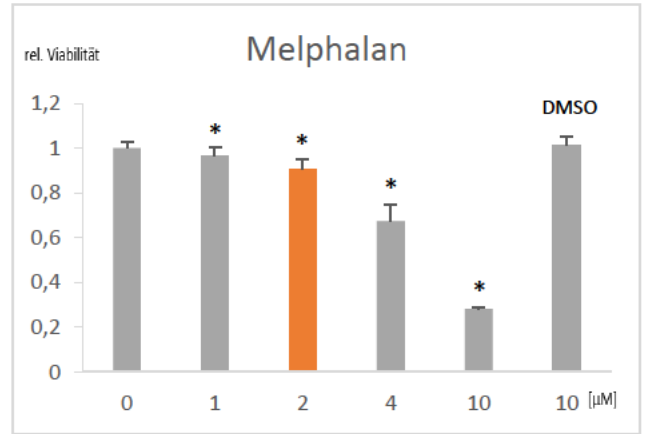
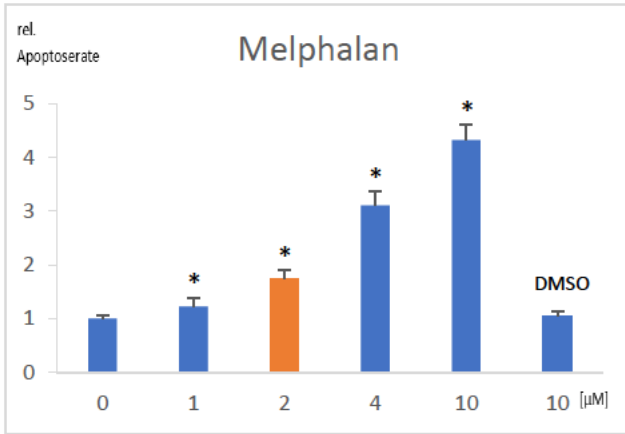
Z.T. stellte sich erst im Nachhinein eine nachbestimmte Konzentration als besser geeignet heraus, was für weitere Versuche noch relevant sein könnte, in diesem Fall aber eventuell nicht mehr berücksichtigt werden konnte.

Apoptose- und Viabilitätsmessungen in MM1S-Zellen

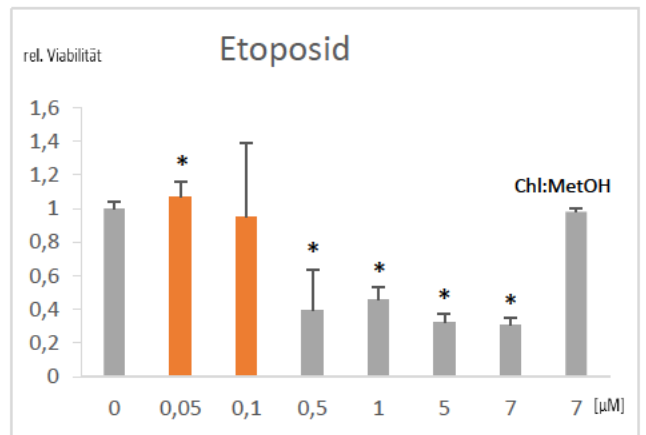
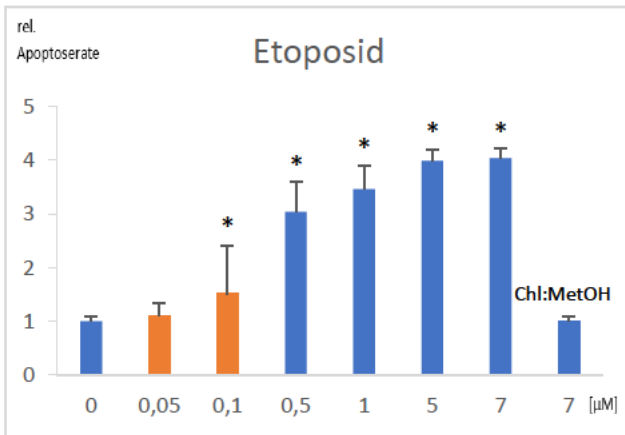
A



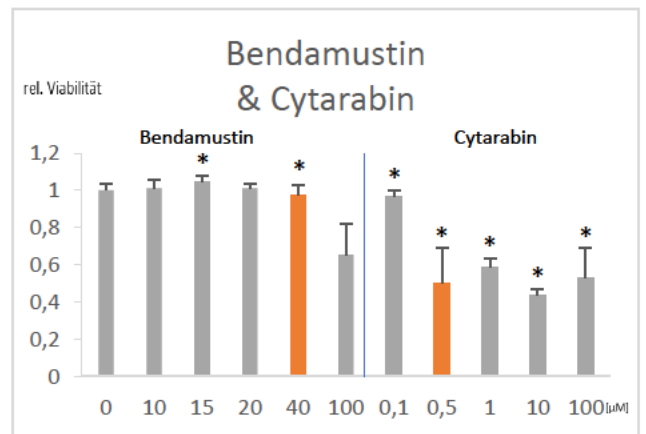
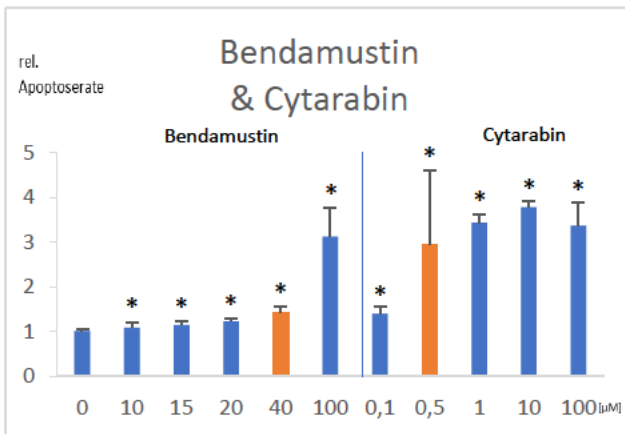
B



C



D



E

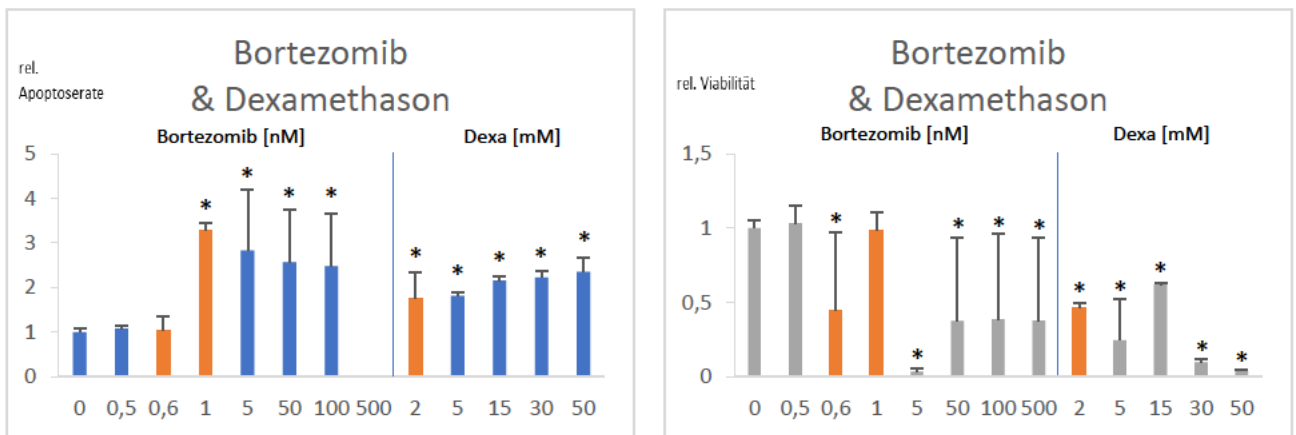
*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 20: **MM1S, Apoptose- und Proliferationsmessung**, **A:** Carmustin, **B:** Melphalan, **C:** Etoposid, **D:** Bendamustin & Cytarabin, **E:** Bortezomib & Dexamethason (Dexa). Gezeigt sind die konzentrationsabhängigen Auswirkungen verschiedener Chemotherapeutika auf die Apoptoserate und Viabilität von MM1S bezogen auf eine jeweils unbehandelte Kontrollgruppe (=1). Signifikante Ergebnisse wurden dabei mit (*) markiert. Ziel war es, möglichst geeignete Konzentrationen für die weiteren Versuche zu ermitteln. Die für die Versuche ausgewählten Konzentrationen sind dabei in den oben gezeigten Diagrammen orange markiert (*: $p < 0,05$, student's t-Test, Standardabweichung gezeigt). EtOH= Ethanol, MetOH= Methanol, Chl= Chlor, DMSO= Dimethylsulfoxid.

Auch bei den MM1S war es z.T. schwierig, eine geeignete Konzentration auszumachen. Die Orientierung entsprach den gleichen Prinzipien wie auch bei den INA6. Die Zellen reagierten je nach Versuchsansatz sehr variabel, trotz gleicher Bedingungen und gleicher Konzentrationen. Näherungsweise galt eine Absenkung der Proliferationsrate auf 80% des Ausgangswertes als primäres Ziel. Nachfolgend wurde berücksichtigt, ob eine der verwendeten Konzentrationen überhaupt einen Effekt hatte bzw. dass es eine Konzentration war, die zu einem übermäßigen Anstieg der Apoptoserate führte. Auch hier wurden geeignete Konzentrationen z.T. erst im Nachhinein nachgemessen, was aber nicht immer berücksichtigt werden konnte.

Die potentesten Effekte zeigten dabei Melphalan, Etoposid, Cytarabin, Bortezomib und Dexamethason.

III.3 Charakterisierung des CXCR4 Promotors

III.3.1 *In silico* Promotoranalyse mittels Genomatix MatInspector

Die Idee dieser Promotoranalyse war es, mögliche Transkriptionsfaktor-Bindestellen des CXCR4-Promotors ausfindig zu machen, um auf potenzielle Angriffspunkte der untersuchten Chemotherapeutika rückschließen zu können und Interaktionen mit diesen besser verstehen und interpretieren zu können.

Der vorliegende Promotorabschnitt von CXCR4 wurde dafür in das Genomatix MatInspector-Programm eingespeist. Das Programm gab anschließend eine automatisierte Auswertung aller in

Frage kommenden Bindestellen heraus, wobei sich auf eine gewisse Auswahl konzentriert wurde, die im Folgenden zu sehen ist, und auf die in der Diskussion genauer eingegangen werden soll:

Motiv	Element	Position vom ATG (bp)		Strang	Homologie	Stimulanz	Sequenz
AP-1	Transcription factor JunB	-418	-430	(+)	0,916	PMA	gggtaa GTCA tgc
LEF1/TCF	HMG box transcription factor	-489	-505	(-)	0,898	Wnt3a	tctat atCAAA aga gga
SMAD3	Vertebrate SMAD family of transcription factors	-528	-538	(+)	0,994	TGF β	gca GTCT gggc
NF κ B	Nuclear factor kappa B/c-rel	-532	-546	(-)	0,943	H ₂ O ₂ , TNF α	ga GGAttg ccca ga
GRE	Glucocorticoid responsive and related element	-1013	-1031	(-)	0,939	Dexamethason	gtgccacgcac TGT Tctag
STAT	Signal transducer and activator of transcription	-1638	-1656	(-)	0,905	IL-6	aag ttgagGGAA gcggga
CREB	cAMP-responsive element binding protein	-1910	-1930	(+)	0,893	Forskolin	gtagcaaag TGAC gccgaggg

Abb. 21: **Übersicht relevanter CXCR4-Promotor-Transkriptionsfaktor-Bindestellen.** Zu sehen sind hier für die Versuche relevante Abschnitte, deren Position, Strangausrichtung, Homologie, das zugehörige Stimulanz und die Darstellung der genauen Sequenz des Abschnitts. Ziel war es, für die Wirkung der untersuchten Stimulanzen mögliche pathophysiologische Bindestellen auf Ebene des Promotors zu identifizieren und so deren Wirkungen nachvollziehen zu können.

III.3.2 Klonierung des Promotors mittels pGL4.14

Nach Einschleusen des CXCR4-Promotorabschnitts in das pGL4.14-Plasmid wurde der Erfolg mittels Probenverdau überprüft (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte das Erscheinen einer zweiten Bande in der Gelelektrophorese das Vorhandensein des CXCR4-Abschnitts an. Der Verdau erfolgte mit den Restriktionsenzymen **XhoI** und **KpnI**. Das Plasmid positiver Klone wurde an das Biozentrum der Universität Würzburg gesandt, die dieses sequenzierte und den positiven Einbau des CXCR4-Promotors bestätigte.

III.3.3 Hygromycin-Verträglichkeitstest

Zur Abschätzung einer späteren Herstellung stabiler Zellen wurden in diesem Ansatz sowohl INA-6 als auch MM1S mit Hygromycin behandelt, um die zelltoxischen und Wachstums-hemmenden Einflüsse auf die verschiedenen Zelltypen zu untersuchen. Bei **INA-6** stellte sich die Konzentration von **8 μ l/ml** als diejenige mit einem Wendepunkt bzgl. der Beeinflussung des Zellwachstums heraus. Denn mittelfristig (nach ca. 2 Wochen) erfolgte bei der Verwendung einer niedrigeren Konzentration eine zu geringe Hemmung der Proliferation, bei Konzentrationen darüber zeigte sich eine beinahe vollständige Hemmung, auch wenn in allen Ansätzen noch vereinzelt Zellen übrigblieben. Auch bei 8 μ l/ml wurden nicht alle Zellen abgetötet, sodass mögliche resistente Zellen weiterhin einen Selektionsvorteil genießen konnten. Bei **MM1S**-Zellen zeigte sich bereits bei einer Konzentration von **4 μ l/ml** mittelfristig nach etwa zwei Wochen eine wesentliche Reduktion der Zellzahl, optisch schätzungsweise quantifiziert mit dem Lichtmikroskop (LM). Auch hierbei wurden nicht alle Zellen abgetötet; einige Zellen verblieben, aus denen nach erfolgreicher Transfektion stabile Zellen

hervorgehen sollten. Konzentrationen darüber führten zu einem (fast) kompletten Absterben der Zellen ohne Selektion resistenter Zellen.

III.3.4 Transfektion der Myelomzellen INA-6 und MM1S

Nach per Elektroporation erfolgter Transfektion der INA6-Zellen wurde der Erfolg der Transfektion durch Messung der Luciferase-Aktivität bestimmt. Diese zeigte durch Zunahme der Luciferase-Aktivität das erfolgreiche Einschleusen des Plasmids, auf dem sich der entsprechende Luciferase-Genabschnitt befand. Es wurden sowohl zirkuläre als auch linearisierte Plasmide eingesetzt. Letztere dienten dazu, stabile Zellen zu generieren.

Zunächst erfolgten dafür Pilotversuche mit einfacher Durchführung, die zunächst ein erfolgreiches Einschleusen des Konstrukts nachweisen sollten.

Im Vergleich zur Grundaktivität, gemessen an der Einschleusung eines pGL4.14 Vektors ohne ligierten CXCR4-Promotor, zeigte die Einschleusung des mit CXCR4-Promotor versehenen Plasmids eine deutlich höhere Luciferase-Aktivität, die ca. um den Faktor 10 höher war. Dabei wurde bei der Einschleusung der stabilen DNA, also des durch Sal-Verdau hergestellten linearen Plasmid-Strangs, eine nochmals erhöhte CXCR4-Aktivität gemessen, verglichen mit der instabilen, zirkulär belassenen Form des Plasmids.

Die Aktivität war dabei am höchsten, je früher man diese nach Transfektion maß. Denn selbst das Einfrieren bei -20°C konnte nicht verhindern, dass zu einem späteren Zeitpunkt gemessen, die gleiche Probe eine geringere Aktivität aufwies. Auch zeigte sich im zeitlichen Verlauf der Zellkultur, dass die Zellen mit der Zeit an Luciferase-Aktivität verloren, vermutlich, da die eingeschleuste DNA wieder ausgeschleust oder abgebaut wurde.

Ebenso wurde die Proteinkonzentration in jedem Ansatz als indirektes Maß für die enthaltene Zellmenge bestimmt, wobei als Referenz eine Reihe standardisierter BSA-Konzentrationen gewählt wurden.

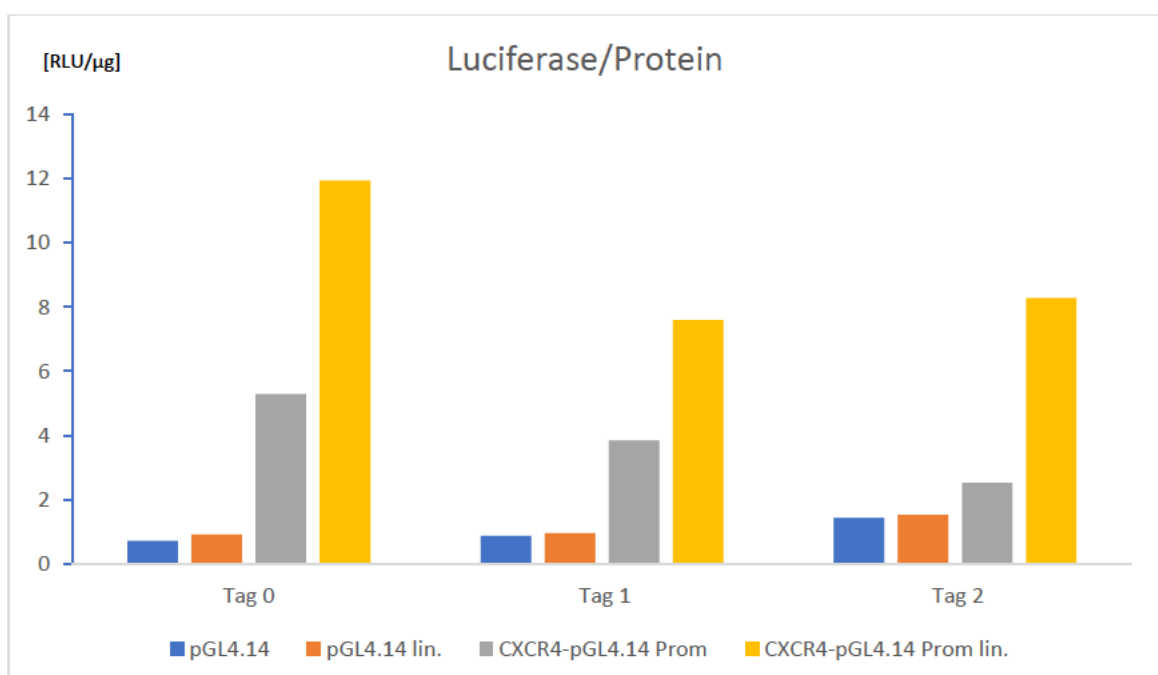


Abb. 22: **CXCR4 Promotoraktivität in INA-6-Zellen. Gezeigt ist die Luciferase/Protein-Ratio.** Bezogen auf das im Ansatz enthaltene Protein und damit indirekt die Zellzahl zeigte sich auch hier eine deutlich höhere relative Aktivität der INA-6 mit CXCR4-pGL4.14 Promotors und noch höher vom stabileren linearisierten CXCR4-pGL4.14 Promotor im Vergleich zur alleinigen Aktivität von pGL4.14. Der zirkuläre CXCR4-pGL4.14 Promotor zeigte dabei tendenziell über die Zeit eine deutliche Abnahme der Aktivität, die beim linearisierten Plasmid geringer ausfiel (einmalige Durchführung). pGL4.14= Plasmid, welches GPPS und LimS für die Produktion von GPP and (S)-limonene in *Escherichia coli* exprimiert.

Bezogen auf die in den Ansätzen indirekt bestimmte Zellmenge sah man auch hier eine Zunahme der relativen Luciferase-Aktivität und damit ein Zeichen für die erfolgreiche Transfektion der Zellen mit den zu untersuchenden Konstrukten. Die Luciferase-Aktivität war dabei bei den Ansätzen mit CXCR4-pGL4.14 ebenfalls ca. um den Faktor 10 höher, wobei die Transfektion und die Beibehaltung der Luciferase-Aktivität vor allem mit der linearisierten Form gelang. Im Zeitverlauf konnte auch hier eine Abnahme der Luciferase-Aktivität beobachtet werden.

Folgend war die Selektion der Zellen mit Hygromycin zur Herstellung stabiler transfizierter Zellen bzw. die Durchführung der Stimulationsversuche zeitabhängig, da eine Abnahme der Luciferase-Aktivität im Verlauf beobachtet werden konnte.

Auch bei den MM1S wurde vor möglichen Stimulationsversuchen der Erfolg der Transfektion durch Elektroporation über die Luciferase-Aktivität gemessen. Dabei zeigte sich zumindest initial eine erfolgreiche Transfektion durch eine um eine 10fach erhöhte Aktivität. Im Verlauf von wenigen Tagen kam es auch hier zu einem deutlichen Verlust der Luciferase-Aktivität, wobei lediglich die stabilen Ansätze weiterhin eine konstante, wenn auch nicht stark erhöhte Aktivität aufwiesen. Die Aktivität der zirkulär belassenen Plasmid-DNA mit dem darin enthaltenen Promotor unterschied sich mit der Zeit nicht wesentlich von der Basalaktivität mit pGL4.14.

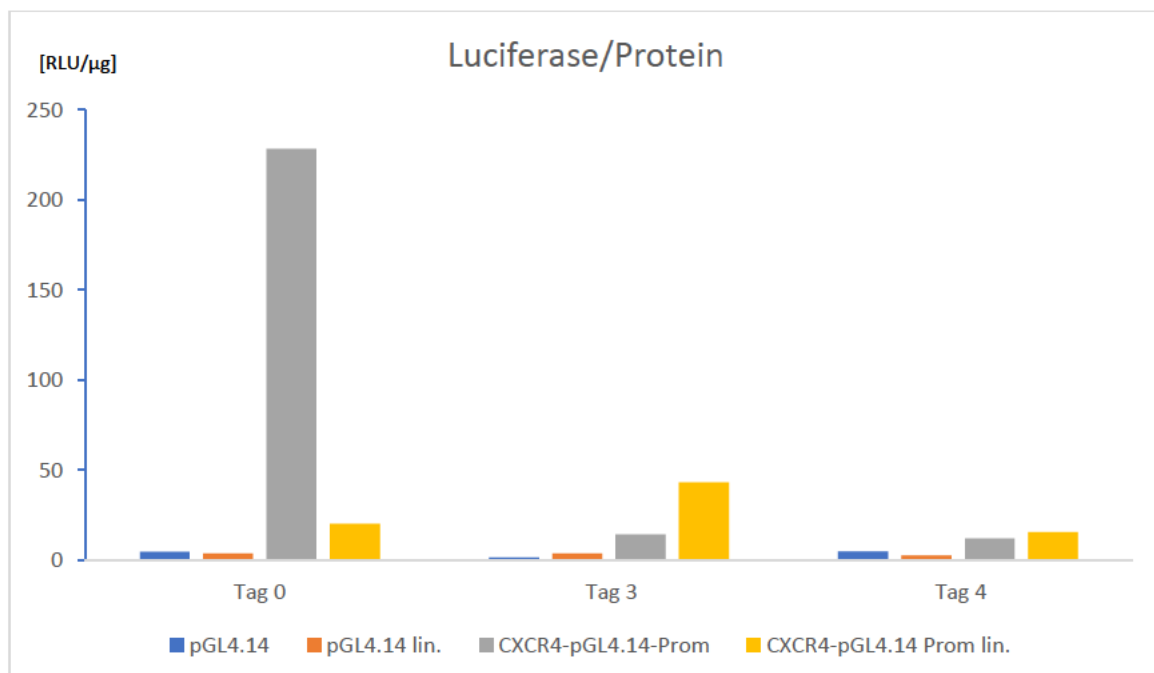


Abb. 23: **CXCR4 Promotoraktivität in MM1S-Zellen. Gezeigt ist die Luciferase/Protein-Ratio.** Grafische Darstellung der Luciferase-Aktivität im Verhältnis zur enthaltenen Protein- und damit indirekt zur Zellmenge. Zunächst deutlich erhöhte Aktivität mit dem CXCR4-pGL4.14 Promotor, welches deutlich über dem der linearisierten Form lag. Im zeitlichen Verlauf

deutliche Abnahme der Aktivität, welche aber noch über dem Niveau des reinen pGL4.14-Vektors lag (einmalige Durchführung)

Initial zeigte sich im Vergleich zur Grundaktivität auch hier eine erhöhte Luciferase-Aktivität bei den transfizierten Versuchsansätzen. Bezogen auf die Proteinmenge war hier zunächst vor allem die stabile Transfektion von CXCR4-pGL4.14 erfolgreich. Im Verlauf kam es auch hier zu einer deutlichen Abnahme der Luciferase-Aktivität, wobei die stabilen Ansätze weiterhin niedrige, aber stabile und um den Faktor 10 erhöhte Luciferase-Aktivität vorwiesen, wobei die Aktivität der transient transfizierten Zellen zwar initial höher war, aber im Verlauf stärker abnahm und längerfristig der der stabilen Zellen unterlegen war.

Die Transfektion konnte somit als teilweise erfolgreich angesehen werden: zwar konnten die transfizierten Ansätze einen Transfektionserfolg vorweisen, allerdings war deren Aktivität nicht stark erhöht.

III.3.4.1 Herstellung stabiler transfizierter INA-6 und MM1S-Zellen

Durch Behandlung mittels Hygromycin sollten die erfolgreich transfizierten und damit mit der entsprechenden Resistenz ausgestatteten Zellen selektiert und kultiviert werden, wobei zunächst verschiedene Hygromycin-Konzentrationen getestet werden mussten (s.oben)

Bei den **INA-6**-Zellen konnte eine stark erhöhte Aktivität der Luciferase bezogen auf das darin enthaltene Protein festgestellt werden. Vor allem beim Ansatz des linearisierten eingeschleusten CXCR4 konnte man diesen Effekt konstant beobachten, sodass von einer erfolgreichen Transfektion und Herstellung stabiler, also gegenüber Hygromycin resistenter Zellen, ausgegangen werden konnte (s. oben Hygromycin-Ansätze).

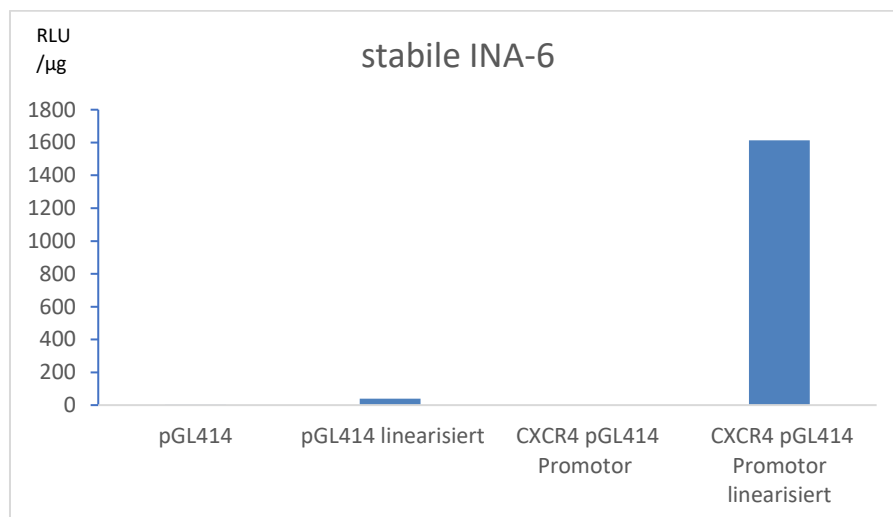


Abb. 24: **INA-6, Luciferase/Protein-Ratio als Maß der erfolgreichen Herstellung stabiler Zellen.** Bei den INA-6 konnte noch nach ca. 2 Wochen eine deutlich höhere Luciferase-Aktivität nach Einschleusen des linearisierten CXCR4-pGL4.14-Konstrukts nachgewiesen werden [RLU/µg]. (einmalige Durchführung)

Die MM1S-Zellen wiesen vorwiegend eine kantige Morphologie auf, sodass nicht von einer erfolgreichen stabilen Situation gegenüber Hygromycin ausgegangen werden konnte.

Langfristig stellte sich die stabile Transfektion der MM1S mit dem CXCR4-pGL4.14-Konstrukt als nicht erfolgreich heraus (Daten nicht gezeigt).

III.4 CXCR4 Promotoranalysen in Myelomzellen

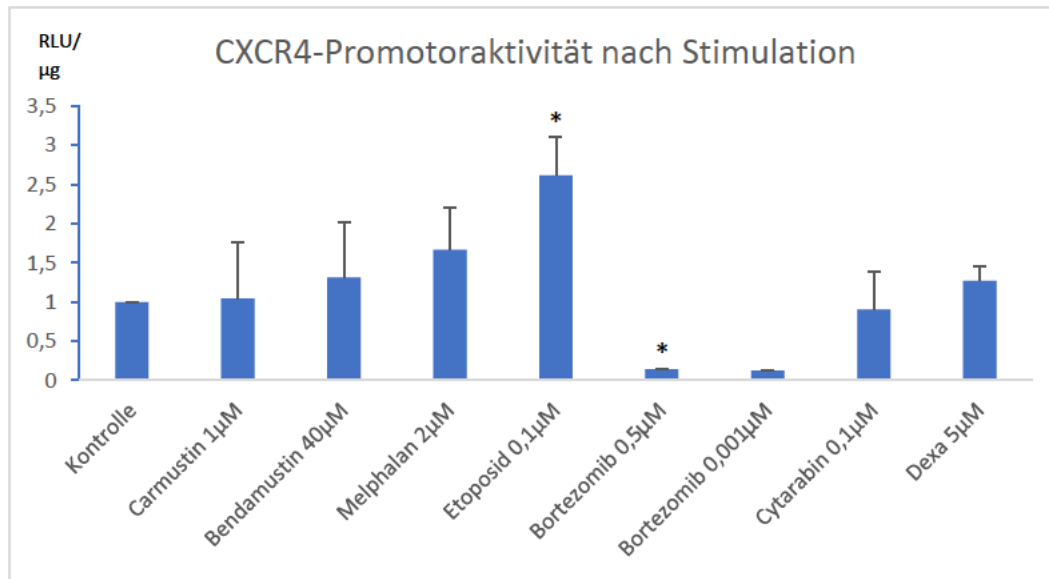
III.4.1 Transient transfizierte INA-6-Zellen

In diesem Teil der Arbeit wurden die zuvor gewonnenen Erkenntnisse vereint und angewandt: die in den Versuchen zur Viabilität und Apoptose bestimmten Konzentrationen der Chemotherapeutika, die eine Hemmung der Zellen bei nicht übermäßiger Steigerung der Apoptoserate bewirkten, wurden nun eingesetzt, um die durch Elektroporation mit dem CXCR4-pGL4.14-Promotorkonstrukt transfizierten Zellen zu stimulieren und anschließend den Einfluss der Chemotherapeutika auf dessen Aktivität zu bestimmen. Ziel war es, den Einfluss der Chemotherapeutika auf die Aktivität des CXCR4-Promotors zu ermitteln, sowohl auf Ebene der Promotoraktivität wie auch der RNA-Expression. Für die Stimulationsversuche wurden durchweg die an das *dexa-BEAM*-Schema angelegten Chemotherapeutika verwendet (wie oben beschrieben). In einem ersten Ansatz wurden zunächst verschiedene Mengen an zu transfizierenden Zellen und dem daraus möglicherweise resultierenden Einfluss der transfizierten Zellmenge auf die Stimulation und damit die Luciferase-Aktivität bestimmt. Es zeigte sich ein nahezu ähnliches Ergebnis in den Ansätzen mit 2×10^6 Zellen und 4×10^6 Zellen (Daten nicht gezeigt), sodass sich letztlich für die größere Zellmenge entschieden wurde.

Gesamtergebnis der INA-6-Zellen:

In den einzelnen Versuchen zur Stimulation der CXCR4 Promotor-Aktivität im Vergleich zur Basalaktivität des pGL4.14-Leervektors zeigte sich eine deutlich messbare Luciferase-Aktivität, sodass die Zellen als erfolgreich transfiziert angesehen werden konnten. Der Einfluss der Substanzen auf den Leervektor brachte stets niedrige Messwerte, die zu keinem Zeitpunkt signifikant waren, sodass diese Daten hier nicht gezeigt werden. Zwischen den einzelnen Durchführungen zeigten sich z.T. ein sehr variables Ansprechen der Zellen.

Langfristig war es ohnehin das Ziel, aufgrund der Störanfälligkeit transient transfizierter Zellen, die Stimulationsversuche mit stabilen Zellen durchzuführen, bei denen der Promotor nicht erst per Elektroporation eingeschleust werden musste.



*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 25: **INA-6, Stimulationsversuche pGL4.14-CXCR4-Promotorkonstrukt, Gesamtergebnis Luciferase/Protein-Ratio.** Nach Stimulation der INA-6 mit transfiziertem CXCR4-pGL4.14-Konstrukt mit den Chemotherapeutika in bestimmten Konzentrationen zeigten sich signifikante Ergebnisse bei Etoposid 0,1µM und Bortezomib 0,5nM (*). Beim pGL4.14-Konstrukt ohne CXCR4 konnten keine signifikanten Ergebnisse beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Vier unabhängige Experimente mit je 2 Messwerten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. *Dexa= Dexamethason*

Insgesamt zeigte sich ein signifikanter Einfluss lediglich bei **Etoposid** und **Bortezomib**. Etoposid führte dabei in einer Konzentration von 0,1 µM zu einer signifikanten Zunahme der CXCR4-Promotoraktivität, wobei sich Bortezomib als der Wirkstoff mit der potentesten Hemmung der CXCR4-Promotoraktivität zeigte.

III.4.2 Stabil transfizierte INA-6-Zellen:

Mit den zuvor mittels Hygromycin hergestellten resistenten und damit stabilen INA-6, die den CXCR4 in pGL4.14-Promotor besaßen, wurden ebenso wie mit den transient transfizierten Zellen Stimulationsversuche durchgeführt, wobei ein konsistenteres Ansprechen der Zellen erwartet wurde. Zunächst wurde dabei das Ansprechen der INA-6 auf die verschiedenen Lösungsmittel separat getestet, wobei sich kein signifikanter Unterschied sowohl der CXCR4-pGL4.14- wie auch der pGL4.14-Leervektor Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (kein Lösungsmittel) zeigte. Verwendet wurde dabei stets die größte Menge des Lösungsmittels.

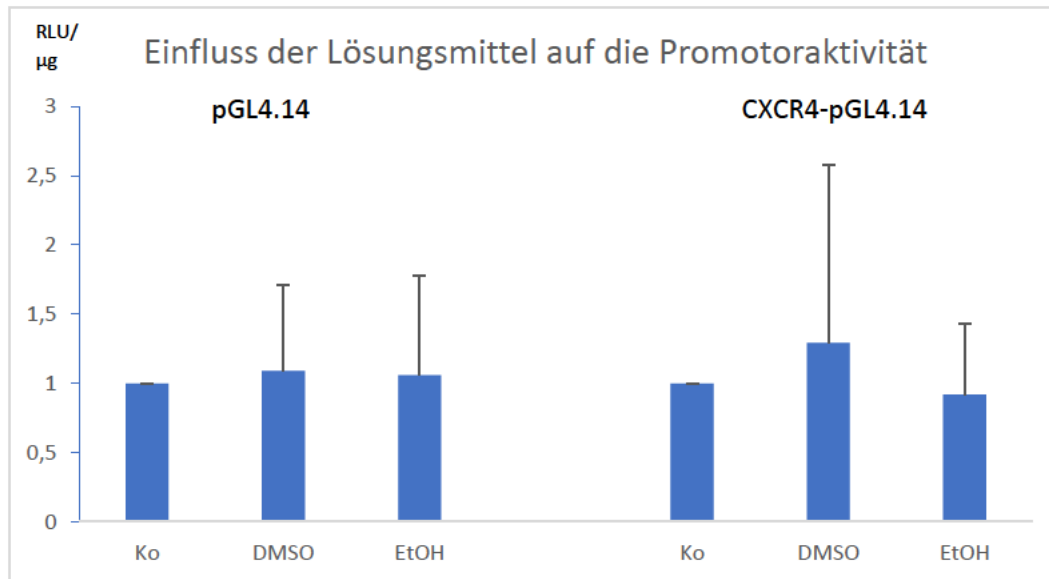
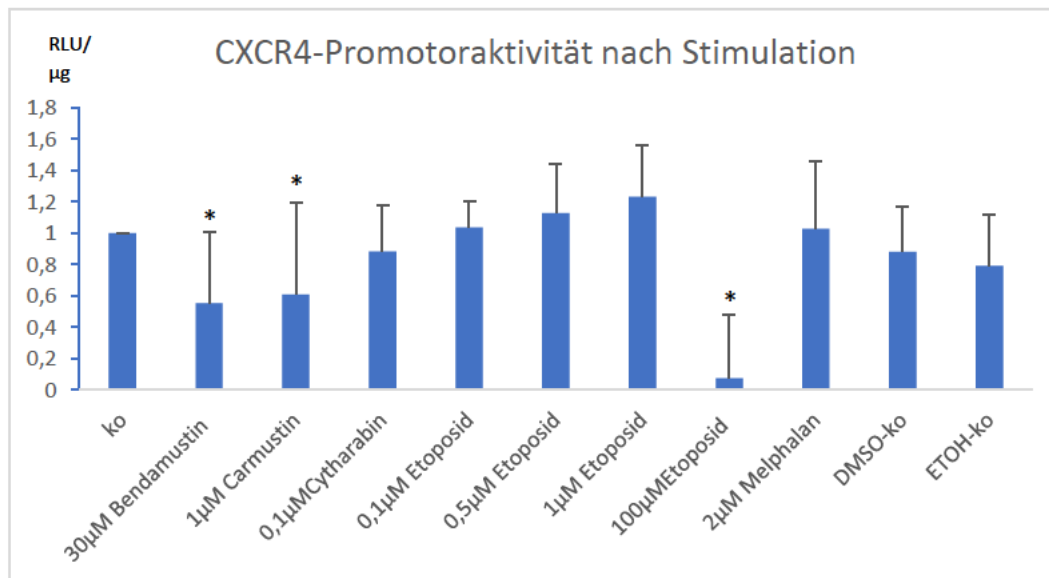


Abb. 26: **INA-6, Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Promotoraktivität [RLU/µg]**. Sowohl die INA-6 mit dem pGL4.14-Leervektor als auch die mit dem CXCR4-pGL4.14-Konstrukt wurden mit den verschiedenen Lösungsmitteln separat stimuliert, um deren isolierte Effekte zu beobachten: dabei zeigte sich weder bezogen auf die jeweilige Kontrolle noch zwischen den Ansätzen ein signifikantes Ergebnis. Zehn unabhängige Experimente mit je 4 Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. Ko= Kontrolle, DMSO= Dimethylsulfoxid, EtOH= Ethanol.

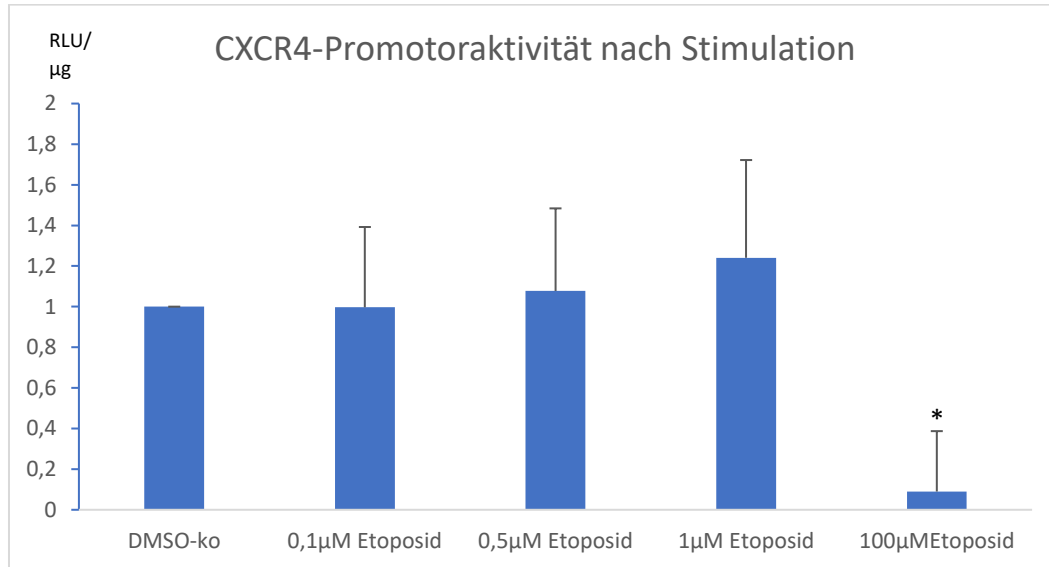
Angelehnt an die Versuche und vorläufigen Ergebnisse der transienten INA-6 zuvor, beschränkte sich die weitere Auswahl der Wirkstoffe und deren Dosierung auf diese, die einen Effekt auf die Promotoraktivität vermuten ließen. Dabei interessierte vor allem *Etoposid*, *Dexamethason* und *Bortezomib*.



* signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 27: **INA-6, Stimulationsversuche, Einfluss auf Promotoraktivität [RLU/µg]**. Untersucht wurde der Einfluss verschiedener Chemotherapeutika auf stabil transfizierte CXCR4-pGL4.14-INA-6 Zellen. Es zeigte sich eine deutliche Suppression der Luciferase mit 100µM Etoposid sowie eine verminderte Aktivität bei Bendamustin und Carmustin. Neun unabhängige Experimente mit je vier Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. Ko= Kontrolle, DMSO= Dimethylsulfoxid, EtOH= Ethanol.

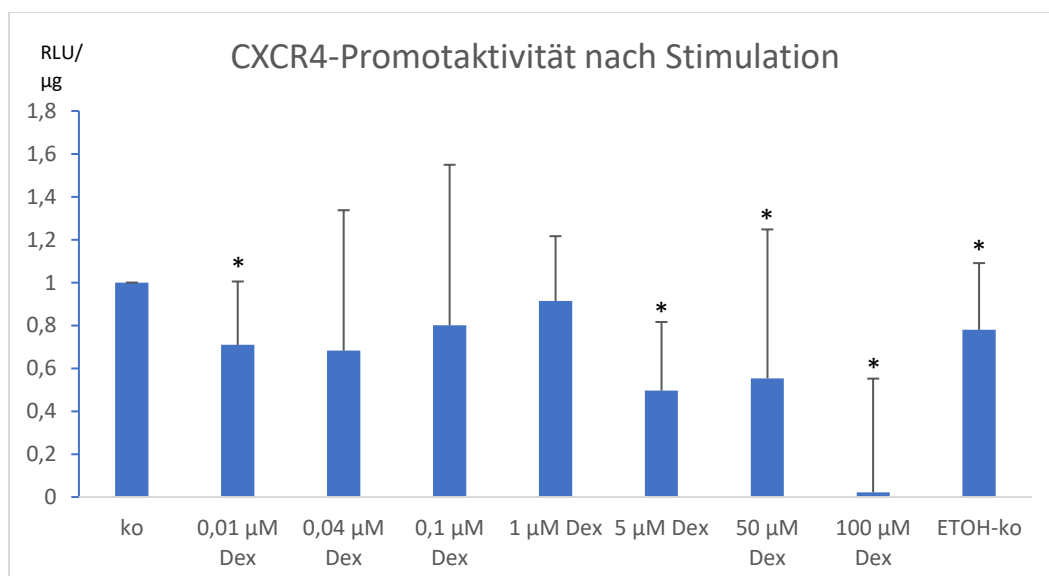
Es zeigte sich ein deutlicher hemmender Effekt von Etoposid auf die CXCR4-Aktivität bei einer Konzentration von 100 μ M, also in einer deutlich höheren (x1000) Konzentration als der zuvor bei den transient transfizierten INA-6 verwendeten (0,1 μ M), die dort sogar zu einer signifikanten Zunahme der Aktivität geführt hatte. Die Aktivität von pGL4.14 blieb hier im Vergleich unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt).



*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 28: **INA-6, Stimulationsversuche mit Etoposid, Einfluss auf Promotoraktivität [RLU/ μ g]**. Zur differenzierten Untersuchung der Auswirkung von Etoposid auf das CXCR4-pGL4.14-Konstrukt wurde Etoposid im Anschluss in verschiedenen Konzentrationen getestet, wobei sich eine deutliche Suppression der Luciferase-Aktivität bei 100 μ M zeigte. Mind. vier unabhängige Experimente mit je zwei Messpunkten, student's t-test. Standardabweichung gezeigt. DMSO= Dimethylsulfoxid, Ko= Kontrolle.

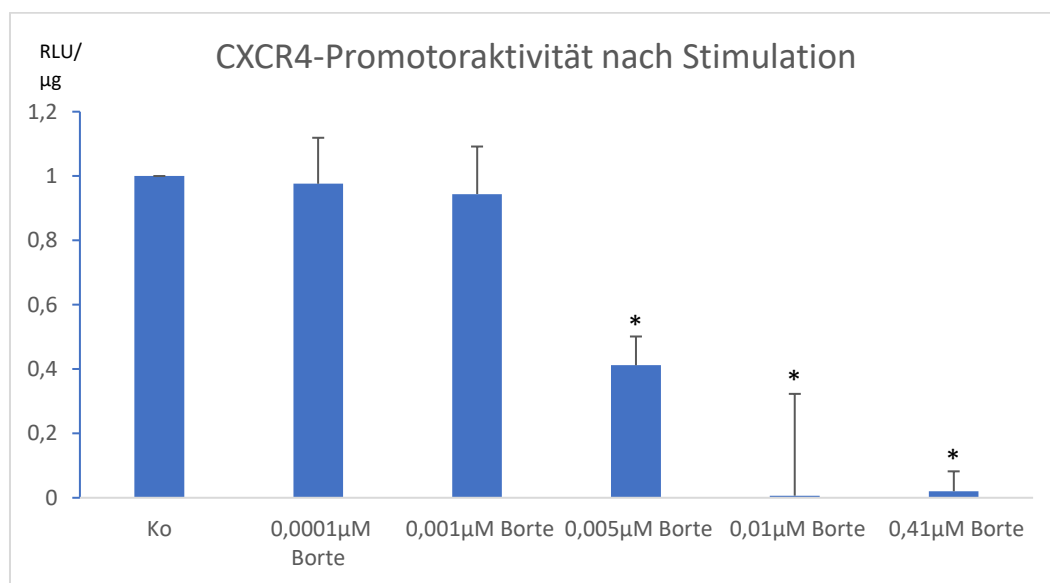
Auch bei Dexamethason zeigte sich bei der Verwendung einer Konzentration von 100 μ M ein deutlicher hemmender Effekt auf die Luciferase-Aktivität, also die Aktivität des CXCR4-Promotors, wobei die Konzentration bei pGL4.14 unbeeinflusst bleibt (Daten nicht gezeigt). Auch die bei den transient transfizierten Zellen zuvor verwendete Konzentration von 5 μ M führte bereits zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität, sodass dieser Effekt als konzentrationsabhängig bezeichnet werden kann.



*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 29: **INA-6: Stimulationsversuche mit Dexamethason, Einfluss auf Promotoraktivität [RLU/ μ g]**. Getestet wurde Dexamethason (Dex) in verschiedenen Konzentrationen und dessen Einfluss auf das CXCR4-pGL4.14-Konstrukt. Dabei zeigte sich der stärkste Effekt bei einer Konzentration von 100 μ M, also der höchsten hier getesteten Konzentration, im Sinne einer deutlichen Suppression. Mind. zwei unabhängige Experimente mit je drei Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. *EtOH= Ethanol, Ko= Kontrolle*.

Bortezomib ließ bereits bei den transient transfizierten Zellen erahnen, dass es sich um den potentesten Wirkstoff handelt. Zu erkennen ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der CXCR4-Promotor-Aktivität mit so gut wie vollständig supprimierter Aktivität ab einer Konzentration von 0,01 μ M. Die bei den transient transfizierten INA-6 zuvor verwendete Konzentration von 0,5 μ M hatte passend dazu einen deutlich hemmenden Effekt auf die Promotor-Aktivität. 0,001 μ M jedoch wiesen noch einen recht moderaten Einfluss auf.



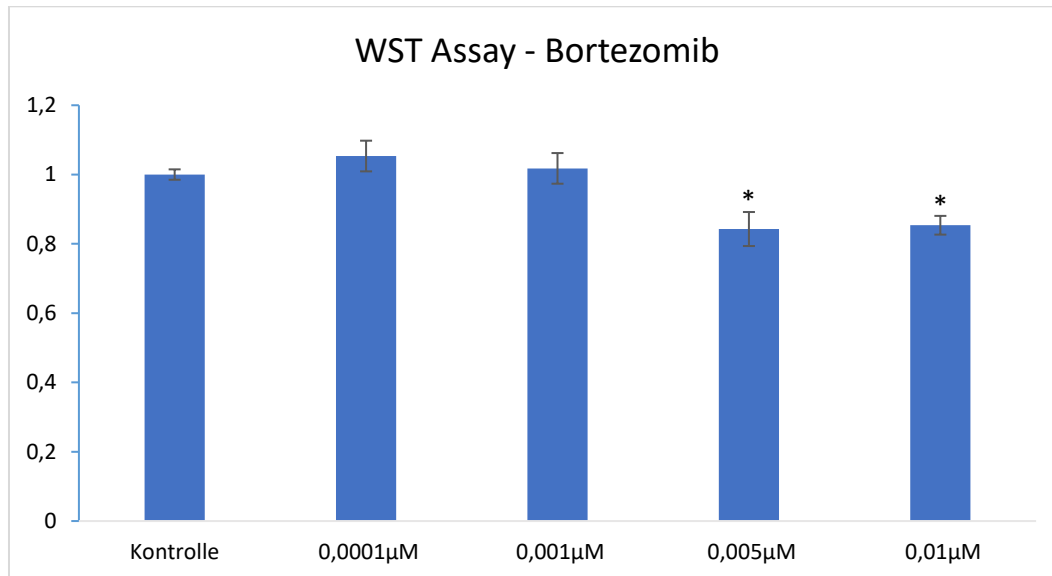
*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 30: **Stimulationsversuche mit Bortezomib, Einfluss auf Promotoraktivität [RLU/ μ g]**. Getestet wurde eine differenziertere Auswahl von Bortezomib (Borte) auf das CXCR4-pGL4.14-Konstrukt, wobei sich mit Zunahme der Konzentration eine signifikant stärkere Suppression der Luciferase-Aktivität zeigte (*). Die Ergebnisse des Leervektors pGL4.14 waren nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Mind. 3 unabhängige Experimente mit 3 verschiedenen Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. *Ko= Kontrolle*

Analyse der Zellviabilität mittels WST-Assay nach Bortezomib, Etoposid und Dexamethason-Behandlung

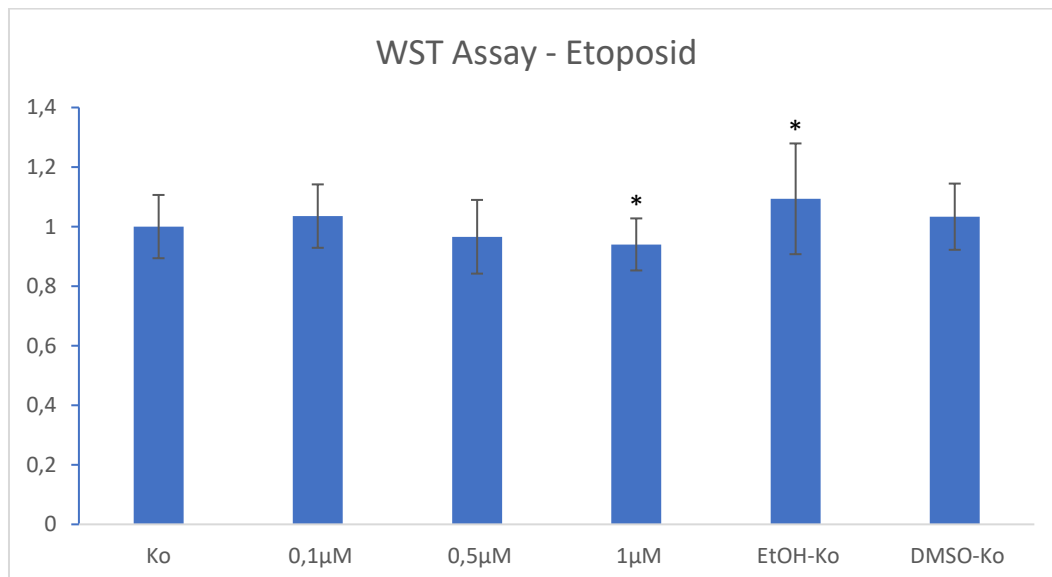
In einem nachträglich zusätzlich durchgeführten WST-Assay zur Messung der Zellproliferation sollte noch sicher gegangen werden, dass die starke Hemmung der CXCR4-Aktivität bei INA-6 nicht auf einer starken Einschränkung der Zellproliferation beruhte, denn auch bei den Patienten war die Erkrankung weiterhin progressiv, die CXCR4-Aktivität jedoch trotzdem reduziert. Es zeigte sich konzentrationsabhängig eine leichte Einschränkung der Zellproliferation, die jedoch im Rahmen der anvisierten 20% des Ausgangswertes im Vergleich zur Kontrollgruppe lag.

Die Ergebnisse der Einflüsse der verschiedenen Bortezomib-Konzentrationen auf die stabilen INA-6 Zellen (pGL4.14 Leervektor und CXCR4-pGL4.14) wurden zusammengefasst und zeigten eine leichte, aber signifikante Hemmung der Zellviabilität.



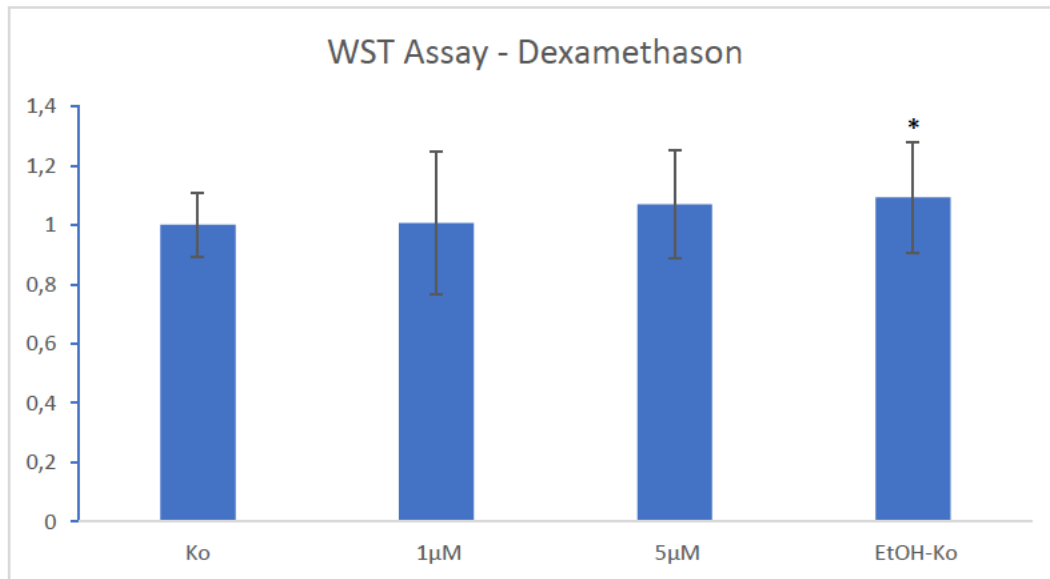
*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 31: **INA-6, WST-Assay 1, Einfluss von Bortezomib auf die Viabilität.** Der Einfluss von Bortezomib auf stabile INA-6 Zellen (pGL4.14 Leervektor und CXCR4-pGL4.14). Dabei zeigte sich eine leichte Abnahme der Zellviabilität mit Zunahme der Konzentration. Mind. sechs unabhängige Experimente mit je drei Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. Ko= Kontrolle



*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 32: **INA-6, WST-Assay 2, Einfluss von Etoposid auf die Viabilität.** Der Einfluss von Etoposid auf stabile INA-6 Zellen (pGL4.14 Leervektor und CXCR4-pGL4.14). Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der Viabilität bei 1µM Etoposid, wobei die Abnahme sichtbar gering ausfiel. Eine leichte Zunahme war bei der Verwendung von Ethanol (EtOH) zu verzeichnen. Mindestens sechs Experimente mit je drei Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. Ko= Kontrolle, DMSO= Dimethylsulfoxid.



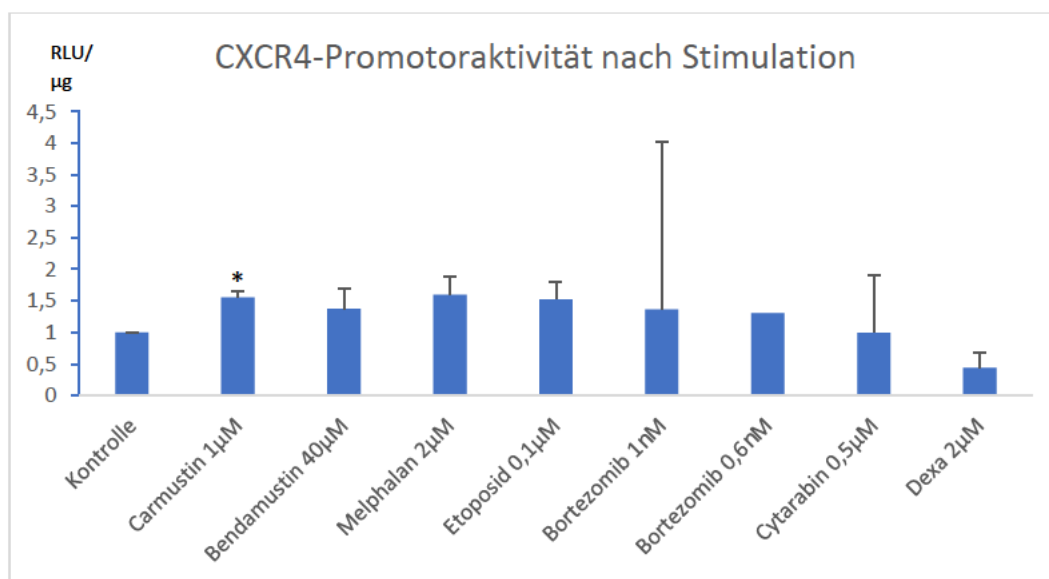
*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 33: **INA-6, WST-Assay 3, Einfluss von Dexamethason auf die Viabilität.** Der Einfluss von Dexamethason auf stabile INA-6 Zellen (pGL4.14 Leervektor und pGL4.14-CXCR4) zeigte lediglich eine geringe Zunahme bei der Kontrolle (Ko) mit Ethanol (EtOH), wobei auch diese gering ausfiel. Mindestens sechs Experimente mit je drei Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt.

Gesamtergebnisse der MM1S-Zellen:

Ebenso wie bei den Ansätzen mit INA-6 Zellen erfolgte auch bei den **MM1S** eine transiente Transfektion mit dem CXCR4-pGL4.14-Konstrukt.

Die Ergebnisse können hiermit lediglich als hinweisgebend betrachtet werden, da sehr variable Messwerte erzielt wurden. Geplant waren weitere, zuverlässigere Versuche mit stabilen MM1S-Zellen, die weniger störanfällig sind, jedoch konnten bis zu diesem Zeitpunkt keine stabilen Zellen hergestellt werden.



*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 34: **MM1S, Stimulationsversuche CXCR4-pGL4.14-Promotorkonstrukt, Gesamtergebnis Luciferase/Protein-Ratio.** Der Einfluss auf den CXCR4-Promotor und dessen Aktivität konnte wie auch bei den INA-6 zuvor dargestellt werden. Dabei wurden die verschiedenen Chemotherapeutika in zuvor ausgewählten Konzentrationen getestet. Eine signifikante Veränderung konnte lediglich bei der Verwendung von Carmustin ($1\mu\text{M}$) auf CXCR4-pGL4.14 festgestellt werden. Auf den Leervektor pGL4.14 zeigten sich keine signifikanten Effekte (Daten nicht gezeigt). Mind. drei Experimente mit je zwei Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. *Dexa= Dexamethason*

Insgesamt zeigte sich bei den MM1S lediglich bei Carmustin ein leichter signifikanter Anstieg der CXCR4-Promotor-Aktivität. Eine starke Schwankungsbreite ließ sich bei der Verwendung von Bortezomib sehen.

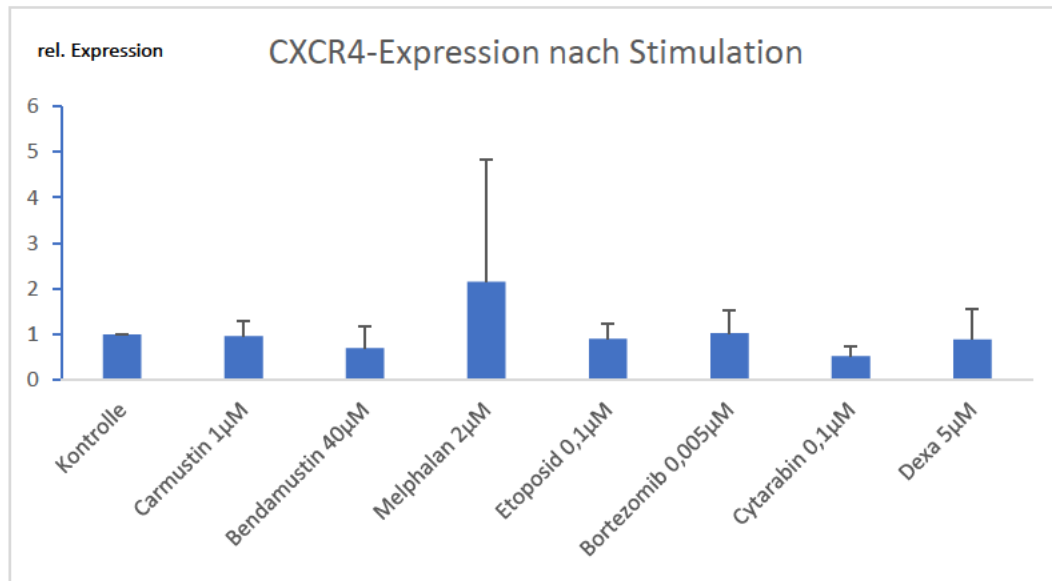
III.5 Stimulation und Transkriptionsaktivität (RNA-Messung)

Neben dem Einfluss der Chemotherapeutika auf die Myelomzellen im Sinne einer Beeinflussung der CXCR4 Promotoraktivität, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, welchen Einfluss diese auf die Zellen im Rahmen der Produktion der CXCR4-RNA und damit indirekt auf die Proteinbiosynthese haben.

III.5.1 Quantifizierung der CXCR4-Expression (qPCR)

Es zeigte sich bei den **INA-6** bzgl. der durch die Chemotherapeutika stimulierten Zellen als Auswirkung auf die RNA keine signifikanten Unterschiede der gemessene RNA-Menge und damit der Genaktivität von CXCR4. Lediglich bei Melphalan konnte eine starke Schwankung der RNA-Menge in den drei verschiedenen Durchführungen beobachtet werden. Die in drei Durchführungen gewonnenen Ergebnisse zeigten somit keine signifikanten Unterschiede, sodass keine Wirkung im Sinne einer Suppression oder Verstärkung der CXCR4-Aktivität nachgewiesen, aber auch nicht ausgeschlossen werden konnte.

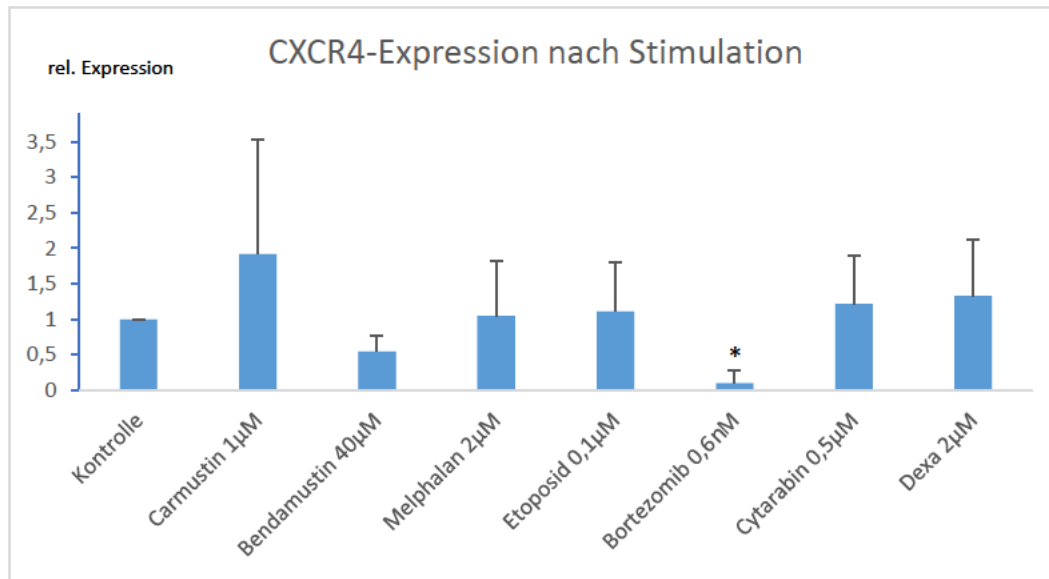
Im Hinblick auf die IGKC3-Aktivität (*Immunoglobulin kappa constant 3*) zeigte sich eine signifikante Reduktion der spezifischen RNA bei Zugabe von Melphalan und Etoposid. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass deren Aktivität deutlich supprimiert wurde.



*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 35: **INA-6, Stimulationsversuche mit verschiedenen Chemotherapeutika, Messung der relativen Expression.** Um Auswirkungen der Chemotherapeutika auf Ebene der RNA-Expression zu quantifizieren, wurden die INA-6 mit ähnlichen Konzentrationen wie in den Promotor-Versuchen zuvor behandelt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der CXCR4-RNA. Relative Expression= die Expression des Ziel-Gens (CXCR4) im Verhältnis zur Expression des Haushaltgens (*RPS27A, ribosomal protein S27a*). Daten für IGKC3 (*Immunoglobulin kappa constant 3*) nicht gezeigt. Mindestens drei Experimente mit je 3 Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. Dexa= Dexamethason

Bei den MM1S zeigte sich ein signifikanter hemmender Effekt auf die RNA-Menge nach der Zugabe von Bortezomib. Diese Beobachtung fügte sich in das Bild, das bei den Promotor-Stimulationsversuchen mit Bortezomib beobachtet werden konnte, welches darauf schließen ließ, dass es sich bei Bortezomib um das potenteste Therapeutikum der Testung handelt. Somit konnte auch auf Ebene der RNA ein deutlicher hemmender Einfluss von Bortezomib auf CXCR4 dargestellt werden. Bei Carmustin zeigte sich eine deutliche Schwankungsbreite der CXCR4-RNA-Menge in den drei verschiedenen Ansätzen. Bei Bendamustin ergab sich eine deutlich niedrigere CXCR4-Menge, wobei der Effekt nicht signifikant war.



*signifikant $\alpha < 0,05$

Abb. 36: **MM1S, Stimulationsversuche mit verschiedenen Chemotherapeutika, Messung der rel. Expression.** Zur Quantifizierung des Einflusses verschiedener Chemotherapeutika auf Ebene der CXCR4-RNA wurden diese in ähnlichen Konzentrationen wie bei den Promotor-Versuchen zuvor verwendet. Dabei zeigte sich ein signifikanter Effekt bei der Verwendung von Bortezomib in einer Konzentration von 0,6nM (*). Daten für IGKC3 (*Immunoglobulin kappa constant 3*) nicht gezeigt. Mindestens drei Experimente mit je drei Messpunkten, student's t-test, Standardabweichung gezeigt. Relative Expression= die Expression des Ziel-Gens (CXCR4) im Verhältnis zur Expression des Haushaltsgens (*RPS27A, ribosomal protein S27a*). Dexa= Dexamethason

IV. Diskussion

IV. 1 CXCR4-Expression im Myelom-MSC-Kokulturmodell

IV.1.1 PCR-Nachweis der CXCR4-mRNA-Expression

In diesem Versuchsansatz ging es darum, die Interaktion zwischen Myelomzellen (INA-6) und Mesenchymalen Stammzellen (MSC) durch Herstellung von Ko-Kulturen zu untersuchen, wobei die Zellen anschließend wieder mittels MACS-Sort voneinander getrennt und der jeweilige Einfluss, insb. auf CXCR4, auf Ebene der mRNA-Expression, untersucht werden sollte. Zudem sollte der zusätzliche Einfluss von Dexamethason analysiert werden.

Der Einfluss der Interaktion der INA-6 mit den MSC ließ sich durch diesen Ansatz nicht eindeutig darstellen. Durch die starke Bindung der INA6 an die MSC konnte eine bestehende Verunreinigung nicht ausgeschlossen werden, da z.T. IGKC3-Expression in MSC nachgewiesen werden konnte, die eigentlich von den INA-6-Zellen durch den MACS-Sort getrennt sein sollten.

Auch der Einfluss von Dexamethason, bei welchem eine steigernde Wirkung auf die CXCR4-Aktivität vermutet wurde, konnte nicht bestätigt werden, da sich bei vierfacher Durchführung kein einheitliches Bild ergab. Zu dieser Überlegung war *Lapa et al.* gekommen, da es wie bereits in der Einleitung skizziert, bei einigen Patienten zu einer Induktion der CXCR4-Aktivität durch Dexamethason gekommen war.

Letztlich konnte durch die konventionelle PCR keine eindeutige Aussage über den Einfluss der direkten Zell-Zell-Interaktion getroffen werden. Jedoch konnte die im Vergleich zu MSC deutlich höhere Expression von CXCR4 in INA-6-Zellen gezeigt, eine steigernde Wirkung von Dexamethason (s. letzte Durchführung) zumindest vermutet und eine starke Bindung der INA6 an MSC (bzw. ein Nachweis verbliebender INA-6-RNA über die IGKC3-Aktivität) aufgezeigt werden.

Für eine semi-quantitative Analyse der CXCR4-Expression waren die Ergebnisse jedoch selbst nach wiederholter Aufreinigung der Zellen über die Säulen zu inkonsistent.

Aus diesem Grund führten wir zusätzlich quantitative PCRs (qPCR) durch:

Die Bestimmung der qPCR-Effizienzen brachte für in unserem Labor geltenden Standards gute Werte, sodass die Messungen entsprechend durchgeführt werden konnten.

Es zeigten sich zwar signifikante Effekte im Sinne einer Verminderung der CXCR4-Menge in einigen INA-6-Ansätzen; diese lassen sich aber am ehesten auf die stark verringerte Zellzahl in den entsprechenden Ansätzen zurückführen. Eine Steigerung der CXCR4-Expression der INA-6 ließ sich auch hier nicht quantitativ feststellen. Allerdings wiesen sie von Natur eine deutlich höhere CXCR4-Expression auf. Ebenso zeigte der Einfluss von Dexamethason keine signifikanten Ergebnisse, sodass nicht von einer Beeinflussung der Aktivität, zumindest mit den hier verwendeten Konzentrationen, ausgegangen werden kann. Da in den Versuchen zur Promotoraktivität ebenfalls Dexamethason in verschiedenen Konzentrationen getestet wurde, konnte auf dessen Effekt noch weiter eingegangen werden.

MSC erfuhren in den Versuchen keine Induktion der CXCR4-Expression durch die Interaktion mit INA-6; auch Dexamethason zeigte hier keine signifikanten Ergebnisse. Dafür war auch womöglich die Inkubationszeit der Ko-Kultur zu gering (48h).

IV.1.2 Nachweis der CXCR4-Proteinexpression

Nach den Versuchen zur Beeinflussung der CXCR4-Expression auf Ebene der mRNA sollte folgend der Einfluss der Interaktion zwischen INA-6 und MSC in Bezug auf die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche untersucht bzw. dargestellt werden.

IV.1.2.1 Immunzytologie

Die Immunzytologie erwies sich als sehr anfällig und problematisch. Trotz mehrfachen Wechsels der primären sowie sekundären Antikörper und vielfacher Variation der Konzentration der verwendeten Reagenzien ließ sich CXCR4 nur schlecht anfärben. Z.T. war die Hintergrundfärbung deutlich erhöht und überlagerte spezifischere Bindungen. Insgesamt wirkten die Färbeversuche wenig konsistent und stark abhängig von der Durchführung, wobei einige Durchführungen doch eine mögliche Anfärbbarkeit nahelegen ließen, da sich bestimmte gefärbte Bereiche auf den Zellen deutlich von denen der Negativkontrollen unterschieden.

Quantitative Aussagen, die eine Beeinflussung des Rezeptors durch Chemotherapeutika oder direkte bzw. indirekte Zell-Zell-Interaktionen möglich machen sollten, stellten sich aufgrund der fehlenden Konsistenz der Färbeergebnisse als schwierig heraus. Aussagen z.B. darüber, ob es auf Ebene des Rezeptors zu einer Internalisierung und dadurch Verringerung der Expression oder zu einer Vermehrung der Präsenz auf der Zelloberfläche kommt, ließen sich dadurch nicht treffen.

Zur Durchführung lässt sich sagen, dass geringere Konzentrationen der verwendeten Antikörper und Farbstoff-gelabelten sekundären Antikörper klarere Ergebnisse lieferten, da sich die Verunreinigung durch Farbreste bzw. unspezifische Bindungen dadurch verringerte.

Fraglich blieb die weitere Verwendung von Mausserum zur Testung unspezifischer Rezeptorbindungen, da diese womöglich selbst das Antigen enthielten und damit deren Nutzen und Aussagekraft in Frage gestellt wurde, weshalb dieses auch in weiteren Ansätzen nicht mehr verwendet wurde.

MSC wiesen generell eine deutlich schwächere Anfärbbarkeit auf, die sich so gut wie gar nicht von der der Negativproben unterschied; was dazu passen würde, dass diese eine sehr niedrige Menge an CXCR4 exprimieren. Auch hier machte die Verwendung eines anderen primären Antikörpers keinen Unterschied, was diese These unterstützte.

Die Färbungen der Ko-Kulturen ließen zwar keinen Schluss auf das Ausmaß des Effekts der Interaktion von INA-6 und MSC zu, allerdings konnte die enge Bindung dieser beiden Zelltypen dargestellt werden. Zwar ließ sich der Rezeptor an der Oberfläche anfärben, aufgrund der z.T. starken Hintergrundfärbung, die auch teilweise bei den Negativproben zu sehen war, ließen sich aber keine spezifischen Aussagen treffen. Die nicht unerhebliche Abhängigkeit der Ergebnisse von der Durchführung, insb. dem Auftragen und Waschen der Objektträger, muss berücksichtigt werden.

IV.1.2.2 Nachweis der CXCR4 Expression durch Verwendung des farbstoffmarkierten Liganden SDF1 α

Die direkte Färbung des CXCR4 Rezeptors mithilfe eines Farbstoff-gekoppelten Liganden (CXCL12 bzw. SDF1 α) wurde als alternativer Weg eingeschlagen, da die Antikörper-gekoppelte Färbung keine eindeutigen Ergebnisse brachte. Es konnte gezeigt werden, dass diese Färbung sehr wohl erfolgreich war. Diese zeigte sich als stark konzentrationsabhängig, wobei ein Mehr an Ligand auch zu einem Mehr an Verunreinigung führte. Besonders bei INA-6 konnten gute Ergebnisse erzielt werden, die sich von den Kontrollen unterschieden. Hierin kann ein vielversprechender Ansatz zur immunzytologischen Darstellung von CXCR4 gesehen werden. Auf eine schonendere Färbung gilt es dabei zu achten, da die *Zytospin-Technik* teilweise zur Fragmentierung der INA-6 führte, was die anschließende Färbung deutlich beeinflusste; weshalb als generelles Vorgehen als erster Punkt die Färbung und anschließend das Auftragen per *Zytospin* empfohlen werden kann.

Generell sind hier noch weitere Untersuchungen nötig, auch unter Verwendung weiterer Zelllinien wie MM1S und der Färbung von Ko-Kulturen, um definitive Aussagen treffen zu können, was die farbliche Darstellung des CXCR4-Rezeptors auf der Zelloberfläche angeht.

IV.2 In-Vitro Chemotherapie mit dexamethason-Beam

Entsprechend der Anwendung in der Klinik sollte in diesem Versuch der Einfluss der Chemotherapeutika des *dexamethason-Beam*-Schemas auf Myelomzellen und MSC untersucht werden. Dabei galt es zunächst diejenigen möglichst hohen Konzentrationen zu ermitteln, bei denen sich gerade noch keine übermäßige Wirkung auf Zellviabilität und -apoptose ergab, sodass im Anschluss deren Einfluss auf die CXCR4-Aktivität der noch vitalen Zellen untersucht werden konnte.

Bei der Wahl der Konzentrationen zur Testung von Viabilität und Apoptose muss berücksichtigt werden, dass sich diese an einzelne Werte aus der Literatur bzw. Erfahrungswerte aus unserem Labor orientierte. Demnach kann ein gewisser Selektionsbias nicht ausgeschlossen werden. Mögliche potentere Konzentrationen, die evtl. hätten getestet werden können, wurden ggf. nicht berücksichtigt.

Auch für die Auswahl der geeigneten Konzentration eines Wirkstoffs für die anschließenden Stimulationsversuche wurden diese anhand bestimmter *Cut-off* Werte bzw. Prinzipien bestimmt. So war es unser Ziel, diejenige möglichst hohe Konzentration des Chemotherapeutikums auszuwählen bzw. zu identifizieren, bei der gerade noch keine starke Inhibierung der Viabilität bzw. Apoptose der Zellen stattfand. Da nicht beliebig oft getestet werden konnte, mussten dort, wo keine Verringerung der Viabilität auf 80% nachgewiesen werden konnte, Konzentrationen gewählt werden, die näherungsweise diesen Effekt hatten. Blieb auch das nicht zu erwarten, wurde diese mit einem mäßigen Anstieg der Apoptose bzw. bei keinem Effekt die höchste getestete Konzentration verwendet. Auch ergab sich teilweise die geeignetere Konzentration erst im Nachhinein bei Nachtestungen. Von daher kann die Auswahl der geeigneten Konzentration als schwierig und bestimmend für die weiteren Ergebnisse angesehen werden.

Darüber hinaus gilt auch zu berücksichtigen, dass die Wirkstoffe in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst werden konnten, und diese nach beigefügtem Beipackzettel mit dem als am wenigstens beeinflussenden Lösungsmittel gelöst wurden, um mögliche Interaktionen zu vermeiden. Dafür wurden diese Lösungsmittel bei den Apoptose- und Viabilitätsmessungen mitgemessen.

Die INA-6-Zellen reagierten mitunter sehr variabel auf die verschiedenen Therapeutika. Z.T. führte ein Wirkstoff auch zur Erhöhung der Viabilität bzw. zeigte mit steigender Konzentration nicht unbedingt eine stärkere Hemmung ebendieser. Außerdem zeigten die verschiedenen Wirkstoffe unterschiedlich starke Wirkung auf die Viabilität/Apoptose. Als potentestes Mittel erwies sich dabei Bortezomib, welches trotz deutlich geringerer Konzentration als die der anderen Wirkstoffe die stärksten Effekte vorwies.

Bei den MM1S Zellen zeigten sich Effekte, die schon eher zu den Erwartungen im Sinne einer Konzentrationsabhängigkeit passten. So führte in der Regel eine erhöhte Konzentration zu einer verstärkten Abnahme der Viabilität und nicht zu dessen Zunahme. Allerdings kam es auch hier zu Abweichungen, sodass einige Konzentrationen eine signifikante, andere eine nicht signifikante Wirkung zeigten. Auch hier erwies sich Bortezomib als am potentesten, aber mit einer starken Schwankungsbreite.

MM1S erwiesen sich im Vergleich zu INA-6 insgesamt als die Zellen mit den passenderen Ergebnissen der Messungen, wie sie durch die Wirkung von Chemotherapeutika zu erwarten wären. Es bleibt zu überprüfen, wie andere Zelltypen aus dem Bereich der Myelomzellen auf diese Wirkstoffe reagieren.

Letztlich konnten -wie oben beschrieben- entsprechende Konzentrationen der Wirkstoffe für die weiteren Versuche bestimmt werden, wobei sich jeweils für eine Konzentration entschieden werden musste.

IV. 3 Charakterisierung des CXCR4 Promotors

IV.3.1 *In silico* Promotoranalyse mittels Genomatix MatInspector

Die Promotoranalyse mit dem *Genomatix MatInspector* brachte Hinweise auf mögliche Bindestellen von Transkriptionsfaktoren an der untersuchten Promotorsequenz (s. Anhang). Damit konnten keine definitiven Rückschlüsse gezogen werden, aber sie dienten einer möglichen Interpretation der Ergebnisse und ließen Vermutungen auf mögliche Interaktionen zu. Die Vollständigkeit der gefundenen Bindestellen lag dabei in der Verantwortung des Programms, dieser Prozess ließ sich nicht beeinflussen.

Interessant war dabei vor allem die NFkB-Sequenz, da sich hierüber der starke hemmende Einfluss von Bortezomib (s. Stimulationsversuche) als NFkB-Inhibitor erklären lässt, welches ungehemmt normalerweise anti-apoptotische Effekte aufweist. Dem deutlichen Effekt von Dexamethason auf die Promotoraktivität kann man ebenfalls in Zusammenhang mit dem im Promotor enthaltenen Glukokortikoid-responsiven Element (GRE) sehen. Auch bei Etoposid geben die analysierten Bindestellen einen Hinweis, denn Etoposid (VP-16) beeinflusst neben der Topoisomerase (II)

nachweislich auch über den TAK1-IKK-NF- κ B-Pathway inhibitorisch NF κ B, indem es die Phosphatase POPX2 hochreguliert, was letztlich die Apoptose der Zellen fördert⁶¹.

Somit ergaben sich durch die *in-silico* Analyse relevante Bindestellen der CXCR4-Promotorsequenz, die eine Erklärung liefern könnten hinsichtlich der Pathophysiologie und damit der beobachteten starken hemmenden Effekte der drei Substanzen Bortezomib, Etoposid und Dexamethason, wobei sicher noch weitere Untersuchungen nötig sind, um das eindeutig zu bestätigen.

IV.3.2 Klonierung des Promotors mittels pGL4.14

Die Verwendung des pGL4.14-Plasmids als Vektor für die Transformation der E.coli-Bakterien stellt ein Standardverfahren in den Laboren dar, das sich mit jedem beliebigen DNA-Abschnitt hätte wiederholen lassen. Beeinflussbare Faktoren stellten die Auswahl der Restriktionsenzyme *XhoI* und *KpnI* dar, für die auch andere Enzyme hätte verwendet werden können. Mit der Transformation, Ligation, Selektion und anschließenden Sequenzierung der Plasmid-DNA konnte das Ergebnis der erfolgreichen Klonierung eines 2000bp CXCR4-Promotorfragments überprüft und damit objektiviert werden.

Der bei -80°C konservierte Bakterienstock zeigte bei der Maxi-Präparation zeitweise jedoch einige Probleme: so erfolgte zwar eine Trübung des Mediums bei Inkubation über Nacht, was ein resistentes Wachstum der Bakterien unter Ampicillin andeutete, allerdings brachte das Gewinnen und Aufreinigen der enthaltenen DNA letztlich oft kein Ergebnis bzw. eine viel zu geringe Konzentration hervor, die für die weiteren Versuche nicht ausreichend war. Es folgten mehrere frustrane Versuche der Maxi-Präparation mit CXCR4, welche schließlich auch nicht mehr für weitere Versuche zur Verfügung stand. Auch die in den späteren Stimulationsversuchen geringen Luciferase-Werte, die auf eine fehlerhafte Transfektion mit defektem oder fehlendem CXCR4-Promotor rückschließen ließen, lässt am wahrscheinlichsten einen Fehler bei der Maxi-Präparation, der Vermehrung von Bakterien mit erfolgreich enthaltenem CXCR4-Promotor-Gen, nahelegen. Somit erwies sich dieser Schritt als sehr fehleranfällig, mit relevanten Folgen für alle weiteren Versuche.

IV.3.3 Hygromycin-Verträglichkeitstest

Das Antibiotikum Hygromycin stellte ein adäquates Mittel dar, mit dem die erfolgreiche Transfektion eukaryontischer Zellen bzw. die anschließende Resistenz getestet werden konnte.

In den Verträglichkeitstests wurden die verschiedenen transfizierten Zelltypen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Hygromycin behandelt. Diese orientierten sich an Erfahrungswerten, mussten jedoch an den jeweiligen Zellen erst getestet werden. So vertrugen MM1S nur eine niedrigere Konzentration als INA-6. Die Beurteilung des Effekts verschiedener Hygromycin-Konzentrationen wies jedoch nur eine eingeschränkte Objektivierbarkeit auf, da sie durch Beobachten und näherungsweise Abschätzen der Zellzahl unter dem Lichtmikroskop erfolgte. Eine gewisse Beobachter-abhängige Verzerrung kann demnach unterstellt werden. Auch wenn dabei noch vereinzelte Zellen in der Petrischale verblieben, wurde dies wie ein vollständiges Absterben der

⁶¹ Weng T, Koh CG. POPX2 phosphatase regulates apoptosis through the TAK1-IKK-NF- κ B pathway. Cell Death Dis. 2017 Sep 14;8(9):e3051. doi: 10.1038/cddis.2017.443. PMID: 28906490; PMCID: PMC5636987.

Zellen gewertet, da es im Folgenden zu keiner erneuten Vermehrung resistenter Zellen in diesen Ansätzen kam.

Die Beobachtungszeit beschränkte sich auf 4 Wochen.

Letztlich wurde jeweils eine näherungsweise getestete Konzentration verwendet, wobei evtl. durch weitere Testungen noch optimalere Konzentrationen hätten ausfindig gemacht werden können.

IV.3.4 Transfektion der Myelomzellen INA-6 und MM1S

Die Transfektion der Myelomzellen orientierte sich an der Durchführung der von *Prof. Bargou*, Universität Würzburg, beschriebenen Versuche⁶². So wurden auch die in diesem Paper angegebenen Einstellungen für die Transfektion der jeweiligen Zelltypen verwendeten Elektroporation übernommen. Die optimale elektrische Feldstärke und Impulsdauer der Stimulation wurden daraus abgeleitet. Demnach gehören die INA-6 und MM1S-Zellen zu den leicht zu transfizierenden Zellen. Jede Transfektion wurde dabei auf gleiche Weise durchgeführt.

Dass die Elektroporation als geeignetes Mittel angenommen werden kann, konnte in den ersten Versuchen bestätigt werden, da eine deutlich erhöhte Aktivität der Luciferase um den Faktor 10, auch relativ zur Menge des enthaltenen Proteins, dies näherlegte. Dies kann als Ausgangspunkt für alle weiteren Versuche angesehen werden. Einen gewissen Unterschied im Hinblick auf die tatsächlich transfizierten und stimulierten Zellen kann nicht ausgeschlossen werden.

Einen gewissen Zeitfaktor gilt es auch zu berücksichtigen, da die Aktivität der Luciferase zeitabhängig abnahm, sodass auch davon ausgegangen werden kann, dass alle weiteren Versuche einen zeitabhängigen Erfolg besaßen. Die linearisierte Form des Plasmids brachte dabei einen besseren Erfolg, was für die Herstellung stabiler transfizierter Zellen entscheidend war. Ziel war es langfristig, stabile Zellen herzustellen, um die Stimulationen der Zellen einfacher und ohne Ausübung von Zellstress durchzuführen, sodass die Versuche an transient transfizierten Zellen als Zwischenschritt bzw. erste Versuche angesehen werden können.

IV.3.4.1 Herstellung stabiler transfizierter Zellen

Bereits bei den Versuchen zu Viabilität und Apoptose der verschiedenen Myelom-Zelllinien hatten sich Unterschiede im Verhalten der Zellen gezeigt. Auch beim Erfolg der Transfektion mittels Elektroporation zeigten sich Unterschiede. INA-6 wiesen von vornherein bessere Erfolge in Bezug auf die Einschleusung des linearisierten pGL4.14-CXCR4 Promotorplasmids auf; auch blieb dessen Aktivität im Verlauf deutlich höher als die der transienten Transfektion. Bei den MM1S war der Erfolg der stabilen Transfektion von vornherein nicht so deutlich erkennbar. Dies bestätigte sich auch im weiteren Versuch der Herstellung stabiler Zellen: die Herstellung stabiler transfizierter Zellen war bis

⁶² Steinbrunn T, Chatterjee M, Bargou RC, Stühmer T. Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation—an appraisal. PLoS One. 2014;9(6):e97443. Published 2014 Jun 5. doi:10.1371/journal.pone.0097443

dato mit MM1S nicht gelungen, wobei auch die höhere Empfindlichkeit dieses Zelltyps gegenüber Hygromycin im Vergleich zu INA-6 als früher Hinweis gedeutet werden kann.

Auch hier wurde die Aktivität der Luciferase in Bezug auf die Proteinmenge als entscheidendes Kriterium für den Erfolg angesehen, wobei sich bei den INA-6 eine deutlich höhere Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität zeigte.

Somit war die Herstellung stabiler transfizierter INA-6-Zellen per Elektroporation möglich gewesen und bildete die Grundlage für weitere Versuche.

IV.4 CXCR4 Promotoranalysen in Myelomzellen

Ziel war es, den Einfluss der Chemotherapeutika mit den zuvor ermittelten Konzentrationen auf die CXCR4-Promotor-Aktivität zu untersuchen, und so Rückschlüsse auf ein mögliches Supprimieren der CXCR4-Aktivität ziehen zu können.

Generell lässt sich sagen, dass mit dem verwendeten *dexa-BEAM* Schema nur eine begrenzte Auswahl an Chemotherapeutika getestet wurde. Diese Auswahl bezog sich aber auf die zuvor bei *Lapa et al.* untersuchten Patienten, die eben dieses Schema bekommen hatten. Es umfasst eine Vielzahl verschiedener Chemotherapeutika unterschiedlicher Wirkstoffklassen, sodass eine gewisse Repräsentativität gegeben war. Ob auch andere Mittel im Zusammenhang mit einer beobachteten Suppression der CXCR4-Aktivität in Verbindung gebracht werden können, bleibt zunächst offen. Allerdings stellte die Auswahl sehr wohl im klinischen Alltag übliche Substanzen dar. Die Auswahl der entsprechenden Konzentrationen wurden zuvor in den Apoptose- und Viabilitätsversuchen bestimmt, aber teilweise zwischen den einzelnen Versuchen nochmal geändert und entsprechenden Nachtestungen angepasst.

Die Stimulation transient transfizierter Zellen erwies sich als sehr störanfällig. Durch den als ersten durchzuführenden Schritt der Elektroporation und dem davon anhängigen Erfolg der Transfektion ergab sich eine gewisse Störanfälligkeit, da eine erfolgreiche Transfektion prinzipiell schonmal die erste Voraussetzung war. Außerdem wurden die Zellen einem gewissen Stress ausgesetzt, dem man mit einer Inkubationszeit von 24h entgegenwirken wollte.

Die Anfälligkeit zeigte sich dabei bei den späteren Durchführungen, bei denen ein scheinbar defektes Promotorkonstrukt in die Zellen eingebracht wurde, was zu nicht verwertbaren Aussagen bzgl. der Luciferase-Aktivität und damit dem Einfluss der verwendeten Chemotherapeutika führte.

Somit ergeben sich gewisse Einschränkungen bezüglich der Qualität der erhaltenen Ergebnisse, welche mit der Durchführung an stabilen transfizierten Zellen verbessert werden sollten.

Dass die transiente Transfektion jedoch funktionierte und die Stimulation zu richtungsweisenden Ergebnissen führte, kann gewiss angenommen werden, auch wenn die Anzahl der Wiederholungen der durchgeführten Versuche eingeschränkt waren.

Die verschiedenen Zelllinien, INA-6 und MM1S, zeigten ein unterschiedliches Ansprechen des CXCR4-Promotors auf die Chemotherapeutika, mit unterschiedlichen signifikanten Effekten. Somit kann dies

als Hinweis auf ein sehr heterogenes Ansprechen der verschiedenen Myelom-Zelllinien gesehen werden, wobei hier nur zwei verschiedene untersucht werden konnten.

Als gewisse Bestätigung lässt sich aus diesen Ergebnissen herauslesen, dass Bortezomib bei beiden die größte Potenz besitzt. Denn die bereits bei den Apoptose- und Viabilitätsversuchen beobachteten starken Effekte, spiegelten sich in einer starken Hemmung der Luciferase-Aktivität des CXCR4 Promotorkonstrukts bzw. einer starken Schwankung ebendieser wider.

Pathophysiologisch fragt sich, wie und weshalb bestimmte Chemotherapeutika - gegenteilig den Erwartungen - teilweise zu einer Stimulation der Luciferase-Aktivität des CXCR4 Promotorkonstrukts führten, so wie Etoposid bei INA-6 und Carmustin bei MM1S.

■ Versuche mit stabilen INA-6

Die Versuche mit den transient transfizierten Zellen führten dazu, dass keine eindeutigen Auswirkungen bestimmter Chemotherapeutika getroffen werden konnten, aber wichtige richtungsweisende Effekte beobachtet werden konnten, die eine Eingrenzung und Fokussierung auf bestimmte Wirkstoffe möglich machte, sodass deren Auswahl und der Aufwand begrenzt werden konnte.

Mit der Auswahl von Etoposid, Dexamethason und Bortezomib konnte sich auf die potentesten Wirkstoffe konzentriert werden. Dexamethason wurde dabei auch im Hinblick auf die Ko-Kultur-Versuche untersucht.

Letztlich führten alle drei dieser Stoffe konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Hemmung der CXCR4-Promotoraktivität.

Mit den stabilen Zellen konnten deutlich weniger störanfällige Versuche durchgeführt werden, sodass die Ergebnisse als verlässlicher angesehen werden können. Gegebenenfalls können mit diesen Zellen weitere Substanzen und deren Einfluss auf den CXCR4-Promotor untersucht werden.

IV.6 Stimulation und Transkriptionsaktivität (RNA-Messung)

Da eine Untersuchung der CXCR4-Expression auf mehreren Ebenen erfolgen sollte, um nicht nur Einflüsse auf den Promotor, sondern auch auf Ebene der mRNA und der Verteilung des Rezeptors auf der Zelloberfläche zu berücksichtigen und ggf. isolierte Effekte nicht zu übersehen, wurden die Untersuchungen um die mRNA-Stimulation und CXCR4-Nachweis durch PCR-Amplifikation ergänzt. V.a. unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Verteilung und Präsenz des Rezeptors auf der Zelloberfläche mittels Immunzytologie nicht hinreichend untersucht werden konnte, um eindeutige Aussagen zu treffen.

Die Aussagekraft wurde durch dreimalige Wiederholung des Versuchs sichergestellt.

Der fehlende signifikante Effekt kann hierbei in gewisser Weise auch von der Auswahl der Konzentration herrühren, da nicht erneut beliebig viele und hohe Konzentrationen getestet wurden. Diese orientierten sich an den zuvor verwendeten Konzentrationen.

Entsprechend der bei den Promotorversuchen beobachteten Effekte müssten auch hier entsprechende Effekte zu beobachten sein, da sich die synthetisierte RNA als unmittelbare Folge der Promotoraktivität ergibt, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Bestimmung des CXCR4-mRNA-Gehalts durch PCR die endogene CXCR4-Expression widerspiegelt, während die Analyse der CXCR4-Promotoraktivität ein artifizielles System darstellt.

Andeutungsweise lassen sich zumindest bei der IGKC3-Aktivität als INA-6-spezifisches Gen Hemmungen der Aktivität beobachten, wobei auch Etoposid wieder eine beeinflussende Rolle spielt. Auch bei der CXCR4-Expression lassen sich Auswirkungen auf die Genaktivität durch Melphalan vermuten. Signifikante neue Erkenntnisse in Bezug auf die Beeinflussung der CXCR4-Expression ließen sich dadurch nicht gewinnen.

Die Untersuchungen der Wirkstoffe auf dieser der drei Ebenen (Rezeptorverteilung, Promotoraktivität und RNA-Synthese) können demnach lediglich hinweisgebend die Ergebnisse der Promotoruntersuchungen unterstützen.

Somit kann im Hinblick auf das übergeordnete Ziel, das bei diesen Versuchen verfolgt wurde, nämlich der Einfluss der Chemotherapeutika auf den CXCR4-Rezeptor, festgehalten werden, dass ein hemmender Einfluss von **Dexamethason**, **Bortezomib** und **Etoposid** auf die Aktivität bzw. Expression von CXCR4 auf Ebene des Promotors besteht, ohne dass eine relevante Hemmung der Viabilität der Zellen nachzuweisen ist. Dies betrifft das Signaling von CXCR4. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass dies konzentrationsabhängig geschieht und zwischenzeitlich sogar eine Stimulation der Aktivität erfolgen kann, was wiederum deutlich macht, welchen Einfluss die verwendete Dosis auch in der Klinik haben kann. Somit spielen wohl auch die Bioverfügbarkeit und die Verteilung im Körper der PatientInnen eine wichtige Rolle. Die gleichwertige Übertragung der Ergebnisse auf den menschlichen Körper und damit die behandelten PatientInnen, die diese Chemotherapeutika erhalten, muss demnach kritisch betrachtet werden.

Näherungsweise kann man sich dabei an den im **klinischen Alltag** oder in Studien verwendeten Dosierungen orientieren^{63 64}: betrachtet man standardmäßig eine Person mit 75kg und 1,75m Körpergröße ergibt sich eine Körperoberfläche von 1,90m². Das dabei vorhandene Blutvolumen kann berechnet und mit ca. 5,25l angegeben werden. Die folgenden Konzentrationen können somit anhand dieses Volumens näherungsweise bestimmt werden, um zumindest eine grobe Einschätzung der in den Versuchen verwendeten Konzentrationen zu liefern. Dabei konnten mögliche Einflüsse durch Bioverfügbarkeit und Stoffwechsel nicht berücksichtigt werden.

- **Dexamethason:** Bei einer klinischen Anwendung von 3x 8mg Dexamethason per os (p.o.) täglich würde sich bezogen auf ein Blutvolumen von 5,25l eine Blutkonzentration von 1,52µg/ml ergeben, also 3,87nM.

⁶³ Scott, K, Hayden, PJ, Will, A, Wheatley, K & Coyne, I 2016, 'Bortezomib for the treatment of multiple myeloma', Cochrane Database of Systematic Reviews, vol. 4, CD010816. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010816.pub2>

⁶⁴ Josting A, Reiser M, Wickramanayake PD, Rueffer U, Draube A, Söhngen D, Tesch H, Wolf J, Diehl V, Engert A. Dexamethasone, carmustine, etoposide, cytarabine, and melphalan (dexa-BEAM) followed by high-dose chemotherapy and stem cell rescue--a highly effective regimen for patients with refractory or relapsed indolent lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2000 Mar;37(1-2):115-23. doi: 10.3109/10428190009057634. PMID: 10721775.

- **Bortezomib:** bei einer täglichen intravenösen (i.v.) Infusionsdosis von $1,3\text{mg}/\text{m}^2$ würde sich bei einer Fläche von $1,90\text{m}^2$ eine Konzentration von $0,47\mu\text{g}/\text{ml}$ ergeben, was etwa $1,22\text{nM}$ entspricht.
- **Etoposid:** bei einer klinischen Anwendung von $200\text{mg}/\text{m}^2$ kommt man auf eine Blutkonzentration von $72,38\mu\text{g}/\text{ml}$, also $0,13\mu\text{M}$.
- **Carmustin:** Es ergibt sich näherungsweise eine Blutkonzentration von $21,7\mu\text{g}/\text{ml}$ bei einer Gabe von $60\text{mg}/\text{m}^2$ i.v. und somit ca. $0,1\mu\text{M}$.
- **Melphalan:** Dieses wird u.a. in einer Dosis von $20\text{mg}/\text{m}^2$ i.v. gegeben, sodass sich eine Konzentration von $7,3\mu\text{g}/\text{ml}$ ergibt und somit $23,6\text{nM}$.
- **Cytarabin:** Bei einer klinischen Anwendung von $100\text{mg}/\text{m}^2$ i.v. kommt man theoretisch in etwa auf eine Blutkonzentration von $36,2\mu\text{g}/\text{ml}$ und damit $0,15\mu\text{M}$.
- **Bendamustin:** Bendamustin wurde in klinischen Studien u.a. in einer Konzentration von $90\text{mg}/\text{m}^2$ verabreicht⁶⁵, wodurch sich eine Blutkonzentration von $32,57\mu\text{g}/\text{ml}$ ergibt, also etwa $77,3\text{nM}$.

Die verwendeten Konzentrationen entsprechen somit näherungsweise auch den Konzentrationen in der Klinik. Ein Übertragen der Ergebnisse auf die klinische Anwendung wird somit zumindest erleichtert.

Der Einfluss auf die Promotoraktivität stellt sich als der am besten untersuchte und vielversprechendste Ansatz zur Erklärung der verringerten CXCR4-Aktivität/Expression dar, wie er auch bei den MM-PatientInnen unter Chemotherapie beobachtet werden kann. Dabei ist zu folgern, dass der Einsatz o.g. Substanzen nicht sinnvoll ist, wenn CXCR4 als Target der Behandlung/Diagnostik ausgewählt wurde, da sie einen störenden Einfluss ausüben.

In diesem Zusammenhang sollten auch präklinische Untersuchungen und klinische Beobachtungen realisiert werden, die aufzeigen, wie sich die Erholungskinetik der CXCR4 Expression nach Aussetzen ebendieser Substanzen, vor allem Bortezomib, verhält.

Betrachtet werden muss auch eine mögliche Internalisierung des CXCR4-Rezeptors in die Myelomzellen, wie es u.a. beim Vorgang der HIV-Infektion oder bestimmten Tumoren im Mausmodell beobachtet werden konnte. Dieser Vorgang könnte ebenfalls eine Maskierung des Rezeptors und damit eine fehlende Darstellbarkeit in der Bildgebung bedingen und muss als weiterer Mechanismus berücksichtigt werden.

Darüber hinaus gilt es auch, mögliche (epi-) genetische Einflüsse zu berücksichtigen, wie z.B. die durch Methylierungsstellen an p65-Bindestellen des CXCR4-Promotors. In Versuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von außen mittels CFA (*complete Freund's adjuvant*) zu einer Demethylierung der CpG-Inseln des CXCR4-Promotoabschnitts führten, was wiederum die Hochregulation der CXCR4-Expression zur Folge hatte.⁶⁶ Generell lässt sich dabei sagen, dass eine Methylierung zur Herab- und eine Demethylierung zur Hochregulation von Genabschnitten führt.

⁶⁵ Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, et al. Polatuzumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2020;38(2):155-165. doi:10.1200/JCO.19.00172

⁶⁶ Li F, Xue ZY, Yuan Y, et al. Upregulation of CXCR4 through promoter demethylation contributes to inflammatory hyperalgesia in rats. *CNS Neuroscience & Therapeutics.* 2018 Oct;24(10):947-956. DOI: 10.1111/cns.12845. PMID: 29577638; PMCID: PMC6489799.

Hierbei konnte zudem eine Hemmung der CXCR4-Expression über eine Hemmung des NFκB-Signalweges mittels p65-Inhibitor beobachtet werden, was erneut den NFκB-Signalweg in den Fokus bringt. Denn aus den durchgeführten Experimenten wird auch klar, dass der Transkriptionsfaktor NFκB die Expression von CXCR4 über die Ebene des Promotors stimuliert. Wie bereits unter IV.3.1 beschrieben, fungiert Bortezomib als NFκB-Inhibitor.⁶⁷ Wenn man nun mit Bortezomib die Aktivität des NFκB-Inhibitors IκB stabilisiert und damit NFκB im Cytosol hält, fehlt dieser Stimulus, da keine Bindung an die entsprechenden Transkriptionsfaktor-Bindestellen mehr möglich ist, womit es letztlich zu einer geringeren CXCR4-Expression kommt.⁶⁸ Ähnliche Beobachtungen konnten auch im genannten Mausexperiment gemacht werden, bei dem Pyrrolidin-dithiocarbamat (PDTC), auch ein Inhibitor des NFκB-Signalweges, ebenfalls zu einer messbaren Hemmung der CXCR4-Expression geführt hat.

Insgesamt kann also festgehalten werden, dass es gelungen ist, einen möglichen Mechanismus der starken Herunterregulation von CXCR4 durch Chemotherapeutika wahrscheinlich zu machen, wobei sich Bortezomib über den NFκB-Signalweg als das potenteste Medikament erwiesen hat. Weitere Studien sollten jedoch durchgeführt werden, um negative Interaktionen zwischen den Therapeutika zu prüfen. Außerdem müssen weitere Mechanismen wie epigenetische Einflüsse oder eine mögliche Rezeptorinternalisierung berücksichtigt werden, die ebenfalls einen maßgeblichen Effekt auf die CXCR4-Expression/Aktivität haben könnten.

⁶⁷ Weng T, Koh CG. POPX2 phosphatase regulates apoptosis through the TAK1-IKK-NF-κB pathway. *Cell Death Dis.* 2017 Sep 14;8(9):e3051. doi: 10.1038/cddis.2017.443. PMID: 28906490; PMCID: PMC5636987.

⁶⁸ Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut.* 1998 Apr;42(4):477-84. doi: 10.1136/gut.42.4.477. PMID: 9616307; PMCID: PMC1727068.

V. Anhang

V.1 Verwendete Materialien & Kits

V.1.1 Zellmedien

- MSC-Medium: Ham's F12 Nutrient Mix (Gibco®, *Thermo Fisher Scientific*, Nr.11765054)
 - + 20% heat inactivated FCS (*Bio&Sell*)
 - + 100 µg/ml Gentamicin (*Sigma Aldrich*)
 - + 1 mmol/l Pyruvat (*Sigma Aldrich*)
- INA-6-Medium: RPMI 1640 Medium (Gibco®, *Thermo Fisher Scientific*, Nr. 21870076)
 - + 10% heat inactivated FCS (*Bio&Sell*)
 - + 2 mmol/l L-glutamine (*Life Technologies GmbH*)
 - + 100 U/ml Penicillin (*Life Technologies GmbH*)
 - + 100 µg/ml Streptomycin (*Life Technologies GmbH*)
 - + 1mmol/l Pyruvat (*Sigma Aldrich*)
 - + IL6 (2 ng/ml, *Miltenyi Biotec*)
- MM1S-Medium: RPMI 1640 Medium (Gibco®, *Thermo Fisher Scientific*, Nr. 21870076)
 - + 10% heat inactivated FCS (*Bio&Sell*)
 - + 2 mmol/l L-glutamine (*Life Technologies GmbH*)
 - + 100 U/ml Penicillin (*Life Technologies GmbH*)
 - + 100 µg/ml Streptomycin (*Life Technologies GmbH*)
 - + 1 mmol/l Pyruvat (*Sigma Aldrich*)

V.1.2 Zellkultur

- EasYFlask™ Zellkulturkolben (*Thermo Fisher*)
- Trypsin-EDTA (*Life Technologies GmbH*)
- Zell-Inkubator *Heracell™* 240i CO2 Inkubator Chambers (*Thermo Fisher*)
- µ-Küvetten G1.0 (*Eppendorf*)

CellTracker-Green-Färbung (nach Hersteller-Angabe)

- CellTracker™ Green 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA) (*Lonza Group AG*, Basel, Switzerland)

Magnetic Activated Cell Sorting (MACS®, *Miltenyi Biotec GmbH*, Bergisch Gladbach, Germany)

- CD45 MicroBeads (for INA-6 cells)
- autoMACS Running Buffer (*Miltenyi Biotec*)

RNA-Isolation

- NucleoSpin-RNA-Kit (*Macherey-Nagel GmbH & Co.KG*)
- β-Mercaptoethanol (*AppliChem GmbH*, Darmstadt, Germany)

RNA-Messung

- Eppendorf Biophotometer D30

cDNA-Synthese

- M-MLV Reverse Transkriptase (*Promega GmbH*, Mannheim, Germany)
- 500ng/μl Oligo-dT (*Promega GmbH*)

V.1.3 PCR und qPCR

- peqSTAR 2×Thermocycler (*Peqlab Biotechnologie GmbH*, Erlangen, Germany)
- GoTaq® DNA Polymerase (*Promega GmbH*)
- TOptical und qTOWER³ Real-Time Thermocycler (*Analytik Jena AG*)
- KAPA SYBR FAST Universal qPCR Master Mix (*Peqlab Biotechnologie GmbH*, Erlangen, Germany)
- 20mM dNTPs (*Promega GmbH*, Mannheim, Germany)
- Sequenz-spezifische Primer (100 pmol/μl, *Biomers*, Ulm oder *Qiagen*, Hilden)

PCR-Primer

- Housekeeping gene eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 EEF1a (NM_001402.5, *Eurofins MWG Operon*, Ebersberg, Germany)
- CXCR4 (*Qiagen*)
- IGKC3 (*Biomers*)

V.1.4 Gelelektrophorese

- Agarosepulver (*Biozym*)
- 10 x TBE-Puffer (890 mM) TRIS Base, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0
- GelRed Nucleic Acid Gel Stain (*Genaxxon Bioscience GmbH*, Ulm, Germany)
- Geldokumentation: Fusion FX Spectra, Vilber LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, Programm: EVOLUTION-CAPT
- 100bp Marker (*peqGOLD*, *VWR*, Darmstadt)

V.1.5 Immunzytologie

- SuperFrost Plus Adhäsionsobjektträger (*Thermo Fisher*)
- CXCR4 Antikörper 1.1: CXCR-4 Antikörper (4G10), sc-53534, monokl. Maus-IgG, *Santa Cruz Biotechnology*, 200 μg/ml
- CXCR4 Antikörper 1.2: Rekombinanter Anti-CXCR4 monokl. Rabbit-IgG ([UMB2], ab124824 *abcam*)
- Sekundärer Antikörper 2:
Donkey Anti-Mouse IgG (*NorthernLights™ NL557-conjugate Antibody*, rot, *R&D-Systems*)
Donkey Anti-Goat IgG (*NorthernLights™ NL493-conjugated Antibody*, grün, *R&D-Systems*)
- VECTASHIELD Antifade Mounting Medium mit DAPI (*Vector Laboratories*)
- Tween (*Applichem*)
- BSA (*Applichem*)
- Leica DMI8 Mikroskop (*Leica Microsystems*)
- Zeiss-Mikroskop Axio Observer 7

- GLOMAX, Multi Detection System (*Promega GmbH*)
- Human SDF-1a (research grade, 100µg, 8kDa, *Miltenyi Biotec*)
- Alexa Fluor 555 Microscale Protein Labeling Kit (A30007, *Thermo Fisher*)
- ImageJ 1.52a (*National Institute of Health, USA*)

V.1.6 dexam-BEAM Chemotherapie

- Etoposid 25mg (*Sigma-Aldrich GmbH*)
- Carmustin 25mg (*Sigma Aldrich GmbH*)
- Cytarabin 50mg (*Tocris Bioscience*)
- Melphalan 50mg (*Tocris Bioscience*)
- Bortezomib (*Tocris Bioscience*)
- Bendamustin hydrochl. 10mg (*Tocris Bioscience*)
- Dexamethason 10mM (*BioReagent, Sigma-Aldrich GmbH*)
- DMSO (*AppliChem*)
- Ethanol (*AppliChem*)
- Methanol (*AppliChem*)
- Chloroform (*AppliChem*)

Proliferation/Apoptose

- 96 Well-Platten (µClear, weiß, *Greiner Bio-One*)
- Proliferation: CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (*Promega GmbH*)
- Apoptose: CaspaseGlo® 3/7 Assay (*Promega GmbH*)
- Mikroplatten-Luminometer (Orion II, *Berthold Technologies*)

V.1.7 Promotorversuche

- Genomatix MatInspector 2018 (© *Intrexon Bioinformatics Germany GmbH*)
- pGI4.14 Luciferase Reportervektor (*Promega GmbH*)
- NEB® 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency), *New England BioLabs Inc.*
- CXCR4 Promotor(2012bp) in pBluescript II SK (+) (4919bp) *BioCat, Heidelberg*)
- XhoI und KpnI Restriktionsenzyme (*New England Biolabs GmbH, Frankfurt*)
- Gelextraktion: peqGOLD Gel Extraktion Kit (*peqlab, vwr*)
- Ligation: Ligation Protocol mit T4 DNA Ligase (M0202), *New England BioLabs Inc.*
- SOC Medium (*New England Biolabs GmbH, Frankfurt*)
- LB-Platten & Medium (*Appllichem*)
- Ampicillin (*Sigma Aldrich*)
- Sequenzierung: Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (*Life Technologies GmbH*)
- DNA-Plasmid-Isolierung: NucleoBond Xtra Maxi kit for transfection-grade plasmid DNA (*Macherey-Nagel*)
- Hygromycin (*Thermo Fisher Scientific*)
- Gene Pulser II Elektroporator (*Bio-Rad Laboratories GmbH, München*)
- Roti-Quant (*Carl Roth GmbH, Karlsruhe*)
- Pierce Luciferase Cell Lysis Puffer (*Thermo Fisher Scientific*)
- WST-1 Assay (*Roche, #11644807001*)

V.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Serumelektrophorese mit sogenanntem „M-Gradient“ https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b3/Serum_protein_electrophoresis_normal_and_paraprotein.png (18.01.2022)	10
Abb. 2: (In-) Direkte Interaktion zwischen Tumorzellen und Osteoklasten Hofbauer LC, Rachner TD, Coleman RE, Jakob F. Endocrine aspects of bone metastases. The lancet. Diabetes & Endocrinology. 2014 Jun;2(6):500-512. DOI: 10.1016/s2213-8587(13)70203-1	12
Abb. 3: Beispiel einer CXCR4-Herunterregulierung durch begleitende Chemotherapie beim refraktären MM (aus: Lapa et al., Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy, BJH Vol. 184 Issue 3 Pages 440-443, Feb. 2019, https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15096)	16
Abb. 4: Übersicht der verwendeten PCR-Primer und deren Spezifikationen	26
Abb. 5: Verdünnungsreihe cDNA zur Effizienzbestimmung	28
Abb. 6: Übersicht Zusammensetzung Mastermix für qPCR	28
Abb. 7: Pipettierschema der Effizienzbestimmung	28
Abb. 8: Standard-Schmelzkurve (Beispiel) zur Effizienzbestimmung mittels qPCR	29
Abb. 9: CXCR4 Promotorfragment im Luciferase Reportervektor pGL4.14 (pGL4.14-CXCR4-Prom). https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl414-vector.pdf?rev=8a70ce538f95465a958e10a3c82db41d&la=en (modifiziert, 20.02.22).....	40
Abb. 10: CXCR4 Gelelektrophorese MSC und INA-6	46
Abb. 11: INA-6, relative CXCR4- und IGKC3-RNA-Expression in verschiedenen Ansätzen.	47
Abb. 12: MSC, relative CXCR4-RNA-Expression in verschiedenen Ansätzen	48
Abb. 13: INA-6, Immunzytologie CXCR4	49
Abb. 14: INA-6, Immunzytologie CXCR4, mit grünem Farbstoff gekoppelter sekundärer AK	49
Abb. 15: MSC, Immunzytologie CXCR4.....	50
Abb. 16: holotomographische Aufnahme MSC-MM-Interaktion	51
Abb. 17: INA-6-MSC-Kokultur mit starkem Färbeunterschied	51
Abb. 18: CXCR4-Markierung mit SDF1 α	52
Abb. 19: INA6, Viabilitäts- und Apoptosemessungen	55
Abb. 20: MM1S, Apoptose- und Proliferationsmessung	58
Abb. 21: Übersicht relevanter CXCR4-Promotor-Transkriptionsfaktor-Bindestellen	59
Abb. 22: CXCR4 Promotoraktivität in INA-6-Zellen. Gezeigt ist die Luciferase/Protein-Ratio	60
Abb. 23: CXCR4 Promotoraktivität in MM1S-Zellen. Gezeigt ist die Luciferase/Protein-Ratio	61
Abb. 24: INA-6, Luciferase/Protein-Ratio als Maß der erfolgreichen Herstellung stabiler Zellen	62
Abb. 25: INA-6, Stimulationsversuche pGL4.14-CXCR4-Promotorkonstrukt, Gesamtergebnis Luciferase/Protein-Ratio	64
Abb. 26: INA-6, Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Promotoraktivität [RLU/ μ g].....	65

Abb. 27: INA-6, Stimulationsversuche, Einfluss auf Promotoraktivität [RLU/ μ g]	65
Abb. 28: INA-6, Stimulationsversuche mit Etoposid, Einfluss auf Promotoraktivität [RLU/ μ g].....	66
Abb. 29: INA-6: Stimulationsversuche mit Dexamethason, Einfluss auf Promotoraktivität [RLU/ μ g]..	67
Abb. 30: Stimulationsversuche mit Bortezomib, Einfluss auf Promotoraktivität [RLU/ μ g]	67
Abb. 31: INA-6, WST-Assay 1, Einfluss von Bortezomib auf die Viabilität	68
Abb. 32: INA-6, WST-Assay 2, Einfluss von Etoposid auf die Viabilität	68
Abb. 33: INA-6, WST-Assay 3, Einfluss von Dexamethason auf die Viabilität	69
Abb. 34: MM1S, Stimulationsversuche CXCR4-pGI4.14-Promotorkonstrukt, Gesamtergebnis Luciferase/Protein-Ratio	70
Abb. 35: INA-6, Stimulationsversuche mit verschiedenen Chemotherapeutika, Messung der relativen Expression	71
Abb. 36: MM1S, Stimulationsversuche mit verschiedenen Chemotherapeutika, Messung der rel. Expression	72

V.3 Literaturübersicht

1. Zentrum für Krebsregisterdaten, RKI:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Multiples%20Myelom/multiple_myelom_node.html, 14.11.2020
2. Patienten-Handbuch Multiples Myelom, Nat. Centrum für Tumorerkrankungen Heidelberg, Universitätsklinikum Heidelberg, 2018
3. Silbermann R, Roodman GD. Myeloma bone disease: Pathophysiology and management. *J Bone Oncol.* 2013 Apr 18;2(2):59-69. doi: 10.1016/j.jbo.2013.04.001. PMID: 26909272; PMCID: PMC4723362.
4. Onkopedia. Leitlinie Multiples Myelom. [Online] Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.[Zitat vom: 23. 09 2020.]
file:///H:/Labor/Literatur/Multiples%20Myelom_Leitlinie%20%E2%80%94%20Onkopedia.html.
5. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and bone health outcomes: a systematic review and exploratory meta-analysis. Veronese N, Luchini C, Solmi M, Sergi G, Manzato E, Stubbs B. *J Bone Miner Metab.* 2018 Jan;36(1):128-132. doi: 10.1007/s00774-017-0817-8. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28243796
6. Bone disease in monoclonal gammopathy of undetermined significance: results from a screened population-based study. Thorsteinsdottir S, Lund SH, Lindqvist EK, Thordardottir M, Sigurdsson G, Costello R, Burton D, Steingrimsdottir H, Gudnason V, Eiriksdottir G, Siggeirsdottir K, Harris TB, Landgren O, Kristinsson SY. *Blood Adv.* 2017 Dec 21;1(27):2790-2798. doi: 10.1182/bloodadvances.2017010454. eCollection 2017 Dec 26.
7. Acquired Fanconi syndrome secondary to light chain deposition disease associated with monoclonal gammopathy of renal significance: A case report. Tu H, Mou L, Zhu L, Jiang Q, Gao DS, Hu Y. *Medicine (Baltimore).* 2018 Sep;97(36):e12027. doi: 10.1097/MD.00000000000012027. PMID: 30200082
8. Multiple Myeloma: 2018 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management, S. Vincent Rajkumar, *Am J Hematol*; 93(8): 981–1114. doi:10.1002/ajh.25117

9. Patienten-Handbuch Multiples Myelom, Nat. Centrum für Tumorerkrankungen Heidelberg, Universitätsklinikum Heidelberg, 2018, Seite 14
10. International myeloma foundation: <https://www.myeloma.org/international-staging-system-iss-revised-iss-r-iss>, <https://www.myeloma.org/durie-salmon-staging>, 14.11.2020
11. Multiple Myeloma, Version 2.2016: Clinical Practice Guidelines in Oncology, Kenneth C. et al., J Natl Compr Canc Netw. 2015 November; 13(11): 1398–1435
12. Therapy for Relapsed Multiple Myeloma: Guidelines From the Mayo Stratification for Myeloma and Risk-Adapted Therapy, Dingli et al., Mayo Clin Proc. 2017 April; 92(4): 578–598. doi:10.1016/j.mayocp.2017.01.003
13. Rodríguez-Lobato LG, Ganzetti M, Fernández de Larrea C, Hudecek M, Einsele H, Danhof S. CAR T-Cells in Multiple Myeloma: State of the Art and Future Directions. Front Oncol. 2020;10:1243. Published 2020 Jul 28. doi:10.3389/fonc.2020.01243
14. Endspurt Klinik Innere und Chirurgie, Skript 2, Blut, Blutbildung, Atmungssystem, George Thieme Verlag, 2. überarbeitete Auflage, S.60-63
15. Silbermann R, Roodman GD. Myeloma bone disease: Pathophysiology and management. J Bone Oncol. 2013 Apr 18;2(2):59-69. doi: 10.1016/j.jbo.2013.04.001. PMID: 26909272; PMCID: PMC4723362.
16. Hofbauer LC, Rachner TD, Coleman RE, Jakob F. Endocrine aspects of bone metastases. The lancet. Diabetes & Endocrinology. 2014 Jun;2(6):500-512. DOI: 10.1016/s2213-8587(13)70203-1
17. Multiple Myeloma and Bone: The Fatal Interaction, Silvia Marino and G. David Roodman, Cold Spring Harb Perspect Med 2018;8:a031286
18. Stopeck AT, Lipton A, Body JJ, Steger GG, Tonkin K, de Boer RH, Lichinitser M, Fujiwara Y, Yardley DA, Viniegra M, Fan M, Jiang Q, Dansey R, Jun S, Braun A. Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. J Clin Oncol. 2010 Dec 10;28(35):5132-9. doi: 10.1200/JCO.2010.29.7101. Epub 2010 Nov 8. PMID: 21060033.
19. Fernando RC, Mazzotti DR, Azevedo H, et al. Transcriptome Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Myeloma Patients Reveals Downregulation of Genes Involved in Cell Cycle Progression, Immune Response, and Bone Metabolism. Sci Rep. 2019;9(1):1056. Published 2019 Jan 31. doi:10.1038/s41598-018-38314-8
20. Dotterweich J, Tower RJ, Brandl A, et al. The KISS1 Receptor as an In Vivo Microenvironment Imaging Biomarker of Multiple Myeloma Bone Disease. PLoS One. 2016;11(5):e0155087. Published 2016 May 9. doi:10.1371/journal.pone.0155087
21. Ullah TR. The role of CXCR4 in multiple myeloma: Cells' journey from bone marrow to beyond. J Bone Oncol. 2019;17:100253. Published 2019 Jul 16. doi:10.1016/j.jbo.2019.100253
22. Kawaguchi N, Zhang TT, Nakanishi T. Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. Cells. 2019 Feb 20;8(2):185. doi: 10.3390/cells8020185. PMID: 30791675; PMCID: PMC6406665.
23. Pawig L, Klasen C, Weber C, Bernhagen J, Noels H. Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives. Front Immunol. 2015 Aug 21;6:429. doi: 10.3389/fimmu.2015.00429. PMID: 26347749; PMCID: PMC4543903.
24. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature. 1996 Aug 15;382(6592):635-8. doi: 10.1038/382635a0. PMID: 8757135.
25. Kircher M, Herhaus P, Schottelius M, et al. CXCR4-directed theranostics in oncology and inflammation. Ann Nucl Med. 2018;32(8):503-511. doi:10.1007/s12149-018-1290-8
26. Xiao T, Cai Y, Chen B. HIV-1 Entry and Membrane Fusion Inhibitors. Viruses. 2021 Apr 23;13(5):735. doi: 10.3390/v13050735. PMID: 33922579; PMCID: PMC8146413

43. Lapa et al., Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy, Supplementary information, BJH Vol. 184 Issue 3 Pages 440-443, Feb. 2019, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15096>
44. Dotterweich J, Tower RJ, Brandl A, et al. The KISS1 Receptor as an In Vivo Microenvironment Imaging Biomarker of Multiple Myeloma Bone Disease. PLoS One. 2016;11(5):e0155087. Published 2016 May 9. doi:10.1371/journal.pone.0155087
45. Lapa et al., Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy, BJH Vol. 184 Issue 3 Pages 440-443, Feb. 2019, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15096>
46. Prager P, Kunz M, Ebert R, Klein-Hitpass L, Sieker J, Barthel T, Jakob F, Konrads C, Steinert A. Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Anterior Cruciate Ligament: Characterization and Comparison of Cells from Young and Old Donors. Knee Surg Relat Res. 2018 Sep 1;30(3):193-205. doi: 10.5792/ksrr.17.067. PMID: 29554721; PMCID: PMC6122945.
47. Ziouti F, Ebert R, Rummler M, Krug M, Müller-Deubert S, Lüdemann M, Jakob F, Willie BM, Jundt F. NOTCH Signaling Is Activated through Mechanical Strain in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. Stem Cells Int. 2019 Feb 26;2019:5150634. doi: 10.1155/2019/5150634. PMID: 30936923; PMCID: PMC6413410.
48. Due to interleukin-6 type cytokine redundancy only glycoprotein 130 receptor blockade efficiently inhibits myeloma growth. Haematologica. 2017;102(2):381-390. doi:10.3324/haematol.2016.145060
49. Greenstein S, Krett NL, Kurosawa Y, Ma C, Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC, Rosen ST. Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. Exp Hematol. 2003 Apr;31(4):271-82. doi: 10.1016/s0301-472x(03)00023-7. PMID: 12691914.
50. Sola B, Renoir JM. Estrogenic or antiestrogenic therapies for multiple myeloma?. Mol Cancer. 2007;6:59. Published 2007 Sep 24. doi:10.1186/1476-4598-6-59
51. The biology of CCR5 and CXCR4. Alkhatib G. Curr Opin HIV AIDS. 2009 Mar;4(2):96-103. doi: 10.1097/COH.0b013e328324bbec. PMID: 19339947
52. Mezzapelle R, Leo M, Caprioglio F, Colley LS, Lamarca A, Sabatino L, Colantuoni V, Crippa MP, Bianchi ME. CXCR4/CXCL12 Activities in the Tumor Microenvironment and Implications for Tumor Immunotherapy. Cancers (Basel). 2022 May 6;14(9):2314. doi: 10.3390/cancers14092314. PMID: 35565443; PMCID: PMC9105267.
53. Regina Ebert, Peggy Benisch, Melanie Krug, Sabine Zeck, Jutta Meißner-Weigl, Andre Steinert, Martina Rauner, Lorenz Hofbauer, Franz Jakob, Acute phase serum amyloid A induces proinflammatory cytokines and mineralization via toll-like receptor 4 in mesenchymal stem cells, Stem Cell Research, Volume 15, Issue 1, 2015, Pages 231-239, ISSN 1873-5061, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.06.008>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506115000811>)
54. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Pfaffl MW. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886
55. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Nucleic Acids Res. 2002 May 1;30(9):e36. doi: 10.1093/nar/30.9.e36. PMID: 11972351
56. Mishra RK, Shum AK, Platanias LC, Miller RJ, Schiltz GE. Discovery and characterization of novel small-molecule CXCR4 receptor agonists and antagonists. Sci Rep. 2016;6:30155. Published 2016 Jul 26. doi:10.1038/srep30155
57. Lapa et al., Potential influence of concomitant chemotherapy on CXCR4 expression in receptor directed endoradiotherapy, BJH Vol. 184 Issue 3 Pages 440-443, Feb. 2019, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15096>

58. Liu N, Wang C, Wang L, Gao L, Cheng H, Tang G, Hu X, Wang J. Valproic acid enhances the antileukemic effect of cytarabine by triggering cell apoptosis. *Int J Mol Med*. 2016 Jun;37(6):1686-96. doi: 10.3892/ijmm.2016.2552. Epub 2016 Apr 8. PMID: 27082972.
59. Sakagami H, Hara Y, Shi H, et al. Change in Anticancer Drug Sensitivity During Neuronal Differentiation of PC12 Cells. *In Vivo*. 2018;32(4):765-770. doi:10.21873/invivo.11306
60. Steinbrunn T, Chatterjee M, Bargou RC, Stühmer T. Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation--an appraisal. *PLoS One*. 2014;9(6):e97443. Published 2014 Jun 5. doi:10.1371/journal.pone.0097443
61. Weng T, Koh CG. POPX2 phosphatase regulates apoptosis through the TAK1-IKK-NF- κ B pathway. *Cell Death Dis*. 2017 Sep 14;8(9):e3051. doi: 10.1038/cddis.2017.443. PMID: 28906490; PMCID: PMC5636987.
62. Steinbrunn T, Chatterjee M, Bargou RC, Stühmer T. Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation--an appraisal. *PLoS One*. 2014;9(6):e97443. Published 2014 Jun 5. doi:10.1371/journal.pone.0097443
63. Scott, K, Hayden, PJ, Will, A, Wheatley, K & Coyne, I 2016, 'Bortezomib for the treatment of multiple myeloma', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 4, CD010816. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010816.pub2>
64. Josting A, Reiser M, Wickramanayake PD, Rueffer U, Draube A, Söhngen D, Tesch H, Wolf J, Diehl V, Engert A. Dexamethasone, carmustine, etoposide, cytarabine, and melphalan (dexamethasone-BEAM) followed by high-dose chemotherapy and stem cell rescue--a highly effective regimen for patients with refractory or relapsed indolent lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2000 Mar;37(1-2):115-23. doi: 10.3109/10428190009057634. PMID: 10721775.
65. Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, et al. Polatuzumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2020;38(2):155-165. doi:10.1200/JCO.19.00172
66. Li F, Xue ZY, Yuan Y, et al. Upregulation of CXCR4 through promoter demethylation contributes to inflammatory hyperalgesia in rats. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2018 Oct;24(10):947-956. DOI: 10.1111/cns.12845. PMID: 29577638; PMCID: PMC6489799.
67. Weng T, Koh CG. POPX2 phosphatase regulates apoptosis through the TAK1-IKK-NF- κ B pathway. *Cell Death Dis*. 2017 Sep 14;8(9):e3051. doi: 10.1038/cddis.2017.443. PMID: 28906490; PMCID: PMC5636987.
68. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998 Apr;42(4):477-84. doi: 10.1136/gut.42.4.477. PMID: 9616307; PMCID: PMC1727068.

VSEV11	EV11-myeloid transforming protein	VSEV11.05	Ecotropic viral integration site 1 encoded factor, avian leukemia zinc finger domain	148	164	156	(+)	0.813	atgagtgATAcglat
VSRBP	PAR3/BDP family	VSRBP.01	PuG-type chicken vitellogenin promoter-binding protein	151	167	159	(+)	0.364	aaagatcGTAAlgca
VSGEB	cAMP responsive element binding proteins	VSGEB.01	c-EBP4, bZIP domain, transcriptional repressor	150	170	160	(+)	0.855	gaagagacGTAAlgcaagg
VSRBP	PAR3/BDP family	VSRBP_HLFE1	Thrombogenic embryonic factor / hepatic leukemia factor	152	166	160	(-)	0.832	ttgcaTTAcglatct
VSRBP	PAR3/BDP family	VSRBP.01	Albumin D-box binding protein	156	172	164	(+)	0.890	atagcTAATgcaagcc
VSGT1	Oxetane binding protein	VSGT1.02	Oxetane binding factor 1	160	174	167	(+)	0.864	gtatTCGagctgtg
VSRBP	Kruppel like transcription factors	VSRBP.F.01	Kidney-enriched kruppel-like factor, KLF15	172	190	181	(+)	0.560	ctgtagaaGGGgtaga
VSEBX	E-box binding factors	VSEBX.03	MVC associated factor X	177	193	185	(-)	0.361	agctCACccctct
VSEIF	GC-Box factors SPI/GC	VSEIF.01	Sp4 transcription factor	177	193	185	(+)	0.804	agaaggGGCGgagctt
VSGLF	Kruppel like transcription factors	VSGLF.01	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous, UKLF)	177	195	188	(+)	0.948	agaaggGGCGgagctt
VZTF	C2H2 zinc finger transcription factors 3	VZTF35C.01	KRAB-zinc finger protein system (KOD3)	184	194	189	(-)	0.918	aagctCCAGc
VSRBP	Nuclear factor kappa B/c-rel	VSRBP.01	c-Rel	185	199	192	(+)	0.916	ctgtaggTTCCTgaa
VSETF	Human and murine ETS1 factors	VSETF.01	ET4-like factor 1	184	204	194	(-)	0.887	gggttcGGAGctccagc
VSRBP	Interferon regulatory factors	VSRBP.F.03	Interferon regulatory factor 4	183	207	195	(+)	0.951	gggttaggctctGAAAccttc
VSETF	Human and murine ETS1 factors	VSETF.02	GA binding protein transcription factor, alpha	196	216	206	(-)	0.940	tggtgctGGAAgagtttg
VSEF1	Testis-specific BHLH-Zip transcription factors	VSEF1.01	Spermatogenic Zip 1 transcription factor	213	223	218	(-)	0.948	tggAGgggtt
VSGLF	Kruppel like transcription factors	VSGLF.01	Erythroid kruppel like factor (EKLF)	212	226	221	(-)	0.968	ctgtaggGGGgTgTg
VSRBP	Interferon regulatory factors	VSRBP.02	Interferon-activated response element	228	252	240	(-)	0.923	taaaaaaaGGAAcctcagg
VSRBP	AT rich interactive domain factor	VSRBP.HT.01	Bright, B cell regulator of Igh transcription	239	259	249	(-)	0.938	ctgATTAAAAaaaaaa
VSRBP	Homeodomain transcription factors	VSRBP.01	Hemipositively expressed homeobox, protein-rich homeodomain protein	240	254	248	(+)	0.947	ttttttTAActca
VSRBP	AT-binding transcription factor	VSRBP.F.01	AT-binding transcription factor	242	258	250	(+)	0.801	ttttttTAActca
VSRBP	Homeodomain transcription factors	VSRBP.01	Homeodomain proteins MSX-1 and MSX-2	244	262	253	(+)	0.977	ttttTAActcaaa
VSRBP	LIM homeodomain factors	VSRBP.L.02	LIM homeobox transcription factor 1, alpha	242	264	253	(+)	0.931	ttttTAActcaaa
VSRBP	NKX homeobox transcription factors	VSRBP.N.01	NKX homeobox 1	246	260	253	(+)	0.919	ttttTAActca
VSRBP	SV40/SP1 related nucleophosphoproteins with a RING finger DNA binding motif	VSRBP.RCA.01	SV40/SP1 related, multi-associated, actin-dependent regulator of chromatin, auxiliary a, member 3	257	267	262	(-)	0.974	tttCAATgta
VSRBP	Bim POU domain factors	VSRBP.01	POU domain transcription factor brain 4	254	272	263	(+)	0.962	ttctcaaatTAATata
VSRBP	PuG-type chicken vitellogenin promoter-binding protein	VSRBP.01	PuG-type chicken vitellogenin promoter-binding protein	255	271	263	(+)	0.863	ttctcaaatTAATata
VSRBP	AT rich interactive domain factor	VSRBP.SA.01	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	255	275	265	(-)	0.980	ttctcaATATcattctaga
VSRBP	Special AT-rich sequence binding protein 1, predominantly expressed in thymocytes, binds to matrix attachment regions (MARs)	VSRBP.S1.01	Special AT-rich sequence-binding protein 1, predominantly expressed in thymocytes, binds to matrix attachment regions (MARs)	260	274	267	(-)	0.980	tttTAActcaatt
VSRBP	Bim POU domain factors	VSRBP.01	Bim-2, POU-III protein class	261	279	270	(-)	0.969	tttTAActcaatt
VSRBP	Special AT-rich sequence binding protein 1, predominantly expressed in thymocytes, binds to matrix attachment regions (MARs)	VSRBP.S1.01	Special AT-rich sequence-binding protein 1, predominantly expressed in thymocytes, binds to matrix attachment regions (MARs)	263	277	270	(+)	0.952	tttTAActcaatt
VSRBP	SOX2/12 like factor determining and related H19 box factors	VSRBP.S1.01	SOX2/12 like factor determining and related H19 box factors	259	281	270	(-)	0.788	tttTAActcaatt
VSRBP	AT rich interactive domain factor	VSRBP.SA.01	AT rich interactive domain 5A (MRF1-like)	262	282	272	(+)	0.966	tttTAActcaatt
VSGT1	Oxetane binding protein	VSGT1.02	Oxetane binding factor 1	266	280	273	(+)	0.838	tttTAActcaatt
VSGLOX	CLOX and CLOX homology (CDP) factors	VSGLOX.01	Cut-like homeodomain protein	263	285	274	(-)	0.837	tttTAActcaatt

VSGLOX	CLOX and CLOX homology (CDP) factors	VSGLOX.01	Cut-like homeodomain protein	263	285	274	(-)	0.837	tttTAActcaatt
VSGI1	Growth factor independence transcriptional repressor	VSGI1.01	Growth factor independence 1 zinc finger protein GFI-1B	270	284	277	(-)	0.915	tttTAActcaatt
VSRBP	LEF1/TCF	VSRBP.L.04	TCF/LEF-1 (secondary DNA binding preference)	269	285	277	(-)	0.855	tttTAActcaatt
VSRBP	Paired box 7	VSRBP.P.01	Paired box 7 homeodomain-binding motif	271	289	279	(+)	0.886	tttTAActcaatt
VSRBP	Oncot homeodomain factor HNF6	VSRBP.H.02	Liver enriched Cut - 1 homeodomain transcription factor HNF6 (HNF1T)	271	287	279	(-)	0.969	tttTAActcaatt
VSGTA	GATA binding factors	VSGTA.02	GATA-binding factor 3	274	284	280	(-)	0.912	tttTAActcaatt
VSGTA	GATA binding factors	VSGTA.01	GATA binding factor	278	290	284	(-)	0.984	tttTAActcaatt
VSRBP	Bim-5 POU domain factors	VSRBP.03	Bim-5, POU-III protein class (also known as emb and CNS-1)	274	296	285	(-)	0.775	tttTAActcaatt
VSGLOX	CLOX and CLOX homology (CDP) factors	VSGLOX.01	Cytoplasmic polyadenylation homeobox	275	297	288	(+)	0.874	tttTAActcaatt
VSGART	Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	VSGART.02	Pho2a (ARX) and Pho2b	280	300	290	(-)	0.824	tttTAActcaatt
VSRBP	Paralog box genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	VSRBP.L.3.01	Hox-1, 3, vertebrate homeobox protein	282	300	291	(-)	0.843	tttTAActcaatt
VSRBP	Homeobox transcription factors	VSRBP.H.01	Homeodomain transcription factor Gsh-2	283	301	292	(-)	0.851	tttTAActcaatt
VSRBP	Lim homeodomain factors	VSRBP.L.01	Pancreatic and intestinal lim-homeodomain factor	282	304	293	(-)	0.833	tttTAActcaatt
VSRBP	Activator/repressor binding to transcription initiation site	VSRBP.L.01	REX1 transcription factor, zinc finger protein 42	284	305	295	(+)	0.925	tttTAActcaatt
VSRBP	Homeobox transcription factors	VSRBP.H.01	Homeobox transcription factor Gsh-1	287	305	296	(-)	0.859	tttTAActcaatt
VSRBP	Brachyury gene, mesoderm developmental factor	VSRBP.B.01	MAX gene associated, dimeric binding site	294	322	308	(-)	0.822	tttTAActcaatt
VSRBP	Signal transducer and activator of transcription 3	VSRBP.S.01	Signal transducer and activator of transcription 3	312	330	321	(-)	0.956	tttTAActcaatt
VSRBP	Nuclear factor kappa B/c-rel	VSRBP.KAPPA.02	NF-kappaB	318	332	325	(-)	0.836	tttTAActcaatt
VSRBP	Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	VSRBP.H.2.01	Huntington's disease gene regulatory region-binding protein 1 and 2 (SLC24A regulator and polyomavirus binding factor)	330	348	339	(+)	0.847	tttTAActcaatt
VSGOE	Sine oculis (SOX) homeodomain factors	VSGOE.01	Sine oculis homeobox homolog 1	348	354	347	(+)	0.866	tttTAActcaatt
VSGTA	GATA binding factors	VSGTA.02	GATA-binding factor 3	345	357	351	(-)	0.930	tttTAActcaatt
VSEV11	EV11-myeloid transforming protein	VSEV11.01	Ev-1 zinc finger protein, carboxy-terminal zinc finger domain	344	360	352	(-)	0.971	tttTAActcaatt
VSETF	Human and murine ETS1 factors	VSETF.02	v-ets avian erythroblastosis virus (26) oncogene homolog	346	366	356	(-)	0.963	tttTAActcaatt
VSTALE	TALE homeodomain class recognizing TG motifs	VSTALE.01	TG interacting factor belonging to TALE class of homeodomain factors	353	369	361	(+)	1.000	tttTAActcaatt
VSRBP	Positive regulatory domain 1 binding factor	VSRBP.P.02	PRD1 (positive regulatory domain 1 element) binding factor 1	361	379	370	(+)	0.950	tttTAActcaatt
VSEV11	EV11 myeloid transforming protein	VSEV11.01	MYE1 (MD18E-V1 like gene 1) DNA-binding domain 2	375	391	383	(+)	0.992	tttTAActcaatt
VSRBP	Mouse Kruppel like factor	VSRBP.M.02	Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	377	397	387	(+)	0.988	tttTAActcaatt
VSRBP	Hepatic Nuclear Factor 1	VSRBP.H.03	Hepatic nuclear factor 1	382	398	390	(-)	0.826	tttTAActcaatt
VSRBP	RXR heterodimer binding sites	VSRBP.RXR.01	Retinoic acid receptor / retinoid X receptor heterodimer, DR1 sites	379	403	391	(-)	0.883	tttTAActcaatt
VSRBP	Kruppel like transcription factors	VSRBP.K.02	Gli3-enriched Kruppel-like factor	384	402	393	(-)	0.960	tttTAActcaatt
VSRBP	Nuclear receptor subfamily 2 factors	VSRBP.N.01	ERBA-related pen-2, homodimer DR1 binding site	381	405	393	(-)	0.811	tttTAActcaatt
VSRBP	Peroxisome proliferator-activated receptor	VSRBP.P.02	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	384	409	395	(-)	0.858	tttTAActcaatt
VSRBP	Hepatic Nuclear Factor 1	VSRBP.H.04	Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (Tcf-1)	389	405	387	(-)	0.841	tttTAActcaatt
VSRBP	Paralog box genes 1-8 from the four hox clusters A, B, C, D	VSRBP.L.3.01	Hox-1, 3, vertebrate homeobox protein	385	413	404	(-)	0.853	tttTAActcaatt
VSRBP	Zinc transcriptional regulatory element	VSRBP.Z.01	5' half site of ZTRF motif	389	415	407	(-)	0.985	tttTAActcaatt
VZTF	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VZTF2.01	Zinc finger and BTB domain containing 7A, zfp188	389	421	410	(-)	0.926	tttTAActcaatt

VSHRB	AHR-ant heterodimers and AHR-related factors	VSHRB1.01	DRE (dioxin response elements), XRE (xenobiotic response elements) bound by AhR/AHRNT heterodimers	588	622	610	(-)	0.964	ggagcagcCGTggtgagaca
VSNRF1	Nuclear respiratory factor 1	VSNRF1.01	Nuclear respiratory factor 1 (NRF1), bZIP transcription factor that acts on nuclear genes encoding mitochondrial proteins	602	618	610	(-)	0.801	cgagCGCGGggtggt
VZNF15	C2H2 zinc finger transcription factors 15	VZNF15.01	Zinc finger and SCAN domain containing 10 (ZNF205, Zfp205)	602	618	610	(-)	0.816	cgagcagcTGCgtgpc
VSHLF	Vertebrate homologs of enhancer of split complex	VSHLF.01	Key like bHLH transcriptional repressor	604	618	611	(+)	0.966	gagcGACGcgctg
VZNF2F	Zf1 POZ domain zinc finger	VZNF2F.01	Zf1 POZ domain zinc finger, zinc finger protein 191	605	619	612	(+)	0.841	agcagCGCctctgg
VZNFRE	Calcium-response elements	VZNFRE.01	Calcium-response factor	612	622	617	(-)	0.942	ggacCGAGctg
VZNFCE	CTCF and BORIS gene family transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	VZNFCE.02	Insulator protein CTCF (COCT-binding factor)	623	649	636	(+)	0.771	cgactctctccagcGGGccctgg
VZNFCE	Members of ZfC-family, zinc finger protein of the cerebellum	VZNFCE.03	Zinc finger protein of the cerebellum (ZfC)	630	644	637	(+)	0.971	ctcgcGAGggcca
VSNRF5	Kruppel like transcription factors	VSNRF5.01	Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Kruppel-type zinc fingers (KLF5, ZF3)	636	654	645	(-)	0.898	gagcagGGGggccggt
VSNLF	GLI zinc finger family	VSNLF.02	GLI/Kruppel family member GLI3	638	654	646	(+)	0.966	cgccCGACcccgctgc
VSNLF	Kruppel like transcription factors	VSNLF.01	Erythroid Kruppel like factor (EKLf)	640	656	649	(-)	0.916	gtcgcagcggCGGTgpc
VZNF15	C2H2 zinc finger transcription factors 15	VZNF15.01	Zinc finger and SCAN domain containing 10 (ZNF205, Zfp205)	643	659	651	(+)	0.817	cgaccgctTCCgctg
VSNRF1	Nuclear respiratory factor 1	VSNRF1.02	Nuclear respiratory factor 1 (NRF1)	644	660	652	(-)	0.810	gcctCGCGgggggt
VSHNPF	Histone nuclear factor P	VSHNPF.01	Histone H4 transcription factor, MNF dimeric binding site	652	670	661	(+)	0.780	tgCGCGAgcagctgg
VSHSAT	Heat shock factors	VSHSAT.02	Heat shock factor 1	655	679	667	(-)	0.798	ggggggggCGAGcaactgctc
VSHBEE	X-box binding factors	VSHBEE.01	X-box binding protein BFX1	659	677	668	(-)	0.910	gggggggggGAGAAgpc
VSPRDM	PR (PRDM9-PRDM2) domain transcription factor	VSPRDM.01	PR domain zinc finger protein 4 (PRDM1)	658	686	672	(+)	0.753	cgtagTTTCggggccgcccactg
OSXCE	Adenoviral, mediator, and TBP-dependent core promoter element for RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters	OSXCE.01	X gene core promoter element 1	660	678	673	(-)	0.877	ggCGCGgggg
VSEZF	E2F-myc activator/cycle regulator	VSEZF.01	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding protein	665	681	675	(-)	0.989	gtggcCGCGggcaga
VSNCKK	Nucleoside diphosphate kinase	VSNCKK.01	INWERM23 nucleoside diphosphate kinase 1 and 2	665	681	675	(-)	0.936	gtCGCGcgggcaga
VSBED	BED subclass of zinc-finger proteins	VSBED.01	Zinc finger, BED-type containing 4, GC-box binding sites	667	681	674	(-)	0.969	gtgCGCGggcaga
VSNLF	Kruppel like transcription factors	VSNLF.01	Kruppel-like factor 5 (potealal)	668	683	674	(-)	0.885	gtgtgGGGggggcaga
VMAZF	Myc associated zinc fingers	VMAZF.01	Myc-associated zinc finger protein related transcription factor	668	680	674	(-)	0.930	tgggCGCGctg
VSPF2F	GC-Box factors SP1/OG	VSPF2F.01	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	667	683	675	(-)	0.912	gtgtgCGCGggcaga
VZNF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VZNF2.01	Zinc finger and BTB domain containing 7A, polaron	666	686	677	(+)	0.943	ctcgcCGCGggccactgct
VZNF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VZNF2.02	Transcriptional repressor, binds to elements found predominantly in genes that participate in lipid metabolism	671	683	682	(+)	0.776	ccggcCGCGAcagctctccc
VPLAS	Pleomorphic adenoma gene	VPLAS.01	Pleomorphic adenoma gene (PLAG), 1, a developmentally regulated C2H2 zinc finger protein	672	694	683	(-)	0.887	cgCGCGgggggggggggg
VSGRNF	ESR/nerve growth factor induced protein C & related factors	VSGRNF.01	Wilms Tumor Suppressor	670	697	688	(-)	0.961	ggggggggGAGgaggtg
VSGRNF	ESR/nerve growth factor induced protein C & related factors	VSGRNF.01	Wilms Tumor Suppressor	681	699	680	(-)	0.982	tgagCGCGgggggggg
VSEZF	E2F-myc activator/cycle regulator	VSEZF.01	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding protein	684	700	692	(-)	0.983	gtggcCGCGggggcaga
VSNCKK	Nucleoside diphosphate kinase	VSNCKK.01	INWERM23 nucleoside diphosphate kinase 1 and 2	684	700	692	(-)	0.938	gtCGCGgggggggg
VZNF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VZNF2.01	Zinc finger transcription factor ZBP-49	681	703	692	(+)	0.945	cactcgtCCCGcccccacca
VSBED	BED subclass of zinc-finger proteins	VSBED.01	Zinc finger, BED-type containing 4, GC-box binding sites	686	700	693	(-)	0.969	gtgCGCGggggcaga
VSNLF	Kruppel like transcription factors	VSNLF.02	Kruppel-like factor 3 (bsnc)	404	422	413	(+)	0.992	cttggGAGGgggtctgg
VMAZF	Myc associated zinc fingers	VMAZF.01	Myc-associated zinc finger protein related transcription factor	407	419	413	(+)	0.984	tgaggCGCGctc
VZNFRE	Zinc transcriptional regulatory element	VZNFRE.04	3' half site of ZfRE motif	407	423	415	(+)	0.901	tgCGAGggggcccaga
VSNLF	Pleomorphic adenoma gene	VSNLF.01	Pleomorphic adenoma gene-like 1 (secondary DNA binding preference)	409	431	420	(+)	0.825	gggCGCGGcccgagacaggggg
VSMAD	Vertebrate SMAD family of transcription factors	VSMAD.01	Smad3 transcription factor involved in TGF-beta signaling factor P1, 1	417	427	422	(-)	0.879	ttGTCTggga
VSGGMF	Chloro-specific transcription factors with a GCN DNA binding domain	VSGGMF.01	Glut cells missing homolog 1 (secondary DNA binding preference)	422	436	429	(-)	0.832	cttaccCGCGctc
VSNRY	SOX/CFE1-like/delta determining and related HMG box factors	VSNRY.01	SRY (sex determining region Y) box 6	418	440	429	(+)	0.987	ctccagACAAggggtaagctat
VSPAF	API, Activating protein 1	VSPAF.01	Transcription factor Jun-B	430	442	436	(+)	0.916	gggttactGTCTgpc
VSNLF	Pleomorphic adenoma gene	VSNLF.02	Pleomorphic adenoma gene 1	426	448	437	(+)	1.000	aaGGGGgggagctatgctctgta
VSMOZF	Mouse Kruppel like factor	VSMOZF.01	Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (human)	450	470	460	(-)	0.986	ggggggggggcCTTctt
VSHAT	Heat shock factors	VSHAT.01	Heat shock factor 2	469	493	481	(+)	0.694	ggaactctctgGAGcctccggt
VSHAT	Heat shock factors	VSHAT.02	Heat shock factor 1	474	496	486	(-)	0.828	ctttactgaggtgCGAGgagta
VSHAT	Heat shock factors	VSHAT.03	Heat shock factor 1	478	502	490	(-)	0.804	gaaactactctgaggtgTTCGaga
VSMOZF	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	VSMOZF.01	Homeodomain transcription factor MOXC13	484	500	492	(+)	0.916	acactctagTAAAGtr
VSHHD	Fork head domain factors	VSHHD.01	Forkhead box protein A1, hepatocyte nuclear factor 3-alpha (HNF3-alpha)	482	508	500	(-)	0.950	aaagagAAAGcttacc
VSHOME	Homeodomain transcription factors	VSHOME.01	Hmox2/Hmox2-5 homeodomain transcription factor	491	508	500	(-)	0.846	aaaagagpGAAAGcttacc
VSHAT	Nuclear factor of activated T-cells	VSHAT.01	Nuclear factor of activated T-cells	491	509	506	(-)	0.984	aaaagagGAAAGcttacc
VSHAT	Human and murine ETS1 factors	VSHAT.02	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog	491	511	501	(-)	0.945	tcaagagGGAAGcttacc
VSHAT	LEF1/TCF	VSHAT.03	HMG box transcription factor Tcf7l1 (TCF3)	501	517	509	(-)	0.896	tatctCAAAAgagga
VSMTF	Metal induced transcription factor	VSMTF.01	Metal-regulatory transcription factor 1	524	530	531	(-)	0.800	ctctaccACAGcttc
VNDICE	Downstream Immunoglobulin Control Element, critical for B cell activity and specificity	VNDICE.01	Downstream Immunoglobulin Control Element, interstitial factor, BEN (also termed Mus TRD1 and VBSCT1)	528	542	538	(-)	0.870	tttactCTCAcag
VSNAP	TGF-beta induced apoptosis proteins	VSNAP.01	Cysteine serine-rich nuclear protein 1 (AXUD1, ADR11 up-regulated 1)	535	541	536	(+)	1.000	AGAGctc
VSNAP	MAF and AP1 related factors	VSNAP.01	Lens-specific MatMafL sites	532	556	544	(-)	0.824	ggggggggggcTGCcttacc
VSMAD	Vertebrate SMAD family of transcription factors	VSMAD.01	Smad3 transcription factor involved in TGF-beta signaling	540	550	545	(-)	0.904	gcaGTCTggpc
VSNAP	MAF and AP1 related factors	VSNAP.02	Binding sites for homodimers of large Maf-proteins	534	558	546	(+)	0.917	tgagggcagctgGGAaccttc
VSNAP	Selenocysteine tRNA activating factor	VSNAP.01	Se-Cys tRNA gene transcription activating factor	532	562	547	(-)	0.910	ggggggggggggCGAGcttacc
VSNAP	THAP domain containing protein	VSNAP.01	THAP domain containing, apoptosis associated protein	542	552	547	(-)	0.953	agctgGGCAa
VSNAP	Nuclear factor kappa B/c-rel	VSNAP.01	NF-kappaB	544	550	551	(-)	0.943	ggGGGggggggcaga
VMAZF	Myc associated zinc fingers	VMAZF.01	Myc associated zinc finger protein (MAZ)	555	587	581	(-)	0.984	tccCGAGGaggg
VSGGMF	Chloro-specific transcription factors with a GCN DNA binding domain	VSGGMF.01	Glut cells missing homolog 1 (secondary DNA binding preference)	575	589	582	(-)	0.854	ggggCGCGcttc
VSHAF	HIF-1 ancillary sequence family	VSHAF.01	HIF-1 ancillary sequence	592	602	597	(-)	0.921	ctgcCACGcttc
VSEZF	E2F-myc activator/cycle regulator	VSEZF.01	E2F 4/DP-1 heterodimeric complex	594	610	602	(-)	0.863	gtggcCGCGggcaga
VZNFRE	Zinc finger BED domain-containing protein	VZNFRE.01	Zinc finger, BED-type containing 1	596	608	602	(-)	0.816	gtgtCGCGctcag
VSHRE	BTB/POZ (broad complex, TramTrack, Eic-3, Zeste-1) and zinc fingers transcription factor	VSHRE.01	Transcription factor Kaiso, ZBTB33	596	610	603	(+)	0.812	gtgtCGCGctcag
VZNFRE	Zinc finger BED domain-containing protein	VZNFRE.02	Zinc finger, BED-type containing 1	597	609	603	(-)	0.893	gtTGTGgagcaga
VSNRF1	Nuclear respiratory factor 1	VSNRF1.02	Nuclear respiratory factor 1 (NRF1)	601	617	609	(+)	0.963	tgagCGAGcttacc

VSMZP	Myc associated zinc fingers	VSMZP.01	Myc-associated zinc finger protein related transcription factor	687	686	683	(-)	0.941	tgppgGCGGg
VSTCF	CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	VSTCF.01	COCTC-binding factor	681	707	684	(-)	0.903	agactggtggggggGGGgpgpssdgtg
VSPF1	GC-Box factors SP1/OC	VSPF1.03	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	686	702	694	(-)	0.976	gggggGCGGgpgp
VSGGF1	Transcriptional repressor GC-binding factor 2	VSGGF1.01	Leucine rich repeat (in FLU) interacting protein 1	686	704	695	(+)	0.912	gGCGCCGCGaccaccag
VSZF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VSZF2.19.01	Kruppel-like zinc finger protein 219	684	706	695	(+)	0.997	tgpgGCCCGCGaccaccagtc
VSEZF	CP2-erythrocyte Factor related to drosophila E74	VSEZF.01	CP2	688	706	697	(-)	0.962	gGCTCGggggggggggg
VSMI4	Insulinoma associated factors	VSMI4.01	Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IAI-1) functions as a transcriptional repressor	681	703	697	(-)	0.903	tgppGCGGg
VSMI3	Nucleoside diphosphate kinase	VSMI3.01	NME1/M23 nucleoside diphosphate kinase 1 and 2	689	705	697	(-)	0.951	actTGGggggggggggg
VSKLF5	Kruppel like transcription factors	VSKLF5.01	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	680	707	688	(-)	0.963	agactGGTggggggggggg
VMAZP	Myc associated zinc fingers	VMAZP.01	Myc-associated zinc finger protein related transcription factor	692	704	699	(+)	0.958	ctgggTGGGcg
VSMI2	Spalt like transcription factor 2	VSMI2.01	Zinc finger protein Spalt-2, sal-like 2, p150(sal2)	684	704	699	(-)	0.954	ctgggTGGGcg
VSPF2	GC-Box factors SP1/OC	VSPF2.01	GC box elements	691	707	699	(-)	0.919	agactGGTggggggggggg
VSLIE	GLI zinc finger family	VSLIE.02	GLI-Kruppel family member GLI3	693	709	701	(+)	0.882	cgactCCAGaccagctctc
VSZF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VSZF2.AN3.01	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	680	712	701	(+)	1.000	cccgGCCCGaccagctctctg
VSEZF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	VSEZF.03	E2F involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	702	718	710	(-)	0.871	ctgggGCCCGaccagctctg
GTATB	RNA polymerase II transcription factor II B	GTATB.01	Transcription factor II B (TFIIB) recognition element	708	714	711	(+)	1.000	ggcGCC
VHMRP	Huntington's disease gene regulatory region binding proteins	VHMRP.1.2.01	Huntington's disease gene regulatory region-binding protein 1 and 2 (JLCC4 regulator and Jagolin-related binding factor)	704	722	713	(-)	0.856	ttactGGGCGaccagctctc
VTCAP2	Activator protein 2	VTCAP2.01	Transcription factor AP-2, alpha	709	723	718	(+)	0.956	ctgggTGGGcg
VTCAP1	Activator protein 2	VTCAP1.01	Transcription factor AP-2, alpha	709	723	716	(-)	0.939	ctgggTGGGcg
VSEZF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	VSEZF.02	E2F transcription factor 7	711	727	719	(+)	0.872	ctgggTGGGcg
VSEZ1	Testis-specific BHLH-Zip transcription factors	VSEZ1.01	Spermatogenic Zip 1 transcription factor	714	724	719	(+)	0.849	ctgggTGGGcg
VSETF	Human and murine ETS1 factors	VSETF.02	GA binding protein transcription factor, alpha	711	731	721	(+)	0.905	ctgggTGGGcg
VSTRE	BTB/POZ (pozd complex, TramTrack, Ets-like, heterodimer visitors and zinc fingers) transcription factor	VSTRE.02	Transcription factor Kaiso, ZBTB33	721	735	728	(-)	0.874	ccccCGCCaccctt
VSEZF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	VSEZF.PE1.01	E2F-4/DP-1 heterodimeric complex	720	736	728	(-)	0.842	ccccCGCCaccctt
VSEZF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	VSEZF.03	E2F involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	721	737	729	(-)	0.855	ctgggTGGGcg
VSEBE	RXR heterodimer binding sites	VSEBE.RXR.05	Epigallocatechin gallate binding site of RXR/RXR heterodimers, DR4 sites	717	741	729	(+)	0.803	ggggGAAgpgggggggggggggggg
VSMI1	Myoid zinc finger 1 factors	VSMI1.02	Myoid zinc finger protein 142F1	731	741	736	(+)	0.965	gggGGGgggg
VSMI5	Pleomorphic adenoma gene	VSMI5.01	Pleomorphic adenoma gene 1	730	752	741	(+)	1.000	gGCGGggaagcagctggggc
VSEZF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	VSEZF.01	E2F transcription factor 2	743	759	751	(-)	0.905	ctgggTGGGcg
VSEZF	E2F POZ domain zinc finger	VSEZF.01	Zinc finger / POZ domain transcription factor	744	758	751	(-)	0.950	gtgggGCCCGaccagca
VSEZF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	VSEZF.01	E2F transcription factor 2	744	760	752	(+)	0.889	gtgggGCCCGaccagca
VSEZF	ZF5 POZ domain zinc finger	VSEZF.01	Zinc finger / POZ domain transcription factor	745	759	752	(-)	0.965	gtgggGCCCGaccagca
VSEZF	ZF5 POZ domain zinc finger	VSEZF.01	Zinc finger / POZ domain transcription factor	748	760	753	(-)	0.991	ctgggTGGGcg
VSKLF5	Kruppel like transcription factors	VSKLF5.01	Kruppel-like factor 12 (AP-2rel)	747	765	756	(-)	0.962	gtgggTGGGcg
VSZF11	C2H2 zinc finger transcription factors 11	VSZF11.01	Zinc finger and BTB domain containing 2	768	778	771	(+)	0.967	ctggTGGGcg

VVULL1	multifunctional protein involved in transcriptional and translational regulation, mRNA splicing, DNA replication and repair	VVULL1.01	Y box binding protein 1, has a preference for binding GCNA	766	776	772	(-)	0.923	cgactTGGGcg
VHMRP	Homeodomain-leucine zipper transcription factors	VHMRP.01	Homeobox and leucine zipper encoding transcription factor	776	780	783	(+)	0.854	ctgggTGGGcg
GVATB	Vertebrate TATA binding protein factor	GVATB.01	Muscle TATA box	770	794	786	(-)	0.957	actTAAAGaccctt
VHMRP	Homeodomain transcription factors	VHMRP.02	Homeobox 2/3 homeodomain transcription factor	781	789	790	(+)	0.880	ctgggTGGGcg
GVATB	Vertebrate TATA binding protein factor	GVATB.01	Muscle TATA box	783	799	791	(+)	0.844	ctgggTGGGcg
VICREB	cAMP responsive element binding proteins	VICREB.02	Tau/CREB complex	790	810	800	(+)	0.740	actTGTCCaccaccctt
VSGR2	EGFR/nerve growth factor induced protein C & related factors	VSGR2.01	Wilms Tumor Suppressor	791	809	800	(-)	0.988	gggggTGGGcg
VSEBE	RXR heterodimer binding sites	VSEBE.01	Retinoid X receptor alpha homodimer, DR1 sites	788	812	800	(-)	0.831	gggggTGGGcg
VSMI3	Nucleoside diphosphate kinase	VSMI3.01	NME1/M23 nucleoside diphosphate kinase 1 and 2	794	802	800	(-)	0.920	gggggTGGGcg
VSEBE	BED subfamilies of zinc-finger proteins	VSEBE.02	Zinc finger, BED-type containing 4, polyG binding sites	799	810	803	(-)	0.928	gggggTGGGcg
VSEBR	Estrogen-related receptors	VSEBR.02	Estrogen-related receptor alpha (secondary DNA binding preference)	792	814	803	(-)	0.929	gggggTGGGcg
VSLIE	GLI zinc finger family	VSLIE.02	GLI3 family zinc finger 2	795	811	803	(+)	0.918	ctgggTGGGcg
VSKLF5	Kruppel like transcription factors	VSKLF5.01	Kruppel-like factor 2 (lung) (KLF2)	794	812	803	(-)	0.991	ctgggTGGGcg
VMAZP	Myc associated zinc fingers	VMAZP.01	Myc-associated zinc finger protein related transcription factor	797	809	803	(-)	0.963	gggggTGGGcg
VSGR2	EGFR/nerve growth factor induced protein C & related factors	VSGR2.02	Egr-2/kras-20 early growth response gene protein	795	813	804	(-)	0.937	gggggTGGGcg
VSMI2	Spalt-like transcription factor 2	VSMI2.01	Zinc finger protein Spalt-2, sal-like 2, p150(sal2)	799	809	804	(-)	0.972	ggggTGGGcg
VSPF1	GC-Box factors SP1/OC	VSPF1.01	GC box elements	796	812	804	(-)	0.908	ctgggTGGGcg
VSKLF5	Kruppel like transcription factors	VSKLF5.01	Gut-enriched Kruppel-like factor / KLF4	796	814	805	(-)	0.982	gggggTGGGcg
VSGR2	EGFR/nerve growth factor induced protein C & related factors	VSGR2.01	Wilms Tumor Suppressor	797	815	806	(-)	0.962	ctgggTGGGcg
VSZF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VSZF2.AN3.01	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	795	817	806	(+)	1.000	ctgggTGGGcg
VSEBE	Ras-responsive element binding protein	VSEBE.01	Ras-responsive element binding protein 1	800	814	807	(+)	0.824	ccccCGCCaccctt
VSKLF5	Kruppel like transcription factors	VSKLF5.01	Kidney-enriched Kruppel-like factor, KLF15	799	817	808	(-)	0.939	gggggTGGGcg
VSZF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VSZF2.19.01	Zinc finger transcription factor ZFP-59	797	819	808	(-)	0.978	gggggTGGGcg
VSEBE	BED subfamilies of zinc-finger proteins	VSEBE.02	Zinc finger, BED-type containing 4, polyG binding sites	802	819	809	(-)	0.927	gggggTGGGcg
VSTCF	CTCF and BORIS gene family, transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	VSTCF.01	COCTC-binding factor	797	823	810	(-)	0.942	gggggTGGGcg
VSZF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VSZF2.19.01	Kruppel-like zinc finger protein 219	800	822	811	(+)	0.951	ccccCGCCaccctt
VSEBE	Ras-responsive element binding protein	VSEBE.01	Ras-responsive element binding protein 1	800	820	813	(+)	0.856	ccccCGCCaccctt
VSEBE	BED subfamilies of zinc-finger proteins	VSEBE.01	Zinc finger, BED-type containing 4, GC-box binding sites	807	821	814	(-)	0.964	gggggTGGGcg
VSPF1	GC-Box factors SP1/OC	VSPF1.02	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	807	823	815	(-)	0.949	gggggTGGGcg
VSKLF5	Kruppel like transcription factors	VSKLF5.01	Core promoter-binding protein (CPEP) with 3 Kruppel-type zinc fingers (KLF6, 2F9)	807	825	818	(+)	0.991	ctgggTGGGcg
VSGR2	EGFR/nerve growth factor induced protein C & related factors	VSGR2.01	EGR1, early growth response 1	808	829	817	(-)	0.883	ctgggTGGGcg
VSTRE	Zinc transcriptional regulatory element	VSTRE.04	3' half site of ZTRE motif	809	825	817	(-)	0.940	ctgggTGGGcg
VSEZF	E2F-myc activator/cell cycle regulator	VSEZF.01	E2F transcription factor 1	810	826	818	(-)	0.968	ctgggTGGGcg
VSMI3	Nucleoside diphosphate kinase	VSMI3.01	NME1/M23 nucleoside diphosphate kinase 1 and 2	810	826	818	(-)	0.960	actTGGGcg
VSKLF5	Kruppel like transcription factors	VSKLF5.01	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	810	828	819	(-)	0.961	gggggTGGGcg
VMAZP	Myc associated zinc fingers	VMAZP.01	Myc associated zinc finger protein (MAZ)	813	828	818	(-)	0.987	ctggTGGGcg

Human zinc finger protein family									
VZNF10	C2H2 zinc finger transcription factor 10	VZNF10.01	IRF domain zinc finger protein 14	1164	1170	1171	(-)	0.912	aaTTAGGccagct
VZNF22	E2F-1 myc activator cell cycle regulator	VZNF22.02	E2F involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	1164	1180	1172	(+)	0.844	atgggagcTAAAtac
VZNF23	Paralog fox genes 1-6 from the four fox clusters A, B, C, D	VZNF23.01	Hox-1.3, vertebrate homeobox protein	1166	1194	1175	(-)	0.845	agaggTAAATggagcca
VZNF24	Lim homeodomain factors	VZNF24.01	Pancreatic and intestinal lim homeodomain factor	1166	1180	1177	(-)	0.852	ttatagagTAAATggagcca
VZNF25	Paralog fox genes 1-6 from the four fox clusters A, B, C, D	VZNF25.01	Homeobox C8 / Hox-2alpha	1169	1187	1178	(+)	0.851	tgctatagTAAATggagcca
VZNF26	Homeobox transcription factors	VZNF26.01	Homeobox transcription factor Gsh-1	1171	1189	1180	(-)	0.893	atataagagTAAATggagcca
VZNF27	Bin POU domain factors	VZNF27.01	Bin-2, POU-II protein class	1174	1183	1183	(-)	0.875	ttATATagagagTAAATggagcca
VZNF28	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	VZNF28.01	Homeodomain transcription factor HDAC13	1180	1196	1188	(+)	0.925	ctctctataTAAAGcct
VZNF29	Octamer binding protein	VZNF29.01	Octamer binding transcription factor 1, POU class 2 homeobox 1 (POU2F1)	1183	1197	1190	(-)	0.859	ttatgTAAATggagcca
VZNF30	Special AT-rich sequence binding protein	VZNF30.01	Special AT-rich sequence binding protein 1, predominantly expressed in thymocytes, binds to matrix attachment regions (MARs)	1184	1198	1191	(+)	0.954	tAAATAAagagTAAATggagcca
VZNF31	MYT1 C2HC zinc finger protein	VZNF31.01	Myt1 zinc finger transcription factor involved in primary neurogenesis	1181	1203	1197	(-)	0.799	taaAAGTAgctt
VZNF32	SV40/HPV related nucleoproteins with a RING finger DNA binding motif	VZNF32.01	SV40/HPV related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 3	1193	1203	1196	(+)	0.993	gttTACTTta
VZNF33	Bin POU domain factors	VZNF33.01	Bin-2, POU-II protein class	1192	1210	1201	(-)	0.888	attATCctaaagagTAAATggagcca
VZNF34	miRNA-activating protein complex	VZNF34.01	Tripartite sequence element (TPE) of RNA polymerase II transcribed genes	1192	1210	1201	(-)	0.795	ttatgTAAATggagcca
VZNF35	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	VZNF35.01	Homeobox C13 / Hox-2gamma	1195	1211	1203	(-)	0.842	ttatgTAAATggagcca
VZNF36	GATA binding factors	VZNF36.01	GATA-binding factor 3	1201	1213	1207	(-)	0.816	tttgGATAttaa
VZNF37	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	VZNF37.01	Homeodomain transcription factor HDX13	1201	1217	1209	(+)	0.913	ttgagataTAAAGcct
VZNF38	Bin-5 POU domain factors	VZNF38.01	Bin-5, POU-VI protein class (also known as emb and CHS-1)	1199	1221	1210	(-)	0.800	aatagTctTAAATggagcca
VZNF39	Vertebrate caudal related homeodomain protein	VZNF39.01	Caudal type homeobox transcription factor 2	1202	1220	1211	(-)	0.809	atagTctTAAATggagcca
VZNF40	Paralog fox genes 1-6 from the four fox clusters A, B, C, D	VZNF40.01	Hox-1.3, vertebrate homeobox protein	1202	1220	1211	(+)	0.828	ttggTAAATggagcca
VZNF41	Octamer binding protein	VZNF41.01	Octamer binding transcription factor-1, POU class 2 homeobox 1 (POU2F1)	1204	1218	1211	(-)	0.856	aggtTAAATggagcca
VZNF42	C2H2 zinc finger transcription factors 3	VZNF42.01	Zinc finger protein 217	1210	1222	1216	(-)	0.927	GAATAgcttta
VZNF43	Bin-5 POU domain factors	VZNF43.01	Bin-5, POU-VI protein class (also known as emb and CHS-1)	1206	1228	1217	(+)	0.776	attAATaaagcctTAAATggagcca
VZNF44	Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	VZNF44.01	Intein-specific homeobox	1215	1235	1226	(-)	0.913	gtaacGATTAAGcct
VZNF45	Homeobox transcription factors	VZNF45.01	Gastrulation brain homeobox 1	1218	1236	1227	(-)	0.880	ggtaaacGATTAAGcct
VZNF46	CCAAT binding factors	VZNF46.01	Nuclear factor Y (Y-box binding factor)	1221	1235	1228	(-)	0.924	gtaacGATTAAGcct
VZNF47	Homeobox transcription factors	VZNF47.01	Gastrulation brain homeobox 2	1219	1237	1228	(+)	0.845	atggagGATTAAGcct
VZNF48	Homeobox transcription factors	VZNF48.01	BARX homeobox 1	1219	1237	1228	(-)	0.917	cggtaacGATTAAGcct
VZNF49	Lim homeodomain factors	VZNF49.01	LM homeobox 8	1217	1239	1228	(-)	0.814	agggtaaacGATTAAGcct
VZNF50	Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	VZNF50.01	Intein-specific homeobox	1220	1240	1230	(+)	0.918	ttggGATTAAGcct
VZNF51	Hepatic Nuclear Factor 1	VZNF51.01	Hepaticocyte nuclear factor 1 beta (HNF1B)	1223	1251	1251	(+)	0.801	ggagTAAATggagcca
VZNF52	E2F-1 myc activator cell cycle regulator	VZNF52.01	E2F-4/DP-2 heterodimeric complex	1227	1243	1235	(-)	0.836	taataGCGTAAATggagcca
VZNF53	NKX homeodomain factors	VZNF53.01	Homeo domain factor Nkx-2.5/Csx, liman homolog for affinity sites	1236	1248	1239	(-)	0.807	ttcTAAATggagcca
VZNF54	CoatII Enhancer Binding Protein	VZNF54.01	CCAAT/enhancer binding protein beta	1237	1251	1244	(+)	0.960	gtcttGATTAAGcct
VZNF55	PAI-1/ZIP family	VZNF55.01	Albumin D-box binding protein	1236	1252	1244	(+)	0.926	cggtTAAATggagcca

VZNF56	Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	VZNF56.01	Mu1 homeobox-like 1	1236	1256	1249	(-)	0.884	cttagTAAATggagcca
VZNF57	C2H2 zinc finger transcription factors 5	VZNF57.01	Zinc finger protein 410	1239	1253	1249	(+)	0.751	ttTATGaaact
VZNF58	Paralog fox genes 1-6 from the four fox clusters A, B, C, D	VZNF58.01	Homeobox B6 / Hox2beta	1238	1256	1247	(-)	0.864	cttagTAAATggagcca
VZNF59	Homeobox transcription factors	VZNF59.01	Mesenchyme homeobox 1	1240	1258	1249	(+)	0.850	attatgaaTAAATggagcca
VZNF60	Paralog fox genes 1-6 from the four fox clusters A, B, C, D	VZNF60.01	Homeobox B6 / Hox2beta	1241	1259	1250	(+)	0.836	gttagTAAATggagcca
VZNF61	Distal-less homeodomain transcription factors	VZNF61.01	Distal-less 3 homeodomain transcription factor	1242	1260	1251	(-)	0.910	atggctagTAAATggagcca
VZNF62	AT-binding transcription factor	VZNF62.01	AT-binding transcription factor 1	1244	1260	1252	(-)	0.790	atggctagTAAATggagcca
VZNF63	Homeobox transcription factors	VZNF63.01	Homeobox transcription factor Gsh-1	1243	1261	1252	(-)	0.854	ttgtctagTAAATggagcca
VZNF64	Trypt subfamily of class B bHLH transcription factors	VZNF64.01	Tal, Hox/Arb homeodomain	1262	1282	1272	(-)	0.846	cgctgTAAATggagcca
VZNF65	Localized tandem sequence motif	VZNF65.01	LTSM elements with 8 bp spacer	1265	1279	1272	(-)	0.924	ATCTcaatatt
VZNF66	RPS6 (ZFP35) zinc finger protein	VZNF66.01	Zinc finger protein RPS6 (ZFP35), associated preferentially with heterochromatin	1266	1278	1272	(+)	0.847	ttcCATCgctc
VZNF67	Pancreas transcription factor 1, heterotrimeric transcription factor	VZNF67.01	PTF1 binding sites are bipartite with an E-box and a TC-box (RSP-AT1) spaced one helical turn apart	1268	1286	1279	(+)	0.777	taataGCTGatagctcaga
VZNF68	PREB core-binding element	VZNF68.01	Protein regulatory element-binding protein	1272	1286	1279	(+)	0.842	ttgtTCGctcaga
VZNF69	Heat shock factors	VZNF69.01	Heat shock factor 1	1268	1282	1280	(+)	0.930	ttcatctgctcaga
VZNF70	Heat shock factors	VZNF70.01	Heat shock factor 1	1274	1290	1286	(+)	0.877	ttcatctgctcaga
VZNF71	NKX homeodomain factors	VZNF71.01	Homeo domain factor Nkx-2.5/Csx, liman homolog for affinity sites	1279	1287	1280	(-)	0.851	ttgtcTAAATggagcca
VZNF72	PAI-1/ZIP family	VZNF72.01	Albumin D-box binding protein	1283	1301	1293	(+)	0.895	cggaTAAATggagcca
VZNF73	Octamer binding protein	VZNF73.01	Octamer-binding factor 1	1269	1303	1296	(-)	0.825	attATGccaaact
VZNF74	Signal transducer and activator of transcription	VZNF74.01	STAT6, signal transducer and activator of transcription 6	1302	1320	1311	(-)	0.892	ttctTCGagagagctg
VZNF75	Bin-5 POU domain factors	VZNF75.01	Bin-5, POU-VI protein class (also known as emb and CHS-1)	1310	1332	1321	(-)	0.819	attAATggagcca
VZNF76	AT-binding transcription factor	VZNF76.01	AT-binding transcription factor 1	1317	1333	1325	(+)	0.811	agttctcTAAATggagcca
VZNF77	Cart-1 (cartilage homeoprotein 1)	VZNF77.01	Binding site for SO type homeodomains	1316	1336	1326	(-)	0.997	ggagaTAAATggagcca
VZNF78	Distal-less homeodomain transcription factors	VZNF78.01	Distal-less homeobox 2	1317	1335	1326	(+)	0.962	agttctcTAAATggagcca
VZNF79	Pancreatic and intestinal homeodomain transcription factor	VZNF79.01	Insulin promoter factor 1, pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1)	1317	1335	1326	(-)	0.930	agttctcTAAATggagcca
VZNF80	Paralog fox genes 1-6 from the four fox clusters A, B, C, D	VZNF80.01	Homeobox A3	1318	1336	1327	(-)	0.977	cgtagTAAATggagcca
VZNF81	Localized tandem sequence motif	VZNF81.01	LTSM elements with 8 bp spacer	1320	1334	1327	(-)	0.860	ATCTcaatatt
VZNF82	Octamer binding protein	VZNF82.01	Octamer-binding transcription factor-1, POU class 2 homeobox 1 (POU2F1)	1320	1334	1327	(+)	0.938	atctctatTAAATggagcca
VZNF83	Bin-5 POU domain factors	VZNF83.01	POU class 8 homeobox 1 (POU8F1)	1317	1339	1328	(+)	0.833	agttctcTAAATggagcca
VZNF84	Bin POU domain factors	VZNF84.01	POU class 2 homeobox 2 (POU2F2), OTF7	1319	1337	1328	(+)	0.857	ttctctTAAATggagcca
VZNF85	Homeobox transcription factors	VZNF85.01	Homeodomain transcription factor Gsh-2	1319	1337	1328	(-)	0.955	ttgagaTAAATggagcca
VZNF86	Homeodomain transcription factors	VZNF86.01	Muscle segment homeobox 2, homologue of Drosophila HmX (H)	1319	1337	1328	(+)	0.964	ttctctTAAATggagcca
VZNF87	Lim homeodomain factors	VZNF87.01	LM homeobox 8	1317	1339	1328	(+)	0.860	agttctcTAAATggagcca
VZNF88	NK1 homeobox transcription factors	VZNF88.01	NK1 homeobox 2, Sact-like	1320	1336	1328	(-)	0.917	ggagaTAAATggagcca
VZNF89	PAX homeodomain binding sites	VZNF89.01	Paired box 4, homeodomain binding site	1321	1335	1328	(-)	0.917	cggtTAAATggagcca
VZNF90	Bicoid-like homeodomain transcription factors	VZNF90.01	Photoreceptor conserved element 1	1321	1337	1329	(+)	0.901	ttctctTAAATggagcca
VZNF91	Bin POU domain factors	VZNF91.01	POU class 2 homeobox 2 (POU2F2), OTF7	1320	1338	1329	(-)	0.995	gttagTAAATggagcca
VZNF92	Homeobox transcription factors	VZNF92.01	Homeobox transcription factor Gsh-3	1318	1338	1329	(-)	0.829	ttctctTAAATggagcca

Transcription Factor	Gene ID	Description	Start	End	Strand	Score	Sequence
VSPXK6	VSPXK6.02	PAX3 paired domain and homeodomain are required for binding to this site.	1559	1577	(-)	0.878	gggaggaacCCAGaccctg
VSH6AT	VSH6AT.09	Heat shock factor 1	1559	1553	(-)	0.822	taagaggggaacACAGactcg
VSR0B5	VSR0B5.01	Klars3, potential regulator of lymphocyte differentiation	1566	1576	(+)	0.843	tggaTGGAATC
VSS0RV	VSS0RV1.02	SRV1, low determining region Y-box 21, dimeric binding sites	1564	1566	(+)	0.753	ctyGAAATccctccctttgaca
VSR0KH	VSR0KH.01	NK2 homeobox 4, NKX2 DELTA	1569	1587	(-)	0.856	ttgttaaAGTGgaggaat
VSH0MF	VSH0MF.01	H3 homeodomain HMX3/HMX1 transcription factor	1571	1589	(+)	0.864	cccttcaAAGTGgagga
VSEZFE	VSEZFE.01	E2F-myv activator/cell cycle regulator	1588	1604	(+)	0.861	cttgcTCGGctctctc
VSNACA	VSNACA1.01	Nascent polypeptide associated complex and coactivator alpha	1588	1610	(+)	0.854	gccaCAGagpacac
VSM0HE	VSM0HE.01	Winged helix binding sites	1606	1616	(+)	0.867	gagACCGgtc
VSM0RB	VSM0RBNT.02	Aryl hydrocarbon / AhR heterodimers, fixed core	1601	1625	(+)	0.778	acagagagacGGTtactgaccgca
VSG0EE	VSG0EE.01	Cell cycle regulators: Cell cycle dependent element	1618	1636	(-)	0.859	gaagCCCGgcta
VSNZSE	VSNZSE.01	ZFS POZ domain zinc finger	1617	1631	(-)	0.833	ggagCCCGctgtag
VSEZSE	VSEZSE.01	Human and murine ETS1 factors	1619	1629	(+)	0.807	gacagagTGAAagcgggpcct
VSC0ZF	VSC0ZF.02	E2F-myv activator/cell cycle regulator	1623	1639	(+)	0.873	gacagTGGAagagcag
VSR0PF	VSR0PF.02	RBPJ - kappa	1625	1637	(+)	0.945	caggtTGGAagcag
VSNZHS	VSNZHS1.02	Two-handed zinc finger homeodomain transcription factors	1628	1640	(+)	0.896	tccaACTctct
VSM0DO	VSM0DOENL01	Myoblast determining factors	1627	1643	(+)	0.920	ttgagCAGagggagag
VSTALE	VSTALE.02	TALE homeodomain class recognizing TG motifs	1628	1644	(+)	0.783	tccaACTctcttag
VSG0F1	VSG0F1.01	GDNF-inducible zinc finger gene 1	1637	1649	(-)	0.781	TCCGctctgagaca
VSG0ZF	VSG0ZF.01	E2F-myv activator/cell cycle regulator	1644	1660	(+)	0.916	gggaaCCCGgagtcgct
VSEZSE	VSEZSE.01	Human and murine ETS1 factors	1647	1667	(-)	0.872	agtttggGGAagggagtc
VST0AT	VST0AT.01	Signal transducer and activator of transcription	1650	1666	(-)	0.905	agtttggGGAagggagtc
VSG0MF	VSG0MF.01	Chromatin-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	1653	1667	(+)	0.864	gccaCCCTaacct
VSM0T1	VSM0T1.02	MyT1 C/EBP zinc finger protein	1659	1671	(-)	0.854	ctcaAATgtagg
VSEZSE	VSEZSE.01	Coat/Enhancer Binding Protein	1658	1677	(+)	0.965	aacatagGALLtgc
VSEZSE	VSEZSE.01	Human and murine ETS1 factors	1662	1682	(+)	0.789	caaacctGGAAAgctctg
VSR0KH	VSR0KH.01	Nuclear factor kappa B/c-rel	1667	1681	(-)	0.841	agaggttTCCca

inspecting sequence (matrix_1 | 1 - 607)

607 matches found in this sequence

Page 2 of 2

View 581 - 607 of 607

Matrix Family	Detailed Family Information	Matrix	Detailed Matrix Information	from	to	anchor	Strand	Matrix sim.	Sequence
VAP0ZF	Activator protein 2	VAP0ZF.02	Activator protein 2 alpha	1673	1687	1690	(+)	0.924	aagCCGtgaggag
VSN0LF	Neuron-specific olfactory factor	VSN0LF.02	Olfactory neuron-specific factor	1699	1691	1690	(-)	0.953	agtttTCCagccgactctt
VSG0LE	GLI zinc finger family	VSG0LE.01	Zinc finger transcription factor GLI1	1675	1691	1693	(-)	0.962	aggaacCCAGagggca
VSR0B5	Klars3 zinc finger family	VSR0B5.01	LfY-1 (Klars3), enriched in B and T lymphocytes	1678	1690	1684	(+)	0.987	cttTGGgagctc
VSR0BA	v-ERB1 and RAR-related orphan receptor alpha	VSR0BA.02	RAR-related orphan receptor alpha, homodimer DR5 binding site	1677	1701	1689	(+)	0.753	ctcttggagGGTctgtcagctctc
VSS0AD	Vertebrate SMAD transcription factors	VSS0AD.01	GC-rich Smad3 binding element	1693	1703	1690	(+)	0.946	tccgcTCCgg
VSR0RT	RXR heterodimer binding sites	VSR0RT.01	Thyroid hormone receptor, beta (RXR - activated receptor, subtype 4)	1667	1711	1699	(+)	0.752	cttctTCCctctcggactacta
VSG0S6	C/EBP zinc finger transcription factors 6	VSG0S6.02	Zinc finger and BTB domain containing 7, Proboscis elongation factor 2	1711	1723	1717	(+)	0.969	accGACCaccgc
VSG0LE	GLI zinc finger family	VSG0LE.02	GLI-Kruppel family member GLI3	1712	1728	1720	(-)	0.929	ccgcCAGccgcaaca
VSG0MF	Chromatin-specific transcription factors with a GCM DNA binding domain	VSG0MF.02	Glial cells missing homolog 1	1714	1730	1721	(+)	0.906	gaccaCCCGcaaca
VSP0HD	Fork head domain factors	VSP0HD.01	Hepatocyte nuclear factor 3 (Alpha, beta) (FOXO1, FOXO2)	1717	1733	1725	(+)	0.995	caagcgaAACagcagag
VSR0ND	T-cell subset of class B BHLH transcription factors	VSR0ND.01	T-cell acute lymphocytic leukemia 1, SCL	1720	1740	1730	(+)	0.992	ccgcaacCAGagggccctt
VSR0LE	Neuron-specific olfactory factor	VSR0LE.01	Early B-cell factor 1	1720	1731	1740	(+)	0.976	gcagggTCCctctctccaca

VST0AF	Selenocysteine tRNA activating factor	VST0AF.143.01	ZNF143 is the human ortholog of Xenopus Star ZNF76, a DNA binding protein related to ZNF143 and Star	1726	1756	1741	(-)	0.813	gpccttggagCCCAgagccctctgt
VSR0BF	X-box binding factors	VSR0BF.01	Mutl bound by regulatory factor X (RFX)	1732	1750	1741	(+)	0.929	gggtccctGGGcttcca
VSR0KB	Nuclear factor kappa B/c-rel	VSR0KBPM69.01	NF-kappaB (p50)	1738	1752	1745	(-)	0.833	cttGGGAagccagc
VSR0B5	Klars3 zinc finger family	VSR0B5.01	Klars3, potential regulator of lymphocyte differentiation	1741	1753	1747	(-)	0.950	gctGGGAagcc
VSR0PF	RBPJ - kappa	VSR0PF.01	Mammalian transcriptional repressor RBPJ, JappaCBF1	1742	1754	1748	(-)	0.887	ggtTGGAagcc
VSG0EE	Cell cycle regulators: Cell cycle dependent element	VSG0EE.01	Cell cycle-dependent element, CDF-1 binding site (CDE/CHR tandem elements regulate cell cycle dependent repression)	1749	1761	1755	(-)	0.856	ggtCCCGgctg
VSEZSE	ZFS POZ domain zinc finger	VSEZSE.01	ZFS POZ domain zinc finger, zinc finger protein 161 (secondary DNA binding preference)	1751	1765	1750	(+)	0.806	agcCCCGacccttc
VSEZSE	BED subclass of zinc finger proteins	VSEZSE.01	Zinc finger, BED-type containing 4, GC-box binding sites	1759	1773	1766	(+)	0.964	gggCCCGagagaggt
VSG0LE	Kruppel like transcription factors	VSG0LE.02	Kruppel like factor 7 (ubiquitous, UKLF) (secondary DNA binding preference)	1757	1775	1766	(-)	0.877	gggCCCGagagaggt
VSM0AZ	Myc associated zinc fingers	VSM0AZ.01	Myc associated zinc finger protein (MAZ)	1768	1772	1768	(-)	0.911	cggtCCCGagag
VSP0IF	GC-Box factors SP1/GC	VSP0IF.01	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	1759	1775	1767	(+)	0.943	gggtGGCGagagaggt
VSG0LE	Kruppel like transcription factors	VSG0LE.01	Core promoter binding protein (CPBP) with 3 Kruppel-type zinc fingers (KLF4, ZFP)	1759	1777	1768	(-)	0.891	agggggGGCGagagaggt
VSG0RF	EGFR/neve growth factor induced protein C & related factors	VSG0RF.02	EGFR1, early growth response 1	1769	1778	1769	(-)	0.910	gagggggGGCGagagag
VSEZFE	E2F-myv activator/cell cycle regulator	VSEZFE.01	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding protein	1762	1778	1770	(-)	0.948	cagggCCCGagagagc
VSR0DK	Nucleoside diphosphate kinase	VSR0DK.01	HME/NM23 nucleoside diphosphate kinase1 and 2	1762	1778	1770	(-)	0.937	caGGGCGagagagagc
VSR0BE	BED subclass of zinc finger proteins	VSR0BE.01	Zinc finger, BED-type containing 4, GC-box binding sites	1764	1778	1771	(-)	0.960	cagGGCGagagagagc
VSG0LE	Kruppel like transcription factors	VSG0LE.01	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	1762	1780	1771	(-)	0.905	cgagGGCGagagagagc
VSM0AZ	Myc associated zinc fingers	VSM0AZ.01	Myc-associated zinc finger protein related transcription factor	1765	1777	1771	(-)	0.915	agggggGGCGagag
VSP0IF	GC-Box factors SP1/GC	VSP0IF.01	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	1764	1780	1772	(-)	0.968	ggagGGCGagagagagc
VSG0LE	Kruppel like transcription factors	VSG0LE.01	Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Kruppel-type zinc fingers (KLF6, ZFP)	1764	1782	1773	(-)	0.894	gggtGGCGagagagagc
VSG0RF	EGFR/neve growth factor induced protein C & related factors	VSG0RF.02	EGFR1, early growth response 1	1765	1783	1774	(-)	0.916	gggtggGGCGagagagc
VSNZSE	C/EBP zinc finger transcription factors 2	VSNZSE.01	Zinc finger and BTB domain containing 7A, polyoma	1763	1785	1774	(-)	0.937	ctcgcCCCGccctcggcttc
VSG0LE	Kruppel like transcription factors	VSG0LE.01	Kidney-enriched kruppel like factor, KLF15	1767	1786	1776	(-)	0.929	ggggggGGCGagagagc
VSNZSE	C/EBP zinc finger transcription factors 15	VSNZSE10.01	Zinc finger and SCAN domain containing 10 (ZNF208, ZNF205)	1768	1784	1776	(+)	0.908	ccgcgcctTCGccct
VSR0E1	Nuclear respiratory factor 1	VSR0E1.02	Nuclear respiratory factor 1 (NRF1)	1769	1785	1777	(-)	0.871	gagggCCCGagagagc
VSG0ZF	Transcriptional repressor GC-binding factor 2	VSG0ZF.01	Leucine rich repeat (in FLN) interacting protein 1, Elts variant 1	1770	1788	1779	(+)	0.843	ctgcCCCGagagagc
VSEZSE	Human and murine ETS1 factors	VSEZSE.01	Ets variant 1	1778	1796	1788	(-)	0.966	agagggGGGAagagagagc
VSR0TF	RTRP/Z, breast cancer, Twist, Brachyury, and zinc fingers transcription factors	VSR0TF.02	Transcription factor Kaiso, ZBTB33	1787	1801	1794	(+)	0.848	tccaCCCGctctc
VSR0BE	EGFR/neve growth factor induced protein C & related factors	VSR0BE.01	Wt1, Wt1 Tumor Suppressor	1797	1815	1806	(-)	0.969	gggtggGGAGagagagc
VSR0AG	Pneumothorax associated gene	VSR0AG.01	Pneumothorax associated gene (PLAGL1), a developmentally regulated C/EBP zinc finger protein	1796	1818	1807	(-)	0.896	gctGGGggggggagagagagc
VSG0RF	EGFR/neve growth factor induced protein C & related factors	VSG0RF.01	Wt1, Wt1 Tumor Suppressor	1799	1817	1808	(-)	0.968	ggggTGAGagagagagc
VSR0DK	Nucleoside diphosphate kinase	VSR0DK.01	HME/NM23 nucleoside diphosphate kinase1 and 2	1802	1818	1810	(-)	0.973	gctGGGggggggagagagc
VSEZSE	C/EBP zinc finger transcription factors 2	VSEZSE.01	Zinc finger transcription factor ZBP-49	1799	1821	1810	(+)	0.959	gccccttCCCGaccctctt
VSR0BE	BED subclass of zinc finger proteins	VSR0BE.02	Zinc finger, BED-type containing 4, polyG binding sites	1804	1818	1811	(-)	0.976	ggggggGGGgagc

VKLF5	Kruppel like transcription factors	VKLF2.01	Kruppel like factor 2 (lung) (KLK2)	1802	1820	1811	(-)	0.886	agggGGGTgppppgghqg
VMAZ2	Myc associated zinc fingers	VMAZ2.01	Myc-associated zinc finger related transcription factor	1805	1937	1811	(-)	0.886	ggggGGGGggg
VGCTF	CTCF and BORIS gene family transcriptional regulators with 11 highly conserved zinc finger domains	VGCTF.01	CGCTC-binding factor	1799	1825	1812	(-)	0.817	gggagggggggggGGgggagggg
VSMAL2	Sp1-like transcription factor 2	VSMAL2.01	Zinc finger protein Sp1-like 2, p150(spl2)	1807	1917	1812	(-)	0.969	ggggGTGGggg
VSPF1F	GC-Box factors SP1/SG	VSPF1.01	GC box elements	1804	1820	1812	(-)	0.889	ggggGGGTGGgggggga
VKLF5	Kruppel like transcription factors	VKLF5.01	Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Kruppel-type zinc fingers (KLF5, ZFY)	1004	1822	1813	(-)	0.891	ggggGGGGGGgggggggga
VZNF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VZNF2CAN3.01	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	1803	1825	1814	(*)	1.000	cttcCGCCaccgcccctctctc
VSRBE8	Ras-responsive element binding protein	VSRBE1.01	Ras responsive element binding protein 1	1808	1822	1815	(*)	0.806	cCGCCaccgcccctc
VKLF4S	Kruppel like transcription factors	VKLF4.01	Kidney-enriched kruppel-like factor, KLF15	1807	1825	1816	(-)	0.940	gggagggggGGGGggggg
VSEGBF	EGFR/retrov growth factor induced protein C & related factors	VSEGB1.04	EGR1, early growth response 1	1810	1828	1819	(-)	0.874	gggggggagGGGGgggggg
VPLAG9	Pleomorphic adenoma gene	VPLAG1.01	Pleomorphic adenoma gene (PLAG) 1, a developmentally regulated C/2H2 zinc finger protein	1808	1830	1819	(-)	0.821	gggGgGgagggggggggggg
VZTBE	Zinc transcriptional regulatory element	VZTBE.04	3' half site of ZTRE motif	1816	1832	1824	(-)	0.999	ggggGGGGggggggggg
VNM23	Nucleoside diphosphate kinase	VNM23.01	NM23 nucleoside diphosphate kinase 1 and 2	1817	1835	1825	(-)	0.945	ggggGGGGggggggggg
VKLF5	Kruppel like transcription factors	VKLF5.02	Kruppel-like factor 3 (basic)	1817	1835	1826	(-)	0.942	ggggGGGGGGggggggggg
VSRBE6	EGFR/retrov growth factor induced protein C & related factors	VSRBE3.01	Collagen box protein (zinc finger protein 67 - ZFP67)	1818	1836	1827	(-)	0.909	ggggGGGGGGggggggggg
VZNF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VZNF2B3.01	Zinc finger protein 263, ZKSCAN12 (zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 12)	1820	1834	1827	(*)	0.956	ttctccTCCcgccg
VMAZ1	Myeloid zinc finger 1 factors	VMAZ1.03	Myeloid zinc finger protein MZF1	1823	1833	1828	(-)	0.995	ggGGGGggggg
VZNF2	E2F-myc activator/cycle regulator	VZNF2.01	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding protein	1822	1830	1830	(-)	0.891	ctgggGGGGggggggggg
VNM23	Nucleoside diphosphate kinase	VNM23.01	NM23 nucleoside diphosphate kinase 1 and 2	1822	1838	1830	(-)	0.943	ctggGGGGggggggggg
VSEGBF	BEF subclass of zinc finger proteins	VSEGB4.01	Zinc finger, BEF-type containing 4 GC-box binding sites	1824	1838	1831	(-)	0.951	ctggGGGGggggggggg
VKLF5	Kruppel like transcription factors	VKLF5.01	Kruppel-like factor 5 (retinoid)	1822	1840	1831	(-)	0.988	ctggGGGGggggggggg
VMAZ2	Myc associated zinc fingers	VMAZ2.01	Myc associated zinc finger (MAZ)	1825	1837	1831	(-)	0.941	ggggGGGGggggg
VSRBE1F	GC-Box factors SP1/SG	VSRBE1.03	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	1824	1840	1831	(-)	0.976	ctggGGGGggggggggg
VZTBE	Zinc transcriptional regulatory element	VZTBE.02	5' half site of ZTRE motif	1824	1840	1832	(*)	1.000	ccCTCCcgcccgccg
VSEGBF	EGFR/retrov growth factor induced protein C & related factors	VSEGB1.02	EGR1, early growth response 1	1825	1843	1834	(-)	0.916	ctggGGGGGGggggggggg
VZNF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VZNF2B7.01	Zinc finger and BTB domain containing 7A, pokernon	1823	1845	1834	(*)	0.934	ttctccCGCCcgcccgccgcca
VZNF2	C2H2 zinc finger transcription factors 2	VZNF2B8.01	KRAB-containing zinc finger protein 309	1826	1848	1837	(*)	1.000	ctctccCGCCcgcccgccgctc
VSRBE1F	Nuclear respiratory factor 1	VSRBE1.02	Nuclear respiratory factor 1 (NR1F1)	1837	1853	1845	(*)	0.966	agggGGGGggggggggg
VZNF15	C2H2 zinc finger transcription factors 15	VZNF15A1.01	Zinc finger and SCAN domain containing 10 (ZNF15, ZNF150)	1837	1853	1845	(*)	0.928	agggggggTGGGGggg
VSRBE1F	Nuclear respiratory factor 1	VSRBE1.01	Nuclear respiratory factor 1 (NR1F1)	1838	1854	1846	(-)	0.875	ctggGGGGggggggggg
VZNF15	C2H2 zinc finger transcription factors 15	VZNF15A1.01	Zinc finger and SCAN domain containing 10 (ZNF15, ZNF150)	1838	1854	1846	(-)	0.937	ctggggggTGGGGggg
DMTF1H	Core promoter motif ten elements	DMTF1E.01	Human motif ten element	1838	1858	1848	(-)	0.989	gggGGGGGGggggggggg
DMTF1H	Core promoter motif ten elements	DMTF1E.01	Drosophila motif ten element	1943	1863	1853	(-)	0.822	ctggggGGGGggggggggg
VZNF2	ZFS POU domain zinc finger	VZNF2.03	ZFS POU domain zinc finger, zinc finger protein 161 (secondary DNA binding preference)	1948	1862	1855	(-)	0.842	ctggGGGGggggggggg
VZF2HD	Fork head domain factors	VZF2HD.ES.01	Alternative splicing variant of FOXO1, activated in ESCs	1858	1874	1866	(-)	1.000	tttttttttttttttttttttt

GVCTBE	Vertebrate TATA-binding protein factor	GVCTATA.01	Cellular and viral TATA box elements	1860	1876	1868	(-)	0.974	tttTAAAaacagct
DMTF1P	Plant TATA binding protein factor	DMTF1A.01	Plant TATA box	1863	1877	1870	(-)	0.951	ctttTAAAaacac
VXMA9B	Abdominal-B type homeodomain transcription factors	VXMA9B.02	Homeobox a3 / Hox1-2/par1	1863	1879	1871	(-)	0.852	gctttTAAAaacac
VSRBE1F	Histone nuclear factor P	VSRBE1.01	MED12 methyl-CpG binding protein, interacting zinc finger protein, histone nuclear factor P (HNF-P)	1865	1883	1874	(-)	0.854	ggGGGacttttttttttt
GVCTBE	Vertebrate TATA-binding protein factor	GVCTATA.01	Cellular and viral TATA box elements	1867	1883	1875	(*)	0.971	tttTAAAaagtcgpc
VBLN2H	SV40/SP1 related nucleosidiphosphoproteins with a RING finger DNA binding motif	VSMARCA3.02	SV40/SP1 related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3	1872	1882	1877	(-)	0.966	ctggACTTta
VSPF1F	GC-Box factors SP1/SG	VSPF2.01	Sp2, member of the Sp3/Sp1 transcription factors with three C/2H2 zinc fingers in a conserved carboxyl-terminal domain	1874	1890	1882	(-)	0.941	ggggggggGGGGG
VSRBE1F	Heat shock factors	VSRBE2.02	Heat shock factor 2	1879	1903	1891	(*)	0.978	ctggggggggcGAAactcagtt
VSMY1	MYT1 C/2H2 zinc finger protein	VSMY1.02	MyT1 zinc finger transcription factor involved in primary neurogenesis	1889	1901	1895	(-)	0.881	ctgAAAGTttgg
VSRBE1F	Heat shock factors	VSRBE2.01	Heat shock factor 2	1888	1912	1900	(-)	0.881	ctgggcaaacactTAAactctggg
VSMY1L	Cellular and viral myb-like transcriptional regulators	VSMY1L.02	V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog like 1 (AMV1) (secondary DNA binding preference)	1893	1913	1903	(-)	0.835	ggggcaaacAACTgaaatt
VZNF57	KRAB domain zinc finger protein 57	VZNF57.01	Kruppel-associated box containing zinc-finger protein 57 (KRAB-ZFP 57)	1908	1920	1914	(-)	0.959	ttcTCCgcpagct
VSRBE1S	MAF and AP1 related factors	VSRBEA.01	Leish-specific Maf/Max-like-1	1903	1927	1915	(*)	0.953	ttttggggtgggggAGCAGgttttt
VSRAND	Twist subfamily of class B bHLH transcription factors	VSRAL1.ES2A.02	T-cell acute lymphocytic leukemia 1, SCL	1909	1929	1919	(*)	0.994	gtttgggGAGGaggttttttt
VSRNAH	Small family of zinc finger transcription factors binding to E-box motifs	VSRBE12.01	Scratch homolog 2, zinc finger protein, transcriptional repressor scratch 2	1915	1925	1920	(-)	0.870	ggggGAGGttg
VSRBE8	cAMP-responsive element binding proteins	VSRBE8.02	cAMP-responsive element binding protein	1920	1942	1932	(*)	0.885	gtttgcaagTGAcggcgaggg
VSRBE8	cAMP-responsive element binding proteins	VSRBE1.02	Activating transcription factor 1	1925	1945	1935	(-)	0.960	ggaaagTGAcggcgagggctt
VSMY1	Myc-interacting Zn finger protein 1	VSMY1.01	Myc interacting Zn finger protein 1, zinc finger and BTB domain containing 17 (ZBTB17)	1958	1948	1941	(-)	0.994	ctgggCCTGgg
VSRK2H	NKX homeodomain factors	VSRK2S.09	Homeodomain factor Nkx-2.5/Csx	1940	1956	1949	(*)	0.983	ggggCTGAgtttttctgctg
VSRBE1F	Ood-skipped related factors	VSRBE2.01	Ood-skipped related 2	1951	1963	1957	(*)	0.924	ctccgGTAcctcc
VKLF5	Kruppel like transcription factors	VKLF12.01	Kruppel-like factor 12 (AP-Dreg)	1952	1970	1961	(-)	0.947	agttggGTGGctacttga
VSRP2	RPS8 (ZFP238) zinc finger protein	VSRP2.01	Zinc finger protein RPS8 (ZNF238), associated preferentially with heterochromatin	1962	1974	1968	(*)	0.955	ctggCATGggg
VZNF2	C2H2 zinc finger transcription factors 1	VZNF21.01	SZF1, hematopoietic progenitor-restricted KRAB zinc finger protein	1968	1992	1980	(-)	0.961	ctggGGGTaccgggtgtctctaga
VSMY1G	Myblast determining factors	VSMY12.01	Podocyte-expressed 1 (POD1)	1973	1989	1981	(-)	0.815	gggtttaccCTGgttt
VSMY1	Myc-interacting Zn finger protein 1	VSMY1.01	Myc-interacting Zn finger protein 1, zinc finger and BTB domain containing 17 (ZBTB17)	1990	2000	1995	(-)	0.962	atttcCCTGga



