

Aus der Frauenklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Dietl

und

dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. Martin Lohse

**Adenosinrezeptoren auf Zervix-, Uterus- und Mammakarzinomzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anna Magdalena Šumski

aus Frankfurt

Würzburg, März 2014





**Referent:** Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen

**Koreferent:** Prof. Dr. rer. nat. Karl-Norbert Klotz

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 28.05.2014

**Die Promovendin ist Zahnärztin**

Meinen Eltern, die mir gezeigt haben, was im Leben zählt

## INHALT

1	Einleitung .....	1
1.1	Onkologische Erkrankungen der Frau .....	1
1.1.1	Das Endometriumkarzinom .....	1
1.1.2	Das Zervixkarzinom .....	3
1.1.3	Das Mammakarzinom.....	5
1.2	Die Adenosinrezeptoren .....	8
1.2.1	Übersicht, Nomenklatur und Physiologie.....	8
1.2.2	Liganden an Adenosinrezeptoren .....	10
1.2.3	Pathologie – Adenosinrezeptoren und Krebs .....	13
2	Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
3	Materialien und Methoden.....	19
3.1	Materialien .....	19
3.1.1	Chemikalien und Radiochemikalien.....	19
3.1.2	Antikörper.....	20
3.1.3	Verbrauchsmaterial, Gerätschaften .....	20
3.1.4	Zelllinien.....	22
3.1.5	Medien und Medienzusätze, Puffer, Detachments .....	23
3.2	Methoden .....	24
3.2.1	Die Kultivierung eukaryonter Zellen.....	24
3.2.2	Die Membranpräparation.....	26
3.2.3	Der Proteinassay .....	27
3.2.4	Der Bindungsassay .....	27
3.2.5	Der Adenylatcyclaseassay .....	30
3.2.6	Die Bestimmung der Zellzahl.....	33
3.2.7	Die Kristallviolett-Färbung .....	34

3.2.8	Der BrdU-Assay .....	35
3.2.9	Das fluorescence activated cell sorting (FACS).....	37
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Nachweis einer Adenosinrezeptor-Expression auf humanen Tumorzelllinien mittels Radioliganden-Bindungsassays .....	42
4.2	Untersuchung der Adenylatcyclaseaktivität bei Stimulation mit Adenosinrezeptor-Liganden .....	43
4.3	Bestimmung der Zelldichte der Tumorzellen mittels Kristallviolett-Färbung nach Adenosinrezeptor-Stimulation .....	47
4.4	Proliferationsverhalten der Tumorzellen im BrdU-Assay .....	55
4.5	Expression von CD39 und CD73 auf Tumorzellen nach Adenosinrezeptorstimulation.....	57
5	Diskussion .....	60
6	Zusammenfassung .....	68
7	Literaturverzeichnis .....	70
8	Abbildungsverzeichnis .....	76
9	Tabellenverzeichnis .....	78
10	Abkürzungsverzeichnis .....	79

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Onkologische Erkrankungen der Frau

Die fünf häufigsten Krebsarten mit Todesfolge bei Frauen im Jahre 2010 waren laut dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Brustkrebs, gefolgt von Lungen-, Kolorektal-, Pankreas-, Ovarial- und Magenkarzinomen [1]. Rund 40% der Krebserkrankungen der Frau sind auf Tumore der Mamma und der weiblichen Genitalorgane (Zervix, Endometrium, Ovarien) zurückzuführen [2]. Seltene Formen sind Vulva- und Vaginalkarzinome.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen vom Endometrium-, Zervix- und Mammakarzinom untersucht. Im Folgenden soll auf diese Krebsarten näher eingegangen werden.

### 1.1.1 Das Endometriumkarzinom

Jedes Jahr entwickeln 142.000 Frauen weltweit ein Endometriumkarzinom, 42.000 sterben an den Folgen [3]. Damit steht diese Erkrankung weltweit an siebter Stelle der Inzidenz maligner Krebserkrankungen der Frau. Laut Robert Koch-Institut werden in Deutschland rund 11.140 Neuerkrankungen pro Jahr registriert. 2,4% aller Krebssterbefälle unter Frauen in Deutschland sind Folge des Endometriumkarzinoms [4]. Die Länder mit der höchsten Inzidenz sind die USA und die westeuropäischen Länder; hier wird das mittlere fünf-Jahres-Überleben mit 84% in den USA und 72% in Europa angegeben. Das Gesamtüberleben für Europa wurde laut einer EUROCARE-Studie mit 75% angegeben [5]. Überwiegend erkranken Frauen in der postmenopausalen Phase mit einem Altersgipfel zwischen 75 und 80 Jahren, in 25% der Fälle sind jedoch auch prämenopausale Frauen betroffen [6]. Es werden zwei Typen des Endometriumkarzinoms unterschieden. Das überwiegend östrogenabhängige Typ-I-Karzinom zählt in der Mehrzahl zu den endometrioiden Adenokarzinomen. Beispiele für das hormonunabhängige Typ-II-Karzinom sind das klarzellige und das seröse Karzinom. Weitere seltene Tumortypen sind das muzinöse Adenokarzinom, das primäre Plattenepithelkarzinom und das undifferenzierte Karzinom. Laut den Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft [7] werden folgende Risikofaktoren, insbesondere für das Typ-I-Karzinom, als gesichert

angesehen: die Langzeiteinnahme von Östrogenen ohne Gestagenschutz, ein Body-Mass-Index von mehr als  $25 \text{ kg/m}^2$ , Diabetes mellitus, Nulliparität und das polycystic ovary (PCO) Syndrom. Multiparität, Rauchen, körperliche Belastung und Kontrazeptiva-Einnahme senken das Risiko einer Erkrankung. Uterine Blutungen bei postmenopausalen Frauen und unregelmäßige Blutungen bei prä- und perimenopausalen Frauen können erste Warnzeichen sein.

Die Therapie richtet sich nach dem Stadium der Erkrankung sowie dem Tumor-Typ (definitionsgemäß wird das Typ-II-Karzinom automatisch als „high-grade“ eingestuft) und berücksichtigt zudem individuelle Bedürfnisse der Patientinnen (z.B. Erhalt der Fertilität), den Allgemeinzustand und die Risikofaktoren. Basis der Therapie ist eine mehr oder weniger ausgeweitete histologische Beurteilung, maßgeblich sind dabei die allgemeingültigen Einteilungen nach der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO; Einteilung nach der klinischen Untersuchung) und der Tumor-Nodes-Metastases Klassifikation (TNM; postoperative Stadieneinteilung). Grundsätzlich bildet ein systematisches operatives Staging das Kernstück der Therapie. Die Ausdehnung der Operation richtet sich nach dem TNM- bzw. FIGO-Stadium, bedeutet für die Patientinnen aber zumeist die Hysterektomie, Adnexexstirpation und pelvine sowie paraaortale Lymphonodektomie. Bei Krebsvorstufen ohne Atypien kann vor allem bei prämenopausalen Frauen eine alleinige Gestagentherapie erwogen werden. Dies führt in 60-80% der Fälle zu einer Regression [7]. Die hormonelle Therapie kann unter bestimmten Voraussetzungen auch bei Rezidiven zum Einsatz kommen. Vor allem Endometriumkarzinome des Typs II bergen eine hohe Metastasierungs- und Rezidivgefahr. Daher folgt der operativen oft eine adjuvante Radio- oder Chemotherapie. Im Falle eines Typ-I-Karzinoms scheint nach neueren Erkenntnissen die adjuvante Chemotherapie effektiver zu sein als die Strahlentherapie. Dabei sind Doxorubicin und Cisplatin bis heute die Mittel der Wahl. Paclitaxel, ein aus der Pazifischen Eibe gewonnener Wirkstoff aus der Gruppe der Taxane, der bislang u.a. in der Therapie des Mammakarzinoms Einsatz findet, scheint auch hinsichtlich des Endometriumkarzinoms vielversprechend [6].

### 1.1.2 Das Zervixkarzinom

Schätzungsweise 500.000 Frauen weltweit erkranken jährlich an Gebärmutterhalskrebs, annähernd 233.000 davon sterben an den Folgen [8]. Dabei hängt die Prognose in hohem Maße vom medizinischen Standard der jeweiligen Region ab: Während Früherkennungsprogramme in entwickelten Industrieländern dazu geführt haben, dass das Zervixkarzinom nicht mehr zu den 10 am häufigsten tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen gehört, stellt es in der dritten Welt die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache dar [9]. 5470 Erkrankungsfälle und 1492 Sterbefälle gab es 2006 in Deutschland, der Altersgipfel liegt zwischen dem 40. und 59. Lebensjahr. Das mittlere fünf-Jahres-Überleben wird für Deutschland in der Literatur mit 63-71% angegeben [10]. Während die Inzidenz des Zervixkarzinoms rückläufig ist, hat die Anzahl der Präkanzerosen vor allem bei jungen Frauen signifikant zugenommen [4].

Die Mehrheit der Zervixkarzinome zählen histologisch zu den Plattenepithelkarzinomen (80%), 5-15% sind Adenokarzinome. Seltene Tumorentitäten mit mehrheitlich schlechter Prognose sind klarzellige, serös-papilläre und neuroendokrine Karzinome, welche sich wiederum in groß- und kleinzellige unterteilen lassen [11].

Spätestens seit der Verleihung des Nobelpreises für Medizin an Harald zur Hausen 2008 ist auch der breiten Bevölkerung bekannt, dass der wesentliche Auslöser für die Entstehung eines Zervixkarzinoms eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) ist. Die wichtigsten Hochrisiko-HP-Viren sind vom Typ 6, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 und 82. Die bei weitem größte Gefahr einer neoplastischen Entartung besteht bei einer Infektion mit HPV16 [12]. Neben derartigen Infektionen werden weitere Faktoren diskutiert, die die Krebsentstehung fördern können. Dazu zählen Rauchen, vaginale Infektionen, jahrelange Einnahme von Kontrazeptiva, hohe Paritäten und Immunsuppression. Fast jede Frau macht im Laufe ihres Lebens eine HPV-Infektion durch. Nach durchschnittlich 6-18 Monaten bildet sich die Infektion häufig ohne bleibende Schäden zurück, in 10% der Fälle allerdings persistiert diese und wird chronisch [13]. Am häufigsten geht die Entstehung von Präkanzerosen und Karzinomen auf das HP-Virus (HPV) vom Typ 16 zurück (s.o.), der am zweithäufigsten in Läsionen auffindbare Typ ist das HPV18 [14]. Seit September 2006 steht mit Gardasil® eine von der European Medicines Agency (EMA) zugelassene Vakzine zur Verfügung, wirksam gegen HP-Viren vom Typ 6, 11, 16 und 18. Seit Juli 2007 ist ein weiterer Impfstoff,

Cervarix<sup>®</sup>, auf dem Markt, wirksam gegen HP-Viren vom Typ 16 und 18. Es besteht die Hoffnung, die mit diesen HPV-Typen assoziierten Präkanzerosen stark einzudämmen. Langfristig ist es denkbar, durch regelmäßige Screenings und flächendeckende Vakzination die Entstehung invasiver Tumoren vollkommen zu verhindern [15]. In aktuellen Studien konnte eine nahezu 100%ige Wirksamkeit der verfügbaren Impfstoffe gegen Infektionen mit HPV16 und 18 sowie der assoziierten Krebsvorstufen nachgewiesen werden [13, 16]. Die aktuellen Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) des Robert Koch-Instituts schlagen die Grundimmunisierung 1-3 für Mädchen im Alter von 12 bis 17 Jahren vor [16].

Ist es zu einer Erkrankung gekommen, erfolgt die Stadieneinteilung nach FIGO und TNM, die Präkanzerosen werden außerdem dem Schweregrad nach in die Stadien CIN1-3 (CIN=zervikale intraepitheliale Neoplasie) unterteilt. Der Entscheidung über die folgende Therapie liegt eben diese Einteilung zugrunde, sowie eine gründliche vorausgegangene Inspektion der Portio, ggf. eine Kolposkopie und das Ergebnis der histologischen Untersuchung. Weiterhin müssen die Risikofaktoren unter Berücksichtigung der individuellen Bedürfnisse der Patientin beachtet werden [11]. Die operative Therapie reicht von der fertilitätserhaltenden Konisation bis hin zur radikalen Hysterektomie mit kompletter paraaortaler Lymphonodektomie bis zum Nierenstiel. In frühen Stadien der Erkrankung bietet eine Radio(chemo)-therapie zwar effektiv eine gleichwertige Alternative zur Operation. Dennoch wird die operative Therapie meist bevorzugt, vor allem bei jungen Frauen, da die Aktivität der Ovarien erhalten werden kann und vaginale Atrophien und Stenosen vermieden werden können [8]. Wenn jedoch eine primäre Radiotherapie indiziert ist, sollte diese immer mit einer Cisplatingabe kombiniert werden. Die alleinige adjuvante Chemotherapie reduziert zwar das Risiko von lokalen Rezidiven, die Überlebenszeit der Patientinnen wird aber nicht verlängert. Während die Operabilität durch eine neoadjuvante Chemotherapie optimiert werden kann, bietet die adjuvante Chemotherapie dem heutigen Wissensstand nach keinen Vorteil. Die Chemotherapeutika der Wahl sind Platinderivate [11].

### 1.1.3 Das Mammakarzinom

Jedes Jahr erkranken fast 60.000 Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Damit liegt das Risiko einer Frau, im Laufe ihres Lebens am Mammakarzinom zu erkranken bei nahezu 12%. Da es sich nicht um einen Tumor des weiblichen Reproduktionstraktes handelt und ein Mammakarzinom in seltenen Fällen auch bei Männern auftritt, wird es nicht zu den genuin gynäkologischen Tumoren gezählt und z.B. in den USA zumeist von Internisten behandelt. Da Diagnose und Therapie des Mammakarzinoms aber in Deutschland den Gynäkologen obliegen, soll es im Rahmen dieser Arbeit mitbesprochen werden.

Das hereditäre Mammakarzinom schlägt mit etwa 5% aller Mammakarzinome zu Buche. Betroffen sind Frauen mit einer Keimbahnmutation in einem der prädisponierenden Gene BRCA1 oder BRCA2 (BRCA: BRest CAncer: Brustkrebs-assoziierte Gene, in denen erbliche Mutationen auftreten können, die ein hohes Risiko für Brustkrebs und andere Tumorerkrankungen bedingen). Bei diesen besteht ein 50-80%iges Risiko, an Brustkrebs zu erkranken [17]. Brustkrebs ist nicht nur die häufigste Krebserkrankung der Frau, sondern nimmt auch die Spitzenposition unter den Ursachen (weiblicher) Krebsterbefälle pro Jahr ein. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 62 Jahren, das mittlere fünf-Jahres-Überleben nach Erstdiagnose bei 76% [17].

Die wichtigsten Risikofaktoren für die Brustkrebs-Entstehung sind Geschlecht (nur 0,5-1% aller Mammakarzinome finden sich bei männlichen Patienten [18]), Alter und familiäre Disposition (s.o.). Weitere Risikofaktoren sind endogene Hormone (niedriges Menarchealter, hohes Alter bei Erstparität, fehlende Laktation, Nulliparität und hohes Menopausenalter). Ein hoher BMI führt bei postmenopausalen Frauen über die gesteigerte Östrogenproduktion im Fettgewebe ebenfalls zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko. Exogene Hormone in Form von oralen Kontrazeptiva erhöhen ebenfalls das Erkrankungsrisiko. Insbesondere lässt sich dieser Effekt bei jungen Frauen beobachten, wenn der Behandlungsbeginn vor der ersten Parität stattfand [19].

Palpationsuntersuchung (häufig auch Selbstuntersuchung durch die Patientinnen) und klinische Symptome (z.B. erkennbare Einziehung der Brustwarze oder eine Hautrötung beim sog. Inflammatorischen Mammakarzinom) können erste Hinweise auf eine Brustkrebserkrankung geben. Gesichert wird die Diagnose im Allgemeinen durch eine

Mammographie und die histologische Untersuchung nach Biopsie. Meist sind die Karzinome im oberen lateralen Quadranten der Brust lokalisiert [20].

Histopathologisch lassen sich folgende Subtypen unterscheiden: Am häufigsten anzutreffen sind mit 65-80% aller Mammakarzinome die invasiven duktales Karzinome, gefolgt von den lobulären (6-15%). Seltener anzutreffen sind die medullären (3%), tubulären (1-15%), muzinösen (1-2%) und die papillären Karzinome (1-7%) [21]. Gemäß World Health Organization (WHO) wird weiterhin zwischen invasiven und nicht-invasiven Tumoren unterschieden. Zu den invasiven Tumoren zählen alle oben genannten Formen, zu den nicht-invasiven gehören das duktales Carcinoma *in situ* (DCIS) und das lobuläre Carcinoma *in situ* (LCIS). Eine Sonderstellung nimmt der Morbus Paget der Mamilla ein, der u.a. mit einer Ekzembildung assoziiert ist. Die Stadieneinteilung, die maßgeblich für die Entscheidung über Art und Verlauf der Therapie ist, erfolgt nach der (p)TNM-Einteilung (p entspricht der pathologischen Klassifikation) und/oder der Einteilung der Union internationale contre le cancer (UICC). Des Weiteren sind Prognose und Therapiemodalität abhängig von Tumortyp, -größe, Alter und Menopausenstatus der Patientin, Differenzierungsgrad und vaskulärer Invasion. Während früher die radikaloperative Therapie ganz im Vordergrund stand, setzt die heutige Wissenschaft auf fünf Säulen: Die Chirurgie bleibt weiterhin das Herzstück der kurativen Therapie. Es folgen Radiotherapie, Chemotherapie, endokrine Therapie und Immuntherapie bzw. eine individuelle Kombination aus diesen. Unabdingbar sind die Bestimmung von Hormonrezeptorstatus und HER2/neu-Status (ein in vielen Tumorzellen überexprimierter Rezeptor aus der Familie der epidermal growth factor receptors). Vor Beginn der Therapie wird also das Vorhandensein von Östrogen- und Progesteronrezeptoren (ER und PgR) mittels Immunhistochemie überprüft. Während die aktuelle deutsche Leitlinie bei jedem hormonsensitiven Tumor eine (adjuvante) endokrine Therapie empfiehlt [17], hält der St. Gallen Consensus von 2009 dieses Vorgehen nur bei ER-positiven Tumoren für in jedem Falle gesichert und bezieht sich auf die fehlende Validität der Datenlage bei PgR-Positivität und ER-Negativität [22].

Prinzipiell stehen drei Substanzgruppen zur Verfügung, die Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga (GnRH-Analoga, Prämenopause), Tamoxifen (Prä- und Postmenopause) und die Aromataseinhibitoren (Postmenopause). Tamoxifen kommt am häufigsten zum Einsatz, da ein eindeutiger Überlebensvorteil für die Patientinnen als

gesichert angesehen werden kann [23]. Als Zytostatika kommen im Wesentlichen Substanzen aus der Gruppe der Taxane (z.B. Paclitaxel) und der Anthrazykline (z.B. Doxorubicin) zum Einsatz. Die Therapie kann neoadjuvant (absolute Indikation bei primär inoperablen Tumoren oder beim inflammatorischen Mammakarzinom) und/oder adjuvant erfolgen. Bei HER2/neu-Positivität ist eine Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab angezeigt. Etabliert hat sich die Gabe für ein Jahr, simultan oder sequentiell zu einer Chemotherapie. Die alleinige intra- oder postoperative Teilbrustbestrahlung sollte aufgrund der ungesicherten Datenlage nicht erfolgen [17]. Ausmaß sowie Dosis und Dauer der adjuvanten Strahlentherapie im Allgemeinen richten sich nach Operationsverfahren, Tumorstadium und ggf. stattgefundener Metastasierung. Eine Bisphosphonattherapie zum Schutz der Knochen vor Demineralisation und Tumorbefall wird derzeit vom St. Gallen Consensus nicht routinemäßig empfohlen [22].

So vielfältig wie die Erkrankung sind auch die Therapiemöglichkeiten und ständig bringt die aktuelle Forschung neue Ansätze ins Spiel. Die Selektion und Zusammenstellung der Therapiemodalitäten muss daher nach genauester Diagnostik im interdisziplinären Konsens individuell auf die Patientin abgestimmt und an den aktuellen Forschungsstand angepasst werden. Dem wissenschaftlichen Fortschritt haben wir es zu verdanken, dass heutzutage 60-70% der Tumore brusterhaltend operiert werden können [20]. Nach wie vor problematisch ist aber die Gruppe der „triple-negativen“ Karzinome, die weder HER2 noch Östrogen- oder Progesteronrezeptoren exprimieren, sodass hier kaum zielgerichtete Ansätze existieren. Unglücklicherweise tritt dieser besonders aggressive und mit einer ungünstigen Prognose behaftete Tumortyp bevorzugt bei jüngeren Patientinnen auf. Insofern besteht insbesondere hier ein großer Bedarf an neuen therapeutischen Ansätzen.

## 1.2 Die Adenosinrezeptoren

### 1.2.1 Übersicht, Nomenklatur und Physiologie

Es werden zwei große Gruppen von Purinrezeptoren unterschieden: Die P1-Nukleosidrezeptoren (Adenosinrezeptoren, AR) auf der einen, die P2-Nukleotidrezeptoren auf der anderen Seite [24]. Der Vollständigkeit halber seien die Subklassen P2X (Ionenkanäle) und P2Y (G-Protein gekoppelt) genannt, an denen Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Uridintriphosphat (UTP) und Uridindiphosphat (UDP) als endogene Liganden fungieren (s. Abb.1).

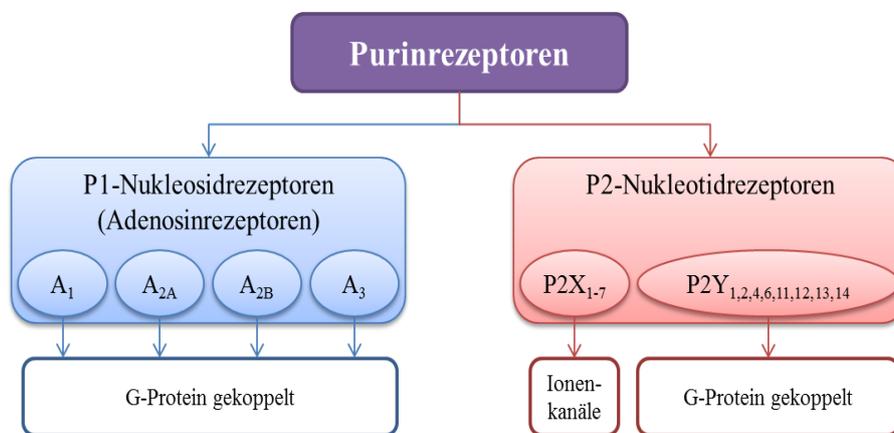


Abbildung 1: Einteilung der Purinrezeptoren, eigene Darstellung in Anlehnung an [25]

Adenosinrezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G-protein-coupled receptors, GPCR; „G-Protein“ für Guaninnukleotid-bindendes Protein). Die GPCR sind die größte Gruppe von Membranproteinen; etwa 80% der Hormone und Neurotransmitter vermitteln ihre intrazellulären Effekte über die Aktivierung von G-Proteinen [25]. Weiterhin ist diese Rezeptorfamilie zuständig für bestimmte Sinneswahrnehmungen wie Riechen, Schmecken und Sehen [26]. Die Rezeptorstimulation führt über die Bindung von heterotrimeren GTP-bindenden Proteinen und die Aktivierung eines GDP-GTP-Austausches zur Dissoziation der GTP-gebundenen  $\alpha$ -Untereinheit und des  $\beta\gamma$ -Dimers vom GPCR. Sowohl die  $G\alpha$ - als auch die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit können dann die Signale an diverse Effektoren wie Phospholipasen, Phosphodiesterasen, Ionenkanäle oder die Adenylatcyclase weitergeben [27]. Dies führt zu

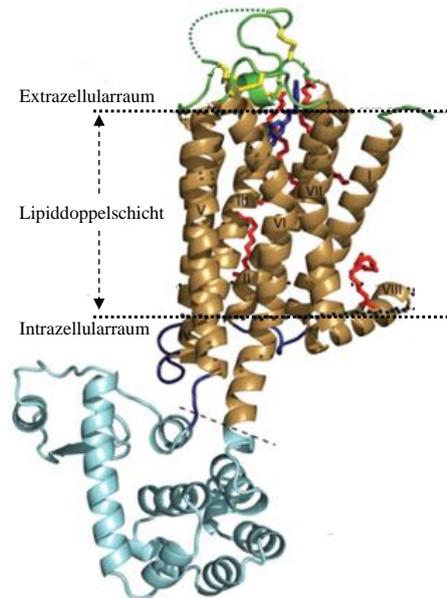
einer schnellen Änderung der Konzentration intrazellulärer Signalmoleküle wie – im Falle der Adenylatcyclase – cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Das quasi ubiquitäre Vorkommen und die Vielfalt der vermittelten Effekte machen die GPCR schon seit Jahrzehnten zu einem pharmakologisch interessanten Target.

Van Calker erkannte bereits 1979 die Notwendigkeit einer weiteren Unterteilung der Adenosinrezeptoren in  $A_1$ - und  $A_2$ -Rezeptoren aufgrund ihrer unterschiedlichen Effekte auf die Adenylatcyclase [28]. Später wurden die  $A_2$ -Rezeptoren als heterogene Gruppe identifiziert und weiter in  $A_{2A}$ - und  $A_{2B}$ -Rezeptoren unterteilt. 1992 gelang die Klonierung und Charakterisierung eines weiteren Adenosinrezeptors [29], so dass heute insgesamt vier Subtypen unterschieden werden: Der  $A_1$ -,  $A_{2A}$ -,  $A_{2B}$ - und der  $A_3$ -Rezeptor [30]. An allen Subtypen ist Adenosin der Hauptagonist, der  $A_3R$  kann jedoch auch durch Inosin aktiviert werden [31].

Die meisten durch Adenosin vermittelten Effekte werden über die Adenosinrezeptoren in die Zielzellen transduziert. Eine bedeutende Rolle spielt dieser Signalweg für bestimmte Abläufe im kardiovaskulären System, im ZNS, im gastrointestinalen System und im Immunsystem, bei der Plättchenaggregation, der Mastzelldegranulation sowie bei Nozizeption, Zellwachstum und Apoptose [32]. So wirkt etwa der  $A_1R$  am Herzen negativ chronotrop, dromotrop und inotrop. Der  $A_{2A}R$  kann auf Endothel- und glatten Muskelzellen eine vasodilatative Wirkung entfalten. Des Weiteren sind beide vorgenannten Subtypen in regulative Prozesse bei der Steuerung der Aktivität von Neuronen im ZNS involviert. Der  $A_{2B}R$  ist in bestimmten Darmabschnitten und der Blase besonders hoch exprimiert [33], der  $A_3R$  scheint in langfristig kardioprotektive Prozesse involviert zu sein [34]. Insgesamt ist allerdings über die Rolle des  $A_{2B}$ - und  $A_3$ -Rezeptors bei physiologischen Vorgängen im menschlichen Körper noch wenig bekannt [33].

Der  $A_1R$  sowie der  $A_3R$  interagieren hauptsächlich mit  $G_i$ -Proteinen (i=inhibitorisch), der  $A_{2A}$ - und  $A_{2B}$ -Rezeptor sind  $G_s$ -gekoppelt (s=stimulatorisch) [31]. Im Falle der  $G_i$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren führt die Signalkaskade in aller Regel über die Inhibition der Adenylatcyclase (AC) zu einem Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels, im Falle der  $G_s$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren akkumuliert cAMP in der Zelle. Wie alle GPCR weisen die Adenosinrezeptoren sieben  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen auf, die über je drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind und einen extrazellulären N-Terminus sowie einen zytoplasmatischen C-Terminus aufwei-

sen [35]. Technisch wird die Forschung an Adenosinrezeptoren erheblich durch das Fehlen geeigneter Antikörper erschwert, was auf den geringen Anteil der extrazellulär zugänglichen Struktur zurückzuführen sein könnte. Einen großen wissenschaftlichen Beitrag zur Klärung der Strukturbiologie der Adenosinrezeptoren konnten Jaakola et al. leisten, als sie 2008 die erste Darstellung der Kristallstruktur eines humanen Ligand-aktivierten  $A_{2A}$ -Rezeptors publizierten (s. Abb. 2).



**Abbildung 2:** Kristallstruktur des an einen Antagonisten (blau) gebundenen  $A_{2A}$ -Rezeptors (braun: Transmembrandomänen; grün: Extrazelluläre Schleifen). Verändert nach [36]

## 1.2.2 Liganden an Adenosinrezeptoren

Wie bereits erwähnt, fungiert an allen AR-Subtypen das Adenosin (Strukturformel s. Abb. 3) als natürlicher endogener Agonist. Adenosin ist nicht nur ein wichtiger Baustein für diverse biologisch relevante Moleküle, sondern auch ein Botenstoff, der modulierend in viele physiologische Prozesse des menschlichen Körpers eingreift [33].

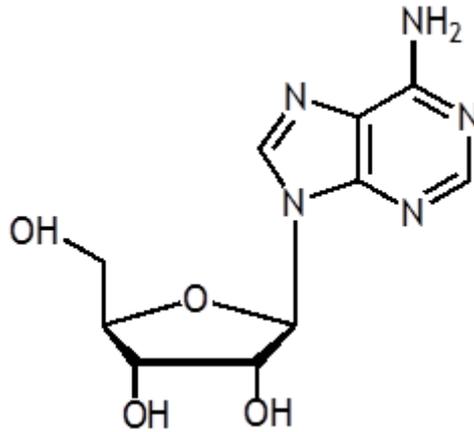


Abbildung 3: Strukturformel von Adenosin, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. K.-N. Klotz, Würzburg

Freigesetzt wird Adenosin unter physiologischen Bedingungen unter anderem von Mastzellen, Erythrozyten, Kardiomyozyten, Endo- und Epithelzellen sowie Fibroblasten [36]. Die wichtigsten Quellen für Adenosin sind die Hydrolyse von 5'-Adenosinmonophosphat (AMP) durch eine 5'-Nukleotidase (CD73) und die Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein im Zytosol, sowie die extrazelluläre Dephosphorylierung von 5'-AMP [37]. Unter basalen Bedingungen bewegen sich sowohl der extra- als auch der intrazelluläre Adenosinspiegel zwischen 30 und 300 nM [38].

Für den Konzentrationsausgleich zwischen Intra- und Extrazellulärraum sind Nucleosid-Transporter der SLC29 Familie verantwortlich. Die sogenannten equilibrative nucleoside transporters (ENTs) werden in vier Isoformen unterteilt, ENT1-4, die in den verschiedenen menschlichen Geweben unterschiedlich stark vertreten sind. An allen vier Isoformen kann Adenosin als Substrat fungieren, wobei die ENT1-3 noch weitere Nucleoside und Nucleobasen transportieren können [39]. Während der A<sub>1</sub>R, der A<sub>2A</sub>R und der A<sub>3</sub>R unter basalen Bedingungen aktiviert werden können, gilt dies für den A<sub>2B</sub>R nur bei erhöhten Adenosinspiegeln, die unter pathophysiologischen Bedingungen wie Hypoxie und Ischämie bis auf das 1000 fache ansteigen können [40].

Als Ligand für die pharmakologische Charakterisierung der verschiedenen Subtypen eignet sich das Adenosin aus folgenden Gründen nicht: Zum einen ist Adenosin kein selektiver Ligand, es kann alle Subtypen aktivieren und unterliegt einem regen Metabolismus durch diverse Enzyme. Weiterhin ist als Grundlage für Bindungsexperimente und funktionelle Assays eine Membranpräparation notwendig, bei der aus in den

Membranen vorhandenem ATP und Nukleotidasen Adenosin gebildet wird [33]. Daher galt seit der Entdeckung der Heterogenität der Adenosinrezeptoren der Entwicklung von spezifischen Liganden ein besonderes Interesse. Die Schwierigkeit bestand darin, eine möglichst hohe Selektivität zu erreichen, ohne dabei an Affinität und agonistischer Wirkung zu verlieren. Bis heute bildet Adenosin das Kernstück fast aller Agonisten. Dabei stehen im Großen und Ganzen drei Positionen zur Verfügung, an denen das Molekül modifiziert werden kann: Die Substitution an der N<sup>6</sup>-Position, die 5'-Modifikation und Substitution an der 2-Position sowie Kombinationen dieser Substitutionen. Obwohl die Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte eine enorme Auswahl an Agonisten und Antagonisten lieferten, erreichen bis heute fast alle bekannten Liganden lediglich eine hinreichende Selektivität an den Adenosinrezeptor-Subtypen [33].

Der selektivste bekannte Agonist an A<sub>1</sub>-Rezeptoren ist 2-Chloro-N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosin (CCPA), dieser ist jedoch nur 50-70 fach selektiv gegenüber dem A<sub>3</sub>R. Ein weiterer wichtiger (nicht selektiver) Agonist ist Adenosin-5'-N-ethyluronamid (NECA). NECA besitzt eine hohe Affinität zu allen Subtypen und ist trotz höherer Affinität zu anderen Subtypen bis heute einer der potentesten bekannten Agonisten am A<sub>2B</sub>-Rezeptor. Eine Steigerung der Selektivität am A<sub>3</sub>R konnte durch Derivate wie dem 2-(2-Phenyl)ethynyladenosine-5'-N-ethyluronamid (PENECA) erreicht werden. Agonisten mit einer vergleichbaren Selektivität gegenüber den A<sub>2</sub>R-Subtypen sind bis heute nicht bekannt [33].

Der wohl bekannteste natürlich vorkommende Antagonist an AR ist das Koffein, das der Gruppe der Xanthine zuzuordnen ist. Ebenfalls zu den Xanthinen zählt das 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX), welches eine besonders hohe Affinität zum A<sub>1</sub>R und A<sub>2B</sub>R besitzt, sowie das Theophyllin. Eine weitere Gruppe bilden die Nicht-Xanthine, zu denen beispielsweise der unselektive Agonist 9-Chloro-2-(2-furanyl)-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5-amin (CGS 15943) zählt [33]. Auch für die Antagonisten gilt es, dass bislang nicht für alle Subtypen ausreichend selektive Liganden verfügbar sind. Für Forschungszwecke sind viele Liganden mittlerweile auch in radioaktiv markierter (meist tritierter) Form erhältlich, beispielsweise das A<sub>3</sub>R-selektive 2-Hexyn-1-yl-N<sup>6</sup>-methyladenosin (HEMADO) [41]. Tabelle 1 zeigt die Einteilung und die Bindungsaffinitäten der beschriebenen Liganden an den Adenosinrezeptor-Subtypen sowie die Bindungsaffinitäten weiterer in dieser Arbeit verwendeter Liganden.

**Tabelle 1: Bindungsaffinität diverser Antagonisten und Agonisten an den humanen Adenosinrezeptor-Subtypen (K<sub>i</sub>-Werte in nM, IC<sub>50</sub>- bzw. EC<sub>50</sub>-Werte in nM für den A<sub>2B</sub>-Rezeptor)**

<b>Agonist</b>	<b>A<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>2A</sub></b>	<b>A<sub>3</sub></b>	<b>A<sub>2B</sub></b>	<b>Referenz</b>
<b>unmodifizierte Ribose</b>					
R-PIA	2	860	16	11.200	Klotz et al. (1998)
CCPA	0,8	2.300	42	18.800	Klotz et al. (1998)
HEMADO	330	1.200	1,1	>30.000	Volpini et al. (2002)
<b>5' modifizierte Ribose</b>					
NECA	14	20	6,2	2.400	Klotz et al. (1998)
CGS 21680	290	27	67	88.800	Klotz et al. (1998)
<b>Antagonist</b>	<b>A<sub>1</sub></b>	<b>A<sub>2A</sub></b>	<b>A<sub>3</sub></b>	<b>A<sub>2B</sub></b>	<b>Referenz</b>
<b>Xanthine</b>					
Theophyllin	6.800	1.700	86.000	40.000	Klotz et al. (1998)
DPCPX	3,9	130	4.000	1.000	Klotz et al. (1998)
<b>Non-Xanthine</b>					
SCH 58261	287	0,6	>10.000	5.011	Ongini et al. (2001)

Für die A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>R wurden die Daten aus Bindungsexperimenten gewonnen (K<sub>i</sub>-Werte in nM). Für den A<sub>2B</sub>R wurden cAMP-Assays durchgeführt (IC<sub>50</sub>- bzw. EC<sub>50</sub>-Werte in nM) [33, 42].

### **1.2.3 Pathologie – Adenosinrezeptoren und Krebs**

#### Allgemein

Adenosinrezeptoren spielen eine bedeutende Rolle beim Schutz des Körpers vor Schäden durch Krankheit. So aktiviert Adenosin diverse protektive Mechanismen wie eine Steigerung der Oxygenierung im Gewebe, antiinflammatorische Effekte oder die Angiogenese. Im Extrazellularraum wirkt Adenosin als Immunmodulator und schützt die Gewebe vor Schäden durch überschießende Immunreaktionen [43].

Selektive AR-Liganden könnten helfen, Schmerz, Ischämie, Glaukom, Arthritis, Asthma oder Krebs zu bekämpfen [44]. Adenosinrezeptoren konnten bereits auf vielen Tu-

morzellen nachgewiesen werden, meist werden mehrere Subtypen exprimiert [45-47]. In Schilddrüsenkarzinomzellen werden sogar A<sub>3</sub>R exprimiert, während in gesundem Schilddrüsenewebe keine Rezeptoren dieses Typs nachgewiesen werden konnten [48].

In vielen Tumorgeweben konnten hohe Konzentrationen an Adenosin nachgewiesen werden, was bald die Vermutung nahelegte, dass Adenosin auch in Tumorgeweben eine wichtige Rolle für bestimmte Abläufe in den Zellen spielt. Vor allem im hypoxischen Mikromilieu solider Tumoren steigt der Adenosinspiegel, was die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (T-Killer-Zellen) verhindert. Die erhöhte Adenosinkonzentration scheint via A<sub>3</sub>R ebenfalls verantwortlich für die Inhibierung der Adhäsion aktivierter Killer-Zellen.

Während die Rolle des A<sub>1</sub>R und des A<sub>2B</sub>R für Tumorwachstum und sogenannte Immunevasions-Mechanismen noch nicht ausreichend verstanden ist, scheinen insbesondere die Subtypen A<sub>2A</sub> und A<sub>3</sub> für die Entwicklung von Medikamenten interessant. Der A<sub>2A</sub>R vermittelt viele pro-Tumor Effekte wie eine verstärkte Angiogenese und eine erhöhte Proliferationsrate, weiterhin fördert er diverse Immunevasions-Mechanismen. Hier sind spezifische Antagonisten als anti-Krebs Medikamente denkbar. Der A<sub>3</sub>R spielt eine Rolle bei den Abläufen des Zellzyklus, pro- und antiapoptotische Effekte – je nach Rezeptoraktivität und Tumorzelllinie - wurden berichtet [49].

#### Die Bedeutung des A<sub>1</sub>R für das Tumorgeschehen

Vergleichsweise schlecht charakterisiert ist bislang die Rolle der A<sub>1</sub>R bei der Tumorprogression. Es scheinen aber pro-Tumor Effekte zu überwiegen. In kolorektalen Krebszellen fanden Khoo et al. eine signifikant höhere Rezeptordichte als im peritumoralen gesunden Gewebe, was die Vermutung nahelegt, dass der A<sub>1</sub>R an der Karzinogenese beteiligt sein oder das Tumorwachstum fördern könnte [50]. Eine *in vitro* durchgeführte Untersuchung an humanen Adenokarzinomzellen der Linie HT29 zeigte, dass die Zugabe von ADA sowie von A<sub>1</sub>R-Antagonisten zu einer Inhibition des Tumorwachstums führte, was ebenfalls für eine mögliche Rolle des A<sub>1</sub>R in der Krebsentstehung spricht [51]. Des Weiteren scheint die tumorale Chemotaxis A<sub>1</sub>R vermittelt zu sein; in humanen Melanomzellen konnte eine Stimulation der Chemotaxis durch AR-Agonisten an stabil mit A<sub>1</sub>R cDNA transfizierten CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) nachgewiesen werden. Eine Antagonisierung dieses Rezeptor-Subtyps inhibierte diesen Effekt

[52]. In hormonsensitiven Brustkrebszellen vermittelt der  $A_1R$  den proliferativen Effekt von Estradiol durch Regulation des Estradiol-Rezeptor-alpha, welcher eine kritische Rolle beim Tumorwachstum spielt [53]. An einigen humanen Zelllinien konnten jedoch auch  $A_1R$ -vermittelte antiproliferative Effekte nachgewiesen werden [54, 55].

#### Die Bedeutung des $A_{2A}R$ für das Tumorgeschehen

Die Aktivierung von  $A_{2A}R$  unterstützt das Tumorwachstum durch immunsuppressive Effekte [49]. Die Akkumulation von extrazellulärem Adenosin im hypoxischen Mikromilieu solider Tumoren sowie extrazelluläres, von regulatorischen T-Zellen gebildetes Adenosin führt zur Inhibierung von  $CD8(+)$  und  $CD4(+)$  Antitumor-T-Zellen und NK-Zellen [56]. Durch die Aktivierung von  $A_{2A}R$  auf T-Zellen im adenosinreichen Tumorgewebe steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel, welcher für den immunsuppressiven Effekt verantwortlich ist. Bei genetischer Eliminierung oder Antagonisierung der  $A_{2A}R$  konnte eine Verlangsamung des Tumorwachstums sowie die Zerstörung von Metastasen und der Schutz vor Neovaskularisation (notwendig für weiteres Tumorwachstum und Metastasierung) gezeigt werden [57, 58].  $A_{2A}R$ -Antagonisten wurden bereits in der Therapie von Parkinson erfolgreich angewandt und könnten auch bei der Immuntherapie von Tumorerkrankungen hilfreich sein [47]. Andererseits sind auch  $A_{2A}$ -Agonisten in der Krebstherapie denkbar. Der  $A_{2A}$ -vermittelte vasodilatative Effekt könnte helfen, Chemotherapeutika an den gewünschten Wirkort (das hypoxische Tumorparenchym) zu transportieren [49].

#### Die Bedeutung des $A_{2B}R$ für das Tumorgeschehen

Aktiviert bei hohen Adenosinspiegeln, induziert der  $A_{2B}R$  die Apoptose von arteriellen glatten Muskelzellen sowie kardialen Fibroblasten. Jedoch wird das Wachstum von Endothelzellen und peripheren Blutgefäßen begünstigt. Dies könnte mitverantwortlich sein für Tumorwachstum und -progression durch Induktion der Neovaskularisation. So konnte in einer Glioblastomzelllinie eine Hypoxie-induzierte Hochregulation von  $A_{2B}R$  nachgewiesen werden. Dies legt den Gedanken nahe, dass auch hier das weitere Tumorwachstum durch eine Limitierung der Sauerstoffversorgung via Blockade dieses Rezeptorsubtyps verhindert werden könnte [49]. Auf diversen humanen Kolonkarzinomzellen fand sich ebenfalls eine Überexpression dieses Rezeptortyps im Gegensatz zu gesunder Mukosa, hochreguliert vor allem unter hypoxischen Wachstumsbedingun-

gen. Eine Applikation des  $A_{2B}R$ -Antagonisten MRS1754 inhibierte das Tumorstadium signifikant [59]. Weiterhin findet eine Aktivierung von  $A_{2B}R$  (und  $A_{2A}R$ ) auf Antitumor-T-Zellen durch die hohen Adenosinspiegel in der Tumor-Umgebung statt. Die Aktivierung dieser Rezeptor-Subtypen entfaltet eine immunsuppressive Wirkung. Im Mausexperiment konnten Cekic et al. [60] eine Verlangsamung des Wachstums von Harnblasen- und Brustkrebstumoren nach  $A_{2B}R$ -Blockade durch intermittierende intratumorale Injektionen von Antagonisten nachweisen. Die Metastasierung von Brustkrebs in die Lunge konnte ebenfalls deutlich reduziert werden [60].

### Die Bedeutung des $A_3R$ für das Tumorgeschehen

Im Tiermodell konnte bereits eine Wirksamkeit der  $A_3R$ -Agonisten in der Bekämpfung von Tumoren nachgewiesen werden; sie wurden bereits für präklinische und klinische Studien zugelassen [52]. Eine Aktivierung von  $A_3R$  durch Adenosin sowie synthetische Agonisten resultiert in einer Inhibition des Tumorstadiums – ein Effekt, der nicht auf „normale“ Körperzellen zutrifft [61]. Die Inhibition der Telomerase-Aktivität und das Aussetzen des Zellzyklus in der  $G_0/G_1$ -Phase führen zu dem zytostatischen Effekt [62] [63]; ebenso involviert ist der sogenannte Wnt-Signalweg (ein Signalprotein, welches eine Rolle bei Embryogenese und Tumorstadium spielt).  $A_3R$ -Agonisten hemmen via  $A_3R$  die Zellproliferation im Tumorgewebe durch Herunterregulation dieses Signalwegs [64].  $A_3R$  wurden bereits in vielen Tumoren und in hoher Dichte nachgewiesen. In kolorektalen Adenokarzinomen fand man sogar einen Zusammenhang zwischen der Höhe der Expression an  $A_3R$  und der Schwere der Erkrankung [46, 49]. In vielen Tumorgeweben ist der  $A_3R$  im Gegensatz zu gesundem Gewebe überexprimiert; in Lymphknotenmetastasen konnte sogar eine noch höhere Dichte als im Primärtumor nachgewiesen werden [65]. Fishman et al. vermuten in der Freisetzung von niedrig dosiertem Adenosin durch Muskelzellen einen Grund für die Seltenheit von Metastasen in der Muskulatur, wobei der antiproliferative Effekt von Adenosin hauptsächlich via  $A_3R$  vermittelt wird [62]. Andererseits konnten Morello et al. in einer Studie nachweisen, dass der  $A_3R$ -selektive Agonist CI-IB-MECA in einer humanen Schilddrüsenkrebs-Zelllinie seinen Antitumor-Effekt unabhängig vom  $A_3R$ - (oder  $A_{2A/B}$ - oder  $A_1$ -) vermittelten Signalweg ausübt [48]. Paradoxiertweise scheinen auch  $A_3R$ -Antagonisten als Therapeutika in Frage zu kommen, obwohl je nach Krebszelllinie und/oder Art des Tumors auch Pro-tumor-Effekte beschrieben sind [52].

Während die Forschung der letzten Jahre vielversprechende Ergebnisse geliefert hat und erste klinische Studien laufen, bleiben bislang noch viele Fragen offen. Der Erfolg in der Klinik der Krebsbekämpfung bleibt abzuwarten.

## **2 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT**

Die meisten unserer Körperzellen exprimieren Adenosinrezeptoren. Ob dies auch auf die Tumorzelllinien HCC1806, HCC1937, SiHa, Ishikawa und HEC-1-A zutrifft und wenn ja, welche Subtypen auf den Zellen vorhanden sind und in welcher Quantität, soll im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht werden.

Vorausgesetzt es sind solche Rezeptoren vorhanden, wie wirkt sich die Stimulation oder Antagonisierung der Rezeptoren auf Tumorwachstum und Apoptoseverhalten in vitro aus und wird ein möglicher Effekt durch bestimmte Todesliganden oder Chemotherapeutika verändert? Diese Fragen sollen hier beantwortet werden.

Die Oberflächenmoleküle CD 39 und CD 73 sind verantwortlich für Immunoevasionsmechanismen mancher Tumoren. Mittels Durchflusszytometrie soll herausgefunden werden, ob sich die Expression dieser Ektonukleotidasen auf den untersuchten Krebszelllinien ändert.

Auf diesem Wege soll diese Arbeit einen Ausblick geben auf mögliche neue therapeutische Ansätze in der Krebsbekämpfung, die den Adenosinrezeptor als pharmakologisches Target im Focus haben.

### 3 MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien und Radiochemikalien

<b>Substanz/Reagenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
[ <sup>32</sup> P] α-ATP	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig/DE
[ <sup>3</sup> H] CCPA (2-Chloro- <i>N</i> <sup>6</sup> -cyclopentyladenosin)	Amersham Biosciences Europe, Freiburg/DE
[ <sup>3</sup> H] HEMADO (2-Hexyn-1-yl- <i>N</i> <sup>6</sup> -methyladenosin)	Amersham Biosciences Europe, Freiburg/DE
[ <sup>3</sup> H] NECA (5'- <i>N</i> -Ethyl-carboxamido-adenosin)	Amersham Biosciences Europe, Freiburg/DE
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Fluka Biochemica, Buchs/Schweiz
Adenosin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/DE
Adenosindesaminase (ADA)	Roche, Mannheim/DE
Adenosintriphosphat (ATP)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/DE
Alumina-Säulen	Sigma, Steinheim/DE
Beriglobinlösung	Novartis, Marburg/DE
BioRad (Bradford-Reagenz)	BioRad Laboratories, München/DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Ipswich/USA
BrdU-Kit	Roche, Mannheim/DE
cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/DE
CCPA (2-Chloro- <i>N</i> <sup>6</sup> -cyclopentyladenosin)	Sigma, Steinheim/DE
CGS 21680 (2-[p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino]adenosin-5'- <i>N</i> -ethyluronamid)	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln/DE
Cisplatin	Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
Creatinkinase	Roche, Mannheim/DE
Doxorubicin	Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
Dowex-1, Cl <sup>-</sup> Form	Sigma, Steinheim/DE
DPCPX (1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthin)	Amersham Biosciences Europe, Freiburg/DE
FACS Clean	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
FACS Flow	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
FACS Rinse	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA

GTP	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/DE
Human TRAIL	PeptoTech , Rocky Hill/USA
Kristallviolett (C.I. 42555) Indikator	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/DE
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt/DE
NECA (adenosine-5'-N-ethyluronamid)	Biotrend AG, Wangen/Schweiz
Phosphocreatin	Roche, Mannheim/DE
Phosphodiesterasehemmer Ro-20-1724	TOCRIS Bioscience, Ellisville/USA
R-PIA ((R)-N <sup>6</sup> -(1-Methyl-2-phenylethyl)-adenosin)	RBI Research Biochemicals, Natick/USA
SuperFasLigand <sup>TM</sup>	Enzo Lifesciences, Farmingdale/USA
Theophyllin	Sigma, Steinheim/DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Applichem, Darmstadt/DE
Trypanblau	Sigma, Steinheim/DE
Zinkacetat-Dihydrat	Sigma, Steinheim/DE

### 3.1.2 Antikörper

Antikörper	Herkunft; Eigenschaften	Bezugsquelle
Goat-anti-mouse FITC	Ziege; Sekundärantikörper, Verdünnung 1:500	Immunotools, Friesoythe/DE
IgG1-PE	Maus, Klon MOPC-21; Isotypantikörper, Verdünnung 1:100	Immunotools, Friesoythe/DE
Mouse-anti-human CD39-FITC	Maus, Klon A1; Verdünnung 1:100	CALTAG Laboratories, Burlingame/USA
Mouse-anti-human CD73-PE	Maus, Klon AD2; Verdünnung 1:50	BD Biosciences Pharmingen, San Diego/USA

### 3.1.3 Verbrauchsmaterial, Gerätschaften

Geräte	Hersteller
1450 MicroBeta Trilux Liquid Scintillation and Luminescence Counter	Wallac/PerkinElmer, Freiburg/DE
Biofuge B	Heraeus, Hanau/DE
Brutschrank	Thermo Electron GmbH, Dreieich/DE

Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills/USA
ELISA-reader „sunrise“	TECAN, Crailsheim/DE
FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes/USA
Gerfrierschränke	Liebherr international, Bulle/Schweiz Thermo Electron GmbH, Dreieich/DE Philipp Kirsch GmbH, Offenburg/DE Julabo, Seelbach/DE
Heizwasserbad	
Kühlschrank	Liebherr international, Bulle/Schweiz
Mikroskop (Zellkultur)	Leica, Solms/DE
Minishaker MS1	IKA Janke und Kunkel, Staufen/DE
Neubauer Improved Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/DE
Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim/DE
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg/DE Gilson International, Limburg/DE
Shaker Polymax 1040	Heidolph, Schwabach/DE
β-Counter LS 1801	Beckman Coulter, Krefeld/DE
Sterile Werkbank	Heraeus, Hanau/DE BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen/DE Air Liquide, Düsseldorf/DE
Stickstofftank	
Tischzentrifuge 5417	Eppendorf AG, Hamburg/DE
Ultrazentrifuge LE70 - Ti70 Rotor	Beckman Coulter, Krefeld/DE
Vortex Probenschüttler	VWR, Darmstadt/DE
Waage	Sartorius AG, Göttingen/DE
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg/DE
Zentrifuge Avanti J25 - JA17 Rotor	Beckman Coulter, Krefeld/DE

### **Verbrauchsmaterial**

96-well Zellkulturplatten
Cutasept Desinfektionsmittel
Eppendorf-Reaktionsgefäße
Ethanol
FACS-Röhrchen

### **Hersteller**

TPP, Trasadingen/Schweiz
Bode, Hamburg/DE
Greiner Bio-One, Frickenhausen/DE
Apotheke der Universitätsklinik Würzburg
Hartenstein, Würzburg/DE

Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen/DE
Handschuhe	Cardinal Health, Dublin/Irland Sempermed, Wien/Österreich
Kombitips	Eppendorf, Hamburg/DE
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde/Dänemark
Luminometerplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen/DE
Petrischalen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe/DE
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht/DE
Poly-Prep Chromatographiesäulen	BioRad Laboratories, München/DE
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen/DE
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen/Schweiz

### 3.1.4 Zelllinien

- HCC1806 (human, Brustdrüse, TNM-Stadium IIB, akantholytisches Plattenepithelkarzinom) über [www.icbp.lbl.gov](http://www.icbp.lbl.gov)
- HCC1937 (human, Brustdrüse, TNM-Stadium IIB, primär duktales Karzinom) über [www.icbp.lbl.gov](http://www.icbp.lbl.gov)
- HEC-1-A (human, Uterus, Endometrium, TNM-Stadium IA, Adenokarzinom) über [www.lgcpromochem-atcc.com](http://www.lgcpromochem-atcc.com)
- Ishikawa (human, Uterus, Endometrium, Adenokarzinom) über [www.hpacultures.org.uk](http://www.hpacultures.org.uk)
- SiHa (human, Zervix, Plattenepithelkarzinom, Stadium II, HPV16-infiziert) über [www.lgcpromochem-atcc.com](http://www.lgcpromochem-atcc.com)
- CHO(A<sub>2B</sub>) (Chinese Hamster Ovary, stabil transfiziert mit humanen A<sub>2B</sub>-Rezeptoren, zur Verfügung gestellt von Prof. K.N. Klotz und Fr. Sonja Kachler, Würzburg) [66]

Abbildung 4 zeigt exemplarisch das mikroskopische Bild einer der verwendeten Zelllinien.

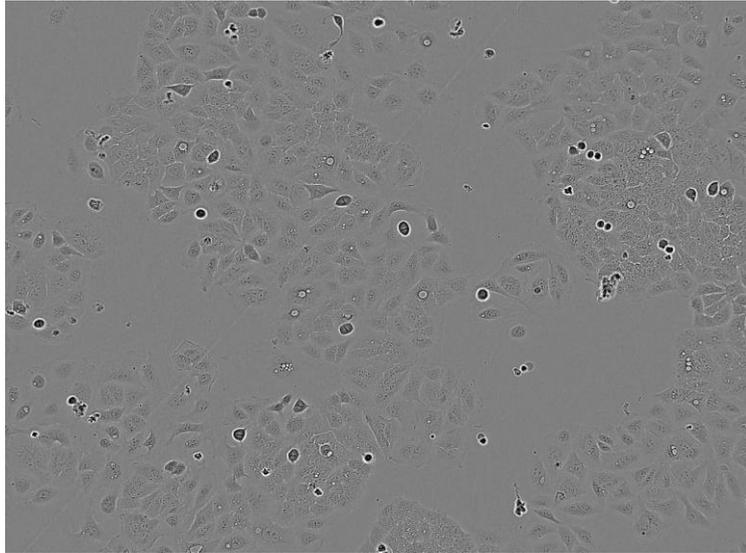


Abbildung 4: Mikroskopische Darstellung von Ishikawa-Zellen 48 Stunden nach der Aussaat [67]

### 3.1.5 Medien und Medienzusätze, Puffer, Detachments

#### Medien und Zusätze

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Fötale Kälberserum (FCS)

Penicillin/Streptomycin (P/S)

RPMI 1640

Kulturmedium

Einfriermedium

#### Bezugsquelle/Zusammensetzung

Carl Roth GmbH, Karlsruhe/DE

Biochrom, Berlin/DE

PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich

PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich

RPMI 1640 mit 10% FCS und 1% P/S

70% Kulturmedium, 20% FCS, 10% DMSO

#### Puffer

Dulbecco's PBS

5/2 Puffer (Lysepuffer)

FACS-Puffer

TME-Puffer

Tris-Puffer (50mM; pH 7,4)

#### Bezugsquelle/ Zusammensetzung

PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich

5 mM Tris/HCl, 2mM EDTA, mit NaOH auf pH 7,4 titriert

2% FCS in PBS

50mM Tris, 10nM MgCl, 1mM EDTA), titriert auf pH 8,25

Applichem, Darmstadt/DE

**Detachment**

Accutase

Trypsin EDTA

**Bezugsquelle**

PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich

PAA Laboratories GmbH, Pasching/Österreich

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Die Kultivierung eukaryonter Zellen

#### Allgemeine Kulturbedingungen

HCC1806-, HCC1937-, HEC-1-A-, SiHa- und Ishikawa-Zellen wurden in Petrischalen oder Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit 10% FCS (fötales Kälberserum) und 1% P/S (Penicillin/Streptomycin) verwendet.

#### Passagieren von Zellen

Die Dichte der adhärent wachsenden Tumorzellen wurde alle zwei bis drei Tage unter dem Mikroskop kontrolliert. Je nach Zeitplan und Proliferationsverhalten wurde entweder das Nährmedium gewechselt, oder die Zellen wurden gesplittet, sofern der Zellrasen annähernd den Flaschenboden bedeckte. Das Splitten der Zellen erfolgte je nach Wachstumsverhalten in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:8 alle 2-4 Tage.

Von der dicht bewachsenen Platte wurde mit Hilfe von Saugpumpe und Pasteurpipette das Nährmedium abgesaugt. Die Zellen wurden zwei mal mit ausreichend DPBS gewaschen, um Reste von FCS zu entfernen, dieses wurde abgesaugt und anschließend wurden 4 ml Trypsin/EDTA (0,25%) auf die Zellen gegeben. Trypsin (eine Protease) spaltet Peptidbindungen nach den Aminosäuren Arginin und Lysin und greift so unter anderem die Adhäsionsmoleküle der Zellen an. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, die Membranproteine stabilisieren. Dies dient der Ablösung der adhärent wachsenden Zellen von der Kulturschale. Zur Inkubation kamen die Platten für einige Minuten in den Brutschrank. Wenn unter dem Mikroskop zu beobachten war, dass sich der Zellrasen nach dem Abklopfen der Platten langsam löste, wurde die Reaktion mit 5 ml Nährmedi-

um abgestoppt. Alternativ zu Trypsin/EDTA kann auch Accutase verwendet werden (ein Gemisch von Proteasen und Kollagenasen). Accutase ist weniger zellschädigend und birgt weniger Gefahren von Kontaminationen, ist jedoch deutlich teurer und zeitaufwändiger in der Anwendung.

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der sterilen Arbeitsbank, um Kontaminationen mit Keimen zu vermeiden.

Nach dem Ablösen wurde das Zell-Nährmedium-Trypsin-Gemisch 3 Minuten bei Raumtemperatur und 1500 rotations per minute (rpm) zentrifugiert. Die Zellen setzten sich als Pellet ab, der Überstand konnte abgesaugt und das Pellet in Nährmedium resuspendiert werden. Je nach Zelldichte der Ausgangsplatte sowie Wachstumsverhalten wurde die Zellsuspension auf mehrere neue Platten verteilt und mit der entsprechenden Menge frischem Nährmedium aufgefüllt.

#### Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die dicht bewachsenen Zellkulturschalen wie oben beschrieben gewaschen, die Zellen abgelöst und zentrifugiert. Die Zellen setzten sich als Pellet ab, der Überstand konnte abgesaugt werden und die Zentrifugenröhrchen wurden auf Eis gestellt. Nun wurde das Pellet in Einfriermedium aufgenommen (bestehend aus Standardnährmedium mit 20% FCS und 10% DMSO, zur Vermeidung von Kristallbildung beim Einfrieren). Für die Zellen einer großen Platte wurden 3 ml Einfriermedium verwendet und auf 3 vorgekühlte Kryoröhrchen à 1 ml verteilt. Die Röhrchen wurden zum langsamen Einfrieren zunächst auf Eis gestellt, dann für 2-3 Stunden im Styroporhalter (zum langsameren Durchkühlen) im -20°C kalten Gefrierschrank gelagert und anschließend in den -80°C kalten Gefrierschrank überführt. Zur Langzeitaufbewahrung der Tumorzellen wurden die Kryoröhrchen nach zwei Tagen Lagerung im -80°C kalten Gefrierschrank in flüssigen Stickstoff überführt.

#### Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen ebenfalls zunächst auf Eis gestellt, dann in der Hand vorgewärmt und in einigen Tropfen warmem Nährmedium suspendiert. Nach der Überführung in ein Zentrifugenröhrchen wurden weitere 10 ml Nährmedium hinzugefügt und die Suspension 4 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand

abgesaugt worden war, wurde das Pellet wiederum in einer entsprechenden Menge Nährmedium aufgenommen und auf die gewünschte Platten-/Flaschengröße verteilt.

### **3.2.2 Die Membranpräparation**

Alle Materialien und Puffer wurden zum Schutz der Membranproteine vor Abbau auf Eis vorbereitet und gekühlt.

Die Zellkulturplatten wurden zweimal mit unsterilem PBS-Puffer pH 7,4 gewaschen, mit 5 ml 5/2 Puffer (Lysepuffer; 5 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,4) mit dem Gummischaber abgelöst und in ein Glasgefäß überführt.

#### Weiteres Prozedere zur Vorbereitung der Zellen für den Radioliganden-Bindungsassay

Die Zellsuspension wurde 2x15 Sekunden bei maximaler Umdrehungszahl auf Eis mit dem Ultraturax bearbeitet, wodurch die Integrität der Zellstrukturen zerstört wurde. Zunächst folgte eine Zentrifugation bei 3200 rpm und 4°C für 10 Minuten (JA17-Rotor) zur Abtrennung von Zelltrümmern und Zellkernen. Der Überstand wurde in der Ultrazentrifuge (70Ti-Rotor) für 40 Minuten bei 37.000 rpm und 4°C zentrifugiert, dabei wurden die Zellmembranen vom Cytosol und dem Lysepuffer getrennt. Das Pellet wurde in einer entsprechenden Menge Tris-Puffer (50 mM; pH 7,4) resuspendiert und im Glaspotter homogenisiert.

#### Weiteres Prozedere zur Vorbereitung der Zellen für den Adenylatcyclaseassay

Die Zerkleinerung der Zellbestandteile erfolgte 2x5 Sekunden lang auf Eis mit dem Ultraturax mit anschließender Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (70Ti-Rotor) bei 27.000 rpm und 4°C für 25 Minuten. Das Pellet wurde nun in 50 mM Tris-Puffer aufgenommen und mit Spritze oder Glaspotter homogenisiert.

Der Proteingehalt der jeweiligen Suspension wurde im Proteinassay (s.u.) bestimmt.

### 3.2.3 Der Proteinassay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte im Photometer nach der Bradford-Methode unter Verwendung von BioRad Assay-Reagenz.

Der Test beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250, einem Farbstoff, der in saurer Lösung an Proteine bindet. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Stoffes von 465 nm auf 595 nm verschoben. Zunächst wurde mit bovinem Serumalbumin (BSA) in verschiedenen Verdünnungen auf der Basis von Messwerten im Photometer eine Standardkurve als Eichkurve erstellt. Hierfür wurde BSA in einer Konzentration von 0, 2, 4, 8 und 10 µg/ml im Verhältnis 1:5 mit verdünntem BioRad Reagenz im Doppelansatz in Küvetten angesetzt (Verdünnung mit H<sub>2</sub>O nach Herstellerangaben).

Die Messung der eigentlichen Proben erfolgte ebenfalls im Photometer bei 595 nm. Es wurden zwei verschiedene Verdünnungen in 50 mM Tris-Puffer in einem geeigneten Konzentrationsbereich hergestellt und in 1:5 verdünntem Bio-Rad Reagenz gemessen. Anhand der Eichkurve und mit Hilfe des Verdünnungsfaktors konnte so der Proteingehalt der zu messenden Proben ermittelt werden.

### 3.2.4 Der Bindungsassay

Mit Hilfe von spezifischen radioaktiv markierten Liganden erfolgte die Testung der Zelllinien SiHa, Ishikawa, HEC-1-A, HCC1937 und HCC1806 auf A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren. Für den Nachweis von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren steht bisher kein geeigneter Radioligand zur Verfügung.

Die Zellmembranen wurden wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben frisch präpariert, zentrifugiert und der Proteingehalt nach Punkt 3.2.3 bestimmt.

Die Membranen wurden mit dem jeweiligen Assaypuffer (Tris-Puffer für die A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Rezeptorbindung, TME-Puffer für die A<sub>3</sub>-Rezeptorbindung) verdünnt. Für jeden Rezeptorsubtyp wurde eine Konzentration von 20 µg Membranprotein/50 µl und eine von 50 µg Membranprotein/50 µl hergestellt. Es wurden 5 µl 10%ige Adenosindesaminase (ADA; ca. 0,5 Units pro Röhrchen) pro ml Membran hinzugegeben.

ADA ist ein Enzym aus dem Purinstoffwechsel, das die Desaminierung von Adenosin und 2'-Desoxyadenosin zu den entsprechenden Inosinnukleosiden katalysiert [67]. Endogenes Adenosin in den präparierten Membranen (s. Punkt 1.2.2) könnte bei der Untersuchung spezifischer Liganden oder bestimmter AR-Subtypen die Ergebnisse verfälschen, weshalb es notwendig ist, dieses zu beseitigen. ADA wird den Membransuspensionen – abgestimmt auf die Membran- bzw. Proteinmenge – hinzugefügt, sodass die Ergebnisse im Idealfall dann nur noch Informationen über die Effekte des verwendeten Liganden bzw. über den gewünschten AR-Subtyp liefern.

Als spezifischer Radioligand für den A<sub>1</sub>R wurde [<sup>3</sup>H]CCPA, für den A<sub>2A</sub>R [<sup>3</sup>H]NECA und für den A<sub>3</sub>R [<sup>3</sup>H]HEMADO verwendet. Die unspezifische Bindung an den A<sub>1</sub>R wurde in Gegenwart einer hohen Konzentration des Antagonisten Theophyllin bestimmt, für die A<sub>2A</sub>R und A<sub>3</sub>R wurde der Agonist R-PIA verwendet (s. Tab. 1).

Die Proben wurden unterteilt in:

- Totale Bindung (TB)
- Unspezifische Bindung (UB)
- Total Counts (TC) zur Kontrolle der eingesetzten Counts

Zur Bestimmung der TC wurden erst nach dem Waschen der Mikrotiterplatten 25 µl des jeweiligen Radioliganden pipettiert, damit die Radioaktivität durch den Waschschrift nicht verloren geht.

Weiterhin wurde nach dem in Tabelle 2 dargestelltem Pipettierschema verfahren.

**Tabelle 2: Pipettierschema für totale und unspezifische Bindung an A<sub>1</sub>-, A<sub>2A</sub>- und A<sub>3</sub>-Rezeptoren. Es wurden 20 oder 50 µg Membranprotein je Probe in 50 µl Puffer eingesetzt. Die (Radio-)liganden wurden ebenfalls in jeweils 50 µl Puffer hinzupipettiert.**

<b>Rezeptor</b>		<b>Puffer</b>	<b>(Radio-)Ligand</b>	<b>Endkonzentration im Assay</b>
<b>A<sub>1</sub></b>	TB	100 µl Tris	[ <sup>3</sup> H]CCPA	1 nM
	UB	50 µl Tris	Theophyllin	1 mM
			[ <sup>3</sup> H]CCPA	1 nM
<b>A<sub>2</sub></b>	TB	100 µl Tris	[ <sup>3</sup> H]NECA	10 nM
	UB	50 µl Tris	R-PIA	100 µM
			[ <sup>3</sup> H]NECA	10 nM
<b>A<sub>3</sub></b>	TB	100 µl TNM	[ <sup>3</sup> H]HEMADO	1 nM
	UB	50 µl TNM	R-PIA	100 µM
			[ <sup>3</sup> H]HEMADO	1 nM

Der Ansatz erfolgte in Mikrotiterplatten mit Filter in einem Gesamtansatz von 200 µl pro Well. Alle Wells wurden vor dem Ansatz zur Benetzung mit 10 µl Puffer abgesättigt.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden die nicht radioaktiv markierten Antagonisten in einer so hohen Konzentration eingesetzt, dass sie über eine kompetitive Hemmung nahezu alle spezifischen Bindungsstellen auf den Membranen absättigten und der radioaktiv markierte Ligand nicht binden konnte. Die Filterplatten wurden auf dem Minishaker kurz geschüttelt und anschließend 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert [68].

Nach Inkubationsende wurden die Platten auf der Absaugvorrichtung abgesaugt, mit 200 µl kaltem Puffer pro Well gewaschen und erneut abgesaugt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, bevor in die Wells für die TC je 25 µl des Radioliganden pipettiert wurden. Die Platten wurden dann im Trockenschrank 30 Minuten bei 40°C getrocknet. Anschließend wurden in jedes Well 20 µl Szintillator pipettiert und die Proben 5 Minuten pro Well im Wallac 1450 Microbeta Trilux Scintillation Counter ausgezählt.

Aus den Ergebnissen in Counts per minute (cpm) wurden jeweils Mittelwerte (MW) für die TB und die UB gebildet und mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität (SR) der Radioliganden in fmol Rezeptor/mg Protein umgerechnet, wobei die SR für [<sup>3</sup>H]CCPA 37 cpm/fmol, für [<sup>3</sup>H]NECA 16 cpm/fmol und für [<sup>3</sup>H]HEMADO 20 cpm/fmol betrug.

Folgende Berechnungen wurden durchgeführt:

$$MW(TB) [cpm] - MW(UB) [cpm] = SB [cpm]$$

**Formel 1: Errechnung der spezifischen Bindung.** MW=Mittelwert, TB=Totale Bindung, UB=Unspezifische Bindung, cpm=Counts per minute, SB=Spezifische Bindung.

Die TB wurde jeweils in Triplikaten, die UB in Zweifachwerten pipettiert. Die Experimente wurden mehrfach wiederholt.

$$SB [cpm] \div SR \left[ \frac{cpm}{fmol} \right] = x [fmol]$$

**Formel 2: Errechnung der Rezeptormenge.** SB=Spezifische Bindung, cpm=Counts per minute, SR=Spezifische Radioaktivität, fmol=Femtomol, x=Rezeptormenge in eingesetzter Proteinmenge

Per Dreisatz wurden die Ergebnisse in fmol Rezeptor/mg Protein umgerechnet.

### 3.2.5 Der Adenylatcyclaseassay

Die direkte Bestimmung des Vorhandenseins von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren ist aufgrund zu geringer Affinitäten der bislang bekannten Liganden mittels Radioliganden-Bindungsassay nicht möglich [66]. Der Adenylatcyclaseassay jedoch eignet sich zum Nachweis oder Ausschluss dieses Rezeptor-Subtyps. Der Versuch basiert auf einer bereits 1976 von Jakobs et al. veröffentlichten Methode [69].

Der Cyclaseassay beruht auf einem indirekten Nachweis von Adenosinrezeptoren mittels Messung der Adenylatcyclase-Aktivität durch Einsatz von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP. Bei Stimulation mit spezifischen Adenosinrezeptor-Liganden wird das [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP in cyclisches [<sup>32</sup>P]AMP umgesetzt, welches dann im  $\beta$ -Counter gemessen werden kann. Folglich wird die Funktion des jeweiligen AR nachgewiesen, nämlich die durch Bindung von Agonisten ausgelöste Stimulation bzw. Hemmung der Adenylatcyclase mit resultierendem cAMP- Anstieg oder -Abfall.

Das [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP wurde mittels Anionenaustausch-Chromatographie von Verunreinigungen durch AMP, cAMP und ADP getrennt (Durchführung: Sonja Kachler, Würzburg). Hierfür wurden Biorad Poly-Prep Chromatographiesäulen verwendet, sowie DOWEX-1-Matrix (Cl<sup>-</sup>-Form; 1x200). Die Säulen wurden mit 800  $\mu$ l der Matrix befüllt und anschließend mit 5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Nun wurde das erworbene [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP (250  $\mu$ Ci) auf die Säule pipettiert, das Gefäß mit 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O ausgespült und dieses ebenfalls auf die Säule pipettiert. Es folgte die Spülung mit 2x5 ml HCl pH 1,5 (0,0316 N) und 150  $\mu$ l 0,25 N HCl. Die Elution erfolgte mit 3x1 ml 0,25 N HCl in 3 Röhrchen. In jede der 3 Fraktionen wurde 1  $\mu$ l kaltes ATP (10 mM) zur Stabilisierung pipettiert. Zur Neutralisation wurde 50% (w/w) Triethanolamin (Fa. Sigma) eingesetzt und so lange hinzugefügt, bis der pH  $\leq$  7 entsprach. Die pH-Kontrolle erfolgte mit pH-Papier (der pH sollte dabei eher gegen sauer tendieren, da ATP sich im alkalischen Bereich schnell zersetzt). Nun wurde je 1  $\mu$ l der Fraktionen im Counter gezählt, die Fraktionen aliquotiert und bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Die Präparation der Membranen erfolgte frisch am Tag des Assays wie in 3.2.2 beschrieben, der Proteingehalt der Zellsuspensionen wurde nach Punkt 3.2.3 bestimmt.

Für den Assay wird ein 5x Reaktionsmix (REA-Mix) benötigt (Zusammensetzung s. Tab. 3).

**Tabelle 3: Zusammensetzung des 5x REA-Mix für 50 ml**

<b>Substanz</b>	<b>finale Konzentration</b>	<b>im Assay</b>	<b>ml</b>
cAMP	0,5 mM	0,1mM	2,5
BSA	1%	0,2%	5
GTP	50 $\mu$ M	10 $\mu$ M	2,5
ATP	0,5 mM	0,1 mM	2,5
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	1 mM	2,5
Tris	250 mM	50 mM	12,5
Ro-20-1742	2,5 mM	0,5 mM	1,25

Ro-20-1724 (ein Phosphodiesterasehemmer) wurde für den Assay in DMSO gelöst und das Substanzgemisch mit H<sub>2</sub>O auf 50 ml aufgefüllt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fr. Sonja Kachler, Würzburg).

Für den Einsatz im Assay wurde ein 2x REA-Mix hergestellt, für 1 ml Ansatz bestehend aus:

- 400 µl 5x REA-Mix
- 5,9 mg Phosphocreatin
- 0,8 mg Creatinkinase
- [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP, ca. 200.000 Counts pro Probe
- Aufgefüllt auf 1 ml mit H<sub>2</sub>O

Der Ansatz erfolgte in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen auf Eis. Für jede Membran bzw. Zelllinie wurden pro Versuch 3 Basalwerte und 3 stimulierte Werte bestimmt, zusätzlich 2 Blanks (Kontrollwert ohne Zellmembranen) und 2 Total Counts (TC, zur Kontrolle der eingesetzten Radioaktivität).

Der Ansatz für die stimulierten Werte bestand aus 10 µl Agonist, 10 µl H<sub>2</sub>O, 50 µl 2x REA-Mix und 30 µl Membran bei bestimmter Proteinmenge. Bei Verwendung mehrerer Liganden wurde das H<sub>2</sub>O durch den jeweiligen Antagonisten ersetzt.

Der Ansatz für die Basalwerte setzte sich aus 20 µl H<sub>2</sub>O, 50 µl 2x REA-Mix und 30 µl Membran zusammen.

Für die Blanks wurden 50 µl H<sub>2</sub>O und 50 µl 2x REA-Mix pipettiert, für die TC zum Schluss nur 50 µl 2x REA-Mix.

Tabelle 4 zeigt die benötigten Endkonzentrationen für die spezifischen Liganden.

**Tabelle 4: Endkonzentrationen der Agonisten und Antagonisten im Adenylatcyclaseassay**

<b>Agonist/Antagonist</b>	<b>finale Konzentration (µM)</b>
NECA	100
CGS	10
DPCPX	10
CCPA	1

Der Inhalt der Eppendorf-Röhrchen wurde einzeln auf dem Vortex-Schüttler durchmischt, es folgte die Inkubation für 20 Minuten bei 37°C. Zum Abstoppen der Reaktion

wurden die Eppendorf-Gefäße auf Eis gestellt und je 400 µl 125 mM Zinkacetat sowie 500 µl 144 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben. Nach ca. 10 Minuten führte dies zur Bildung von Zn<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, der Niederschlag fiel zusammen mit dem ADP und ATP aus und konnte anschließend in der Tischzentrifuge abzentrifugiert werden (bei Raumtemperatur, 5 Minuten, max. Speed). Somit konnte das durch die Adenylatcyclaseaktivität entstandene cAMP weitgehend von den anderen Nukleotiden abgetrennt werden. 800 µl des Überstandes wurden nun auf die Alumina Chromatographiesäulen überführt, nachdem diese zuvor mit 2x5 ml 100 mM Tris-Puffer äquilibriert worden waren. Es folgte die Elution in die untergestellten Szintillations-Röhrchen mit 2x2 ml 100 mM Tris-Puffer. Durch Bindung an das Säulenmaterial wurden auch weitere Reste der unerwünschten Nukleotide entfernt.

Die Chromatographiesäulen müssen zur Reinigung mit 2x5 ml 100 mM Tris-Puffer nachgespült werden. Anschließend wurde die Radioaktivität des Eluats im β-Counter durch Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen. Die Ergebnisse werden in cpm (Counts per minute) angegeben und korrelieren direkt mit der Menge an gebildetem cAMP.

### **3.2.6 Die Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellen wurden wie in Punkt 3.2.1 beschrieben unter der sterilen Arbeitsbank abgelöst, zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Das so entstandene Pellet wurde mit 5 ml Medium resuspendiert. In einem Well wurden 20 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt und ein Teil der entstandenen Lösung nach Herstellerangaben auf eine Neubauer-Improved Zählkammer aufgetragen. Unter dem Mikroskop sind 4 Felder (=Großquadrate) mit je 16 Kästchen zu erkennen. Pro Zelllinie werden zwei diagonal gelegene Felder für die Zellzählung ausgewählt. Innerhalb dieser Felder werden die je 16 Kästchen L-förmig ausgezählt. Das bedeutet, dass von den auf einer Begrenzungslinie gelegenen Zellen nur diejenigen mitgezählt werden, die L-förmig an 2 Seiten des Kästchens liegen (s. Abb. 5).

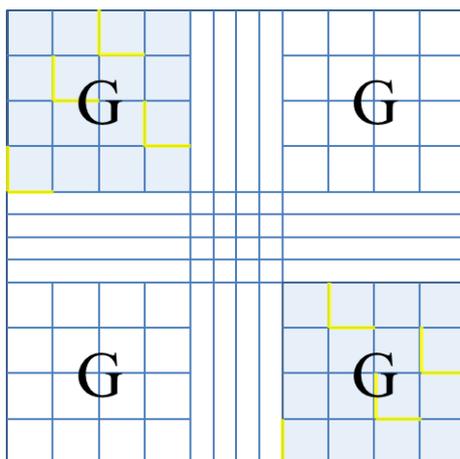


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer. G: Großquadrate. Gelb angedeutet: L-förmiges Auszählen der auf Begrenzungslinien gelegenen Zellen

Die Gesamt-Zellzahl wird nach Formel 3 errechnet aus der in den 32 Kästchen gezählten Zellzahl, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (Trypanblau mit Zellsuspension), dem vom Hersteller angegebenen Kammerfaktor, und dem Volumen, in dem das Pellet resuspendiert wurde.

$$\begin{aligned}
 \text{Zellzahl} &= \text{Anzahl gezählter Zellen} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \\
 &\quad \times 10.000 \text{ (Kammerfaktor)} \\
 &\quad \times \text{Gesamtvolumen der Suspension [ml]}
 \end{aligned}$$

Formel 3: Berechnung der Zellzahl

### 3.2.7 Die Kristallviolett-Färbung

Der Kristallviolett-Assay beruht auf der Messung der optischen Dichte adhärent wachsender Zellen nach unspezifischer Färbung der vitalen Zellen mit Kristallviolett. Devitale Zellen werden nicht angefärbt, da sie nach dem Zelltod aus dem Adhäsionsverbund austreten.

Zunächst wurde die Zellzahl der Suspensionen mittels der in Punkt 3.2.6 beschriebenen Methode bestimmt. Etwa 10.000 Zellen pro Well wurden in 150 µl Medium in 96-well

Platten ausgesät. Die Platten wurden für 2-3 Stunden in den Brutschrank gestellt, so dass die Zellen wieder adhären konnten. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden lang im Brutschrank mit Adenosin bzw. NECA verschiedener Konzentrationen inkubiert. Das Adenosin wurde hierfür auf Eis aufgetaut und die unterschiedlichen Konzentrationen wurden durch Verdünnung in Medium hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von bestimmten Chemotherapeutika bzw. sogenannten Todesliganden ebenfalls 24 Stunden inkubiert. Es wurden Cisplatin, Doxorubicin, Human TRAIL und superFasLigand verwendet (s. Punkt 4.3).

Der Gesamtansatz für die Kristallviolett-Färbung betrug immer 200 µl pro Well. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aus den Platten entfernt und dafür 50 µl Kristallviolett pro Well hinzupipettiert (0,5% Kristallviolett in 20% Methanol, filtriert). Die Zellen wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur eingefärbt. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und die unspezifische Färbung mit Wasser ausgespült. Die Platten wurden mindestens 24 Stunden lang zum Trocknen aufgestellt. Nachdem 50 µl Natriumcitrat-Lösung (0,1 M Natriumcitrat in 50% Ethanol) pro Well hinzugegeben worden waren, konnte die Absorption bei  $\lambda=550$  nm im ELISA-Reader gemessen werden. Der Versuch wurde in gleicher Weise auch ohne Todesliganden mit verschiedenen Konzentrationen von Adenosin, NECA und CCPA durchgeführt. In diesem Fall wurden die Zellen 72 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Bei der Verwendung von NECA und CCPA wurde ADA zugesetzt (0,5 Units/Well), um der Verfälschung der Ergebnisse durch endogenes Adenosin oder dessen Metabolite entgegenzuwirken. Die jeweilige Menge ADA wurde den verschiedenen Verdünnungen von NECA bzw. CCPA zugesetzt und mit diesen auf die Zellen aufgetragen. Aus den Werten wurde die Zelldichte in Prozent errechnet, jeweils bezogen auf einen Vergleichswert von unbehandelten Zellen.

### **3.2.8 Der BrdU-Assay**

Dieser Zellproliferations-ELISA beruht auf dem lumineszenzbasierten Nachweis von während der DNA-Synthese inkorporiertem Bromodeoxyuridin (BrdU). Die Bindung eines Luziferase-konjugierten Antikörpers gegen BrdU ermöglicht die präzise Quantifi-

zierung der Zellproliferationsrate durch Chemolumineszenz. Verwendet wurde das BrdU-Kit der Firma Roche.

Zunächst wurden die benötigten HEC-1-A- und Ishikawa-Zellen von ihren Platten abgelöst, zentrifugiert und in Medium resuspendiert (s. Punkt 3.2.1). Anschließend wurde wie in Punkt 3.2.6 beschrieben die Zellzahl bestimmt. In schwarzen 96-Well-Platten mit flachem, durchsichtigem Boden wurden ca. 10.000 Zellen in 100 µl Medium pro Well ausplattiert. Die Platten wurden für 2-3 Stunden in den Brutschrank gestellt, damit die Zellen wieder adhären konnten. Anschließend wurden vorsichtig 50 µl Medium abgesaugt und je 50 µl Medium, in dem verschiedene Konzentrationen von Adenosin oder NECA gelöst waren, hinzupipettiert. Diese betragen für Adenosin 12,5, 25, 50 und 100 µM und für NECA 0,1, 1 und 10 µM. Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank mit der jeweiligen Substanz inkubiert. Als Kontrollwert blieben einige Wells unbehandelt, ebenfalls wurden Blanks aus 100 µl RPMI 1640 pipettiert. Bei der Verwendung von NECA wurde wie schon in Versuch 2.2.7 ADA zugesetzt (0,5 Units/Well). Alle weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Es folgte die Markierung der Zellen mit BrdU-Labeling-Lösung, dann wurden die Zellen weitere 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Pyrimidin-Analogon BrdU kann nun anstatt Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut werden.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Labeling-Medium entfernt, die Platten getrocknet und die Zellen fixiert. Im selben Schritt wurde die DNA denaturiert. Dies ist notwendig, um die Zugänglichkeit des inkorporierten BrdU für den anti-BrdU-Luc (Luc=Luziferase) Antikörper zu verbessern. Nach der Entfernung der FixDenat-Lösung wurde mit anti-BrdU-Luc Antikörper inkubiert, dieser bindet nun an das in neu synthetisierter DNA inkorporierte BrdU. Zur Steigerung der Präzision wurden die Zellen fünf Mal mit 300 µl Waschlösung gewaschen; zwischen den Waschschritten wurden die Platten für fünf Minuten stehen gelassen. Nach dem letzten Schritt wurden die Platten ausgeklopft, der Boden mit schwarzer Folie versiegelt und die Detektion der entstandenen Immunkomplexe durch Hinzufügen der Substrat-Lösung (bestehend aus Substrate Component A+B) gestartet (für genauere Angaben zu den einzelnen Substanzen s. Tab. 5).

Der mit Luziferase gekoppelte anti-BrdU-Luc Antikörper katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Diacylhydraziden wie Luminol und Luzife-

rin. Es entsteht ein im angeregten Zustand befindliches Reaktionsprodukt, welches unter Emission von Lichtquanten in den Ruhezustand zurückkehrt. Die Messung der emittierten Photonen erfolgte im Luminometer.

Die relative light units per second (rlu/s) korrelieren direkt mit der Menge an DNA-Synthese und demnach auch mit der Anzahl proliferierender Zellen in den betreffenden Mikrokulturen. Ein Vorteil bei der Verwendung Luziferase-basierter Nachweissysteme ist der hohe dynamische Bereich. Kritisch ist bei diesem Assay die Wahl eines geeigneten Plastikmaterials, da Antikörper je nach Beschaffenheit der Oberfläche durchaus auch unspezifisch an Zellkulturplatten binden können. Da sich in der Anleitung keine entsprechenden Hinweise des Herstellers finden, bedurfte es zur Erkennung und Lösung des Problems etlicher Optimierungsversuche.

**Tabelle 5: Reagenzien des BrdU-Assays [70]**

<b>Substanz/Reagenz</b>	<b>Inhalt/Funktion</b>
BrdU Labeling Reagent	10 mM 5-bromo-2'-deoxyuridin in PBS, pH 7,4
Anti-BrdU-Luc	monoklonaler Antikörper, konjugiert mit Luziferase (Luc)
Washing Buffer	PBS
Substrate Component A	gepufferte Lösung, enthält Luminol und 4-iodophenol
Substrate Component B	gepufferte Lösung, enthält eine stabilisierte Form Wasserstoffperoxid

### **3.2.9 Das fluorescence activated cell sorting (FACS)**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Differenzierung und Auszählung bestimmter Zelltypen oder in einem bestimmten funktionellen Status befindlicher Zellen. Dies geschieht mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpern (mAb) mit Spezifitäten gegen Oberflächenmoleküle auf den zu untersuchenden Zellen.

Zunächst werden die in Lösung befindlichen Zellen vom Durchflusszytometer in eine zentrale Flüssigkeitskammer aufgesaugt. Diese ist umgeben von einem äußeren Hüllstrom mit einer höheren Fließgeschwindigkeit als im Zentralkanal. Dies bewirkt einen massiven Sog auf die innere Kammer. Durch diesen Effekt ergibt sich unter optimalen Bedingungen (laminare Strömung) ein kapillärer Strahl aus einzelnen Partikeln

der Probe, ohne dass sich die beiden Flüssigkeitskompartimente vermischen. Dieser Strahl fließt vorbei an im FACS-Gerät befindlichen Lasern. Detektoren messen sowohl die Streuung des Lasers, als auch die Stärke der emittierten Fluoreszenz. Die Lichtsignale werden in Elektronische umgewandelt, verstärkt, und auf dem zugehörigen Computersystem sichtbar gemacht.

Licht, das in Vorwärtsrichtung gestreut wird, das heißt  $2-20^\circ$  bezogen auf die Achse des Laserstrahls, wird von einer Linse gesammelt, die als forward scatter channel (FSC) bezeichnet wird. Die Intensität des FSC entspricht in etwa der Größe des untersuchten Partikels. Licht, das in einem Winkel von  $90^\circ$  zum einfallenden Laserstrahl gemessen wird, wird als side scatter bezeichnet. Der side scatter channel (SSC) liefert Informationen über die Granularität eines Partikels/einer Zelle. FSC und SSC sind einzigartige Parameter für jedes Partikel und also charakteristisch für jeden Zelltyp in einer heterogenen Probe. Auf diese Weise können auch tote Zellen und Debris aus den Ergebnissen aussortiert werden. So haben etwa tote Zellen ein geringeres forward scatter und ein höheres side scatter als lebende Zellen [71]. Zusätzlich können tote Zellen noch durch Verwendung von Farbstoffen wie 7-Aminoactinomycin (7-AAD) oder Propidiumiodid abgetrennt werden, da diese Farbstoffe nur in tote Zellen eindringen.

Die Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 sind membranständige Ektonukleotidasen. Physiologisch sind sie u.a. auf Zellen des Immunsystems exprimiert, sie werden aber auch von Tumorzellen gebildet (s. auch Punkt 5).

Mittels Durchflusszytometrie und geeigneter mAb wurde in HEC-1-A- und Ishikawa-Zellen die Expression von CD39 und CD73 nach Behandlung der Tumorzellen mit Adenosin oder NECA bestimmt werden.

Zunächst wurden die Zellen in Petrischalen für die Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen von Adenosin bzw. NECA vorbereitet. Die benötigten Zellen wurden wie gewohnt mit Accutase abgelöst, in Röhrchen geerntet und anschließend wurde wie in Punkt 3.2.6 beschrieben die Zellzahl bestimmt. Je 1,5 Mio. Zellen pro Ansatz wurden in 9 ml Medium in passenden Petrischalen ausgesät und für 2-3 Stunden in den Brutschrank zurückgestellt. Nachdem die Zellen wieder angewachsen waren, wurden die in 1 ml Medium hergestellten Verdünnungen der Liganden hinzupipettiert (s. Tab. 6). Bei der Verwendung von NECA wurden vor dem Auftragen jeder Konzentration 6  $\mu$ l

10%ige ADA zugesetzt. Zusätzlich zum Vergleichswert gänzlich unbehandelter Zellen wurde auch hier ein weiterer Ansatz mit ADA ohne AR-Ligand hergestellt.

**Tabelle 6: Endkonzentrationen der Liganden im FACS-Versuch**

<b>Substanz</b>	<b>finale Konzentration (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
Adenosin	0
	20
	100
NECA	0
	0+ADA
	5+ADA
	25+ADA

Nach Ablauf der 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen wiederum mit Accutase abgelöst, in Röhrchen überführt und fünf Minuten lang bei 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen wurden zum Waschen in 2 ml PBS resuspendiert und in gleicher Weise erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Jedes Pellet wurde in 0,23 ml Beriglobinlösung (5 ng/ml in PBS) resuspendiert und auf Eis für 15 Minuten inkubiert. Dies dient dem Blocken unspezifischer Bindungsstellen. In der Zwischenzeit wurden FACS-Röhrchen für die zu messenden Proben vorbereitet. Je 50  $\mu\text{l}$  der mit Beriglobinlösung versetzten Zellen wurden in die betreffenden FACS-Röhrchen pipettiert und in speziellen Schiffchen fünf Minuten bei 4°C und 1.800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand aus den Röhrchen vorsichtig abgeklopft. Die Antikörperfärbung wurde zum Nachweis der CD73-Oberflächenmoleküle mit einem direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff (R-Phycoerythrin, PE) gekoppelten Antikörper durchgeführt. Es wurde anti-human CD73-PE in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Zur Ermittlung des Positivdatensatzes wurde die unspezifische Bindung des Antikörpers mit einer sogenannten Isotyp-Kontrolle überprüft. Hierfür wird die äquivalente Verdünnung eines Antikörpers desselben IgG-Subtyps benötigt, der in gleicher Weise wie der spezifische Antikörper markiert ist. Für die CD73-Färbung diente anti-human IgG1-PE als Isotyp-Kontrolle. Für die CD39-Färbung stand kein direkt fluoreszenzmarkierter Antikörper zur Verfügung. Also wurde auf den unmarkierten Antikörper mouse-anti-human CD39 zurückgegriffen. Dieser primäre Antikörper wurde mit Hilfe eines geeig-

neten zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörpers gebunden und somit visualisiert. In diesem Falle wurde goat-anti-mouse-FITC (fluorescein isothiocyanat) verwendet. Das Absorptionsmaximum liegt für FITC bei  $\lambda=490$  nm, das Emissionsmaximum bei  $\lambda=525$  (grünes Spektrum). Für die CD39 Isotyp-Kontrolle wurde ebenfalls goat-anti-mouse-FITC verwendet.

Im Einzelnen wurden für jede NECA- bzw. Adenosin-Verdünnung alle vier Färbungen durchgeführt. Zunächst wurden die Pellets der betreffenden Proben mit 50  $\mu$ l 1:100 verdünntem mouse-anti-human CD39 resuspendiert und 25 Minuten lang im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu$ l FACS-Puffer (2% FCS in PBS) hinzupipettiert und die Röhrchen 5 Minuten lang bei 4°C und 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen mit 50  $\mu$ l einer 1:500 Verdünnung des sekundären Antikörpers weitere 25 Minuten inkubiert. Ebenso wurde mit den anderen (direkten) Färbungen verfahren. Die Verdünnungen der Antikörper wurden ebenfalls mit FACS-Puffer und nach Herstellerangaben hergestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde wie oben beschrieben FACS-Puffer hinzugegeben und zentrifugiert. Abschließend wurden die entstandenen Pellets wiederum in 200  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen, dem 1% 7-AAD beigelegt wurde. Der orangefarbene Zellfarbstoff 7-AAD ist ein Avitalfarbstoff, mit dessen Hilfe tote Zellen aus der Messung ausgespart werden können. Es folgte die Auswertung der Proben im FACS-Gerät mit der CellQuest Software der Firma Becton Dickinson.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der zugehörigen Software ausgewertet (Summit V4.3, Beckman Coulter) und in Streudiagrammen, Histogrammen und Overlays dargestellt (Bsp. s. Abb. 6). Je dichter die Granula (z.B. tote Zellen), desto weiter links und unten im Streudiagramm erscheinen die einzeln als Punkte dargestellten Zellen. Je größer die Zellen, desto weiter rechts und oben erscheinen sie. Die zu untersuchende Zellpopulation wird mit Hilfe eines Polygons umgrenzt und in ein Histogramm übertragen. Die Datensätze werden von 7-AAD-positiven Zellen bereinigt und mit dem zugehörigen Isotypen in einem Overlay dargestellt (s. Abb. 6). Aus den Werten der spezifischen Antikörper-Bindung und der zugehörigen Isotyp-Kontrolle wurde der spezifische Fluoreszenz-Index (SFI) berechnet (s. Formel 4) und die so erhaltenen Werte aus den verschiedenen Konzentrationen an NECA bzw. Adenosin miteinander verglichen.

$$SFI = \frac{SA(\text{Median})}{UA(\text{Median})}$$

Formel 4: Errechnung des SFI. SA=Spezifische Antikörperbindung (Median-Wert), UA=unspezifische Antikörperbindung (Median-Wert)

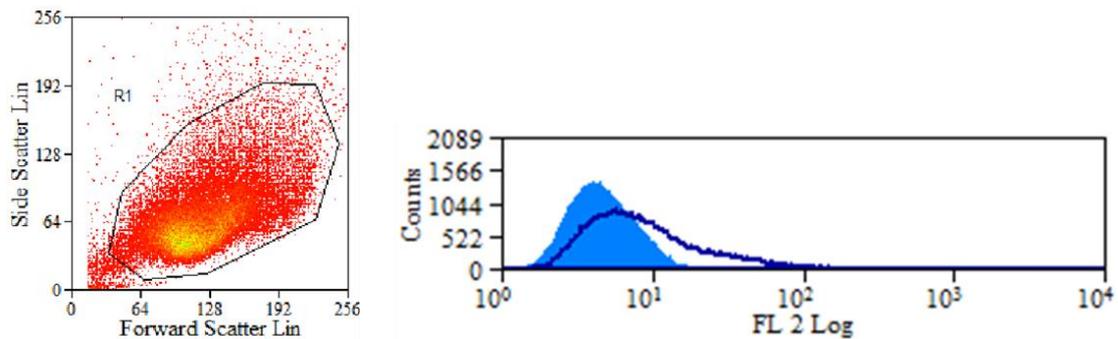


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung eines Streudiagramms (links) und eines Overlays (rechts) der durchflusszytometrisch untersuchten Ishikawa-Zellpopulation

Die in Abb. 6 gezeigten Zellen wurden mit 25  $\mu\text{M}$  NECA vorbehandelt. Links: Streudiagramm aus mit 25  $\mu\text{M}$  NECA vorbehandelten Ishikawa-Zellen (CD73-Antikörperfärbung). Rechts: Overlay aus den links im Streudiagramm dargestellten Zellen (dunkelblaue offene Linie: Fluoreszenzspektrum der CD73-Antikörperfärbung) und dem entsprechenden Isotypen (hellblaue ausgefüllte Kurve: Fluoreszenzspektrum des Isotypen). Die x-Achse repräsentiert die Lichtintensität, die y-Achse die Zellzahl.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Nachweis einer Adenosinrezeptor-Expression auf humanen Tumorzelllinien mittels Radioliganden-Bindungsassays

Ziel dieser ersten Versuchsreihe in Form von Bindungsexperimenten war es, die Zelllinien auf ein Vorhandensein von Adenosinrezeptoren zu untersuchen und eine erste pharmakologische Charakterisierung der verschiedenen Subtypen vorzunehmen.

Die Testung der Zelllinien HCC1806, HCC1937, HEC-1-A, Ishikawa und SiHa auf die Adenosinrezeptor-Subtypen  $A_1$ ,  $A_{2A}$  und  $A_3$  erfolgte durch spezifische radioaktiv markierte Liganden in einem Radioliganden-Bindungsassay. Aus den erhaltenen Messwerten wurden nach den Formeln 1 und 2 die vorhandene Rezeptormenge errechnet (s. Punkt 3.2.4). Für den  $A_{2B}R$  ist bislang kein Radioligand verfügbar, der eine ausreichende Affinität besitzt, um diesen Subtyp in einem Bindungsexperiment zweifelsfrei nachweisen zu können.

Auf den Tumor-Zelllinien SiHa, Ishikawa, HEC-1-A und HCC1806 konnten Adenosinrezeptoren nachgewiesen werden. Die Daten der ebenfalls untersuchten HCC1937-Zelllinie lieferten keine Ergebnisse, die auf messbare Mengen an Adenosinrezeptoren hindeuteten. Am höchsten war bei allen Zelllinien die Gesamtrezeptorzahl von  $A_{2A}$ -Rezeptoren. Die interessantesten Ergebnisse lieferten hierbei die HEC-1-A und Ishikawa-Zellen, die neben der höchsten Anzahl an  $A_{2A}$ -Rezeptoren im Vergleich auch eine nachweisbare Menge an  $A_1$ -Rezeptoren zeigten. Am niedrigsten waren bei allen Zellen die gemessenen Mengen an  $A_3R$ . Es kann zu diesem Zeitpunkt also angenommen werden, dass bei keiner der Zelllinien eine signifikante Menge an  $A_3$ -Rezeptoren vorhanden ist. Möglicherweise liegen aber so geringe Mengen an  $A_3R$  vor, dass diese sich unterhalb der Nachweisgrenze des Radioliganden-Bindungsassays befinden. Weitere Tests könnten Aufschluss geben, zumal eine geringe Rezeptordichte die Bedeutung für physiologische Vorgänge im Körper nicht zwingend ausschließt, wie das Beispiel des  $\beta_1$ -Adrenorezeptors am Herzen zeigt. Bei Stimulation ist er für eine positiv Ino- Chromo-, Dromo- und Bathmotrope Wirkung verantwortlich und eines der wichtigsten pharmakologischen Targets überhaupt.

Für die  $A_1$ -Rezeptorbindung wurden die Experimente mit [ $^3H$ ]CCPA, für die  $A_{2A}$ -Rezeptorbindung mit [ $^3H$ ]NECA und für die  $A_3$ -Bindung mit [ $^3H$ ]HEMADO durchge-

führt. Die Werte für die SiHa-Zelllinie wurden aus Mittelwerten zweier unabhängiger Experimente gewonnen, die Werte der anderen Zelllinien aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Abbildung 7 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse.

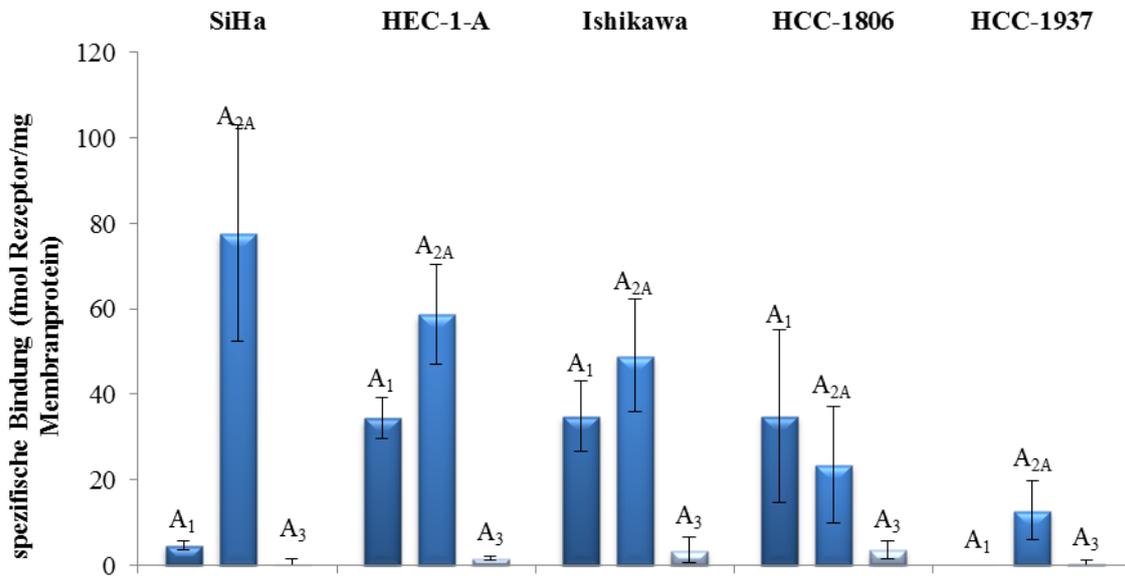


Abbildung 7: Adenosinrezeptor-Radioligandenbindung in Tumorzellmembranen. Der Fehlerbalken stellt den standard error of the mean (SEM) dar

## 4.2 Untersuchung der Adenylatcyclaseaktivität bei Stimulation mit Adenosinrezeptor-Liganden

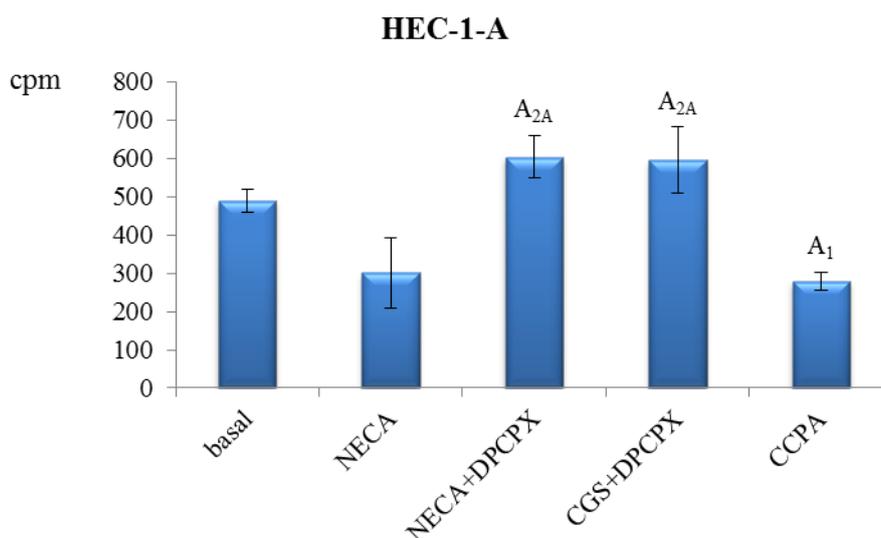
Nachdem im Radioliganden-Bindungsassay das Vorhandensein von Adenosinrezeptoren auf vier der fünf Zelllinien nachgewiesen werden konnte, wurde nun deren Effekt auf die Aktivität der Adenylatcyclase nach Stimulation mit spezifischen Liganden untersucht. Weiteres Ziel des Experiments war es, die Ergebnisse aus den Bindungsassays zu verifizieren und Hinweise auf das mögliche Vorhandensein von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren zu erhalten.

Zunächst wurde der Versuch (wie in Punkt 3.2.5 erläutert) für alle fünf Zelllinien durchgeführt, der nicht-selektive Agonist NECA wurde allein eingesetzt. Die Menge an eingesetztem Membranprotein betrug 80 µg je Probe, der Versuch wurde in dieser Form

zweimal durchgeführt. Aus dieser ersten Versuchsreihe ergab sich für die HEC-1-A-Zellen eine Hemmung der Adenylatcyclase bezogen auf die Basalwerte, für alle anderen Zelllinien konnte nach Abzug der Leerwerte kein Effekt auf die Adenylatcyclaseaktivität nachgewiesen werden. Der Abfall der Aktivität bei der HEC-1-A-Zelllinie nach Stimulation mit NECA weist auf das Vorhandensein von  $G_i$ -gekoppelten  $A_1$ -Rezeptoren hin. Da die Liganden in Konzentrationen verwendet wurden, die alle Rezeptorsubtypen gleichermaßen besetzen, ist das Überwiegen der Hemmung der Cyclaseaktivität hierbei auf eine eventuelle bevorzugte funktionelle Rolle von  $A_1$ -Rezeptoren gegenüber dem  $A_2$ -Subtyp zurückzuführen obwohl der  $A_{2A}$ -Rezeptor zuvor schon im Bindungsexperiment nachgewiesen worden war.

Im Folgenden wurden die HEC-1-A-Zellen weiter untersucht, ebenso die Ishikawa-Zelllinie, die (wie unter Punkt 4.1 erläutert) in den Bindungsexperimenten interessante Ergebnisse geliefert hatte. Parallel wurden Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, die mit dem Rezeptor-Subtyp  $A_{2B}$  stabil transfiziert worden waren, im Cyclaseassay getestet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fr. Sonja Kachler, Würzburg). Das Profil dieser Zellen konnte somit zum Vergleich herangezogen werden, um einen möglichen  $A_{2B}$ -Rezeptor auf den HEC-1-A-Zellen nachzuweisen oder auszuschließen. Die Membranen wurden jeweils mit NECA, mit einer Kombination aus NECA und DPCPX und einer Kombination aus CGS und DPCPX behandelt. Die HEC-1-A-Zellen wurden zusätzlich mit CCPA sowie die CHO( $A_{2B}$ )-Zellen mit CGS behandelt. Zur Bindungsaffinität und Selektivität der verwendeten Agonisten und Antagonisten gegenüber den einzelnen Rezeptor-Subtypen siehe Tabelle 1.

Wie sich im weiteren Verlauf der Versuchsreihe zeigte, bestätigte sich ein Effekt der Ligandenbindung auf die Adenylatcyclaseaktivität nur bei den HEC-1-A-Zellen, weshalb nur auf diese im Folgenden näher eingegangen werden soll. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die Aktivität der Adenylatcyclase in HEC-1-A und CHO( $A_{2B}$ )-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Agonisten, teils in Gegenwart von DPCPX zur Blockade von  $A_1$ - bzw.  $A_{2B}$ -Rezeptoren.



**Abbildung 8: Adenosinrezeptor-vermittelte Stimulation der Adenylatcyclase in HEC-1-A-Zellen. Der Fehlerbalken stellt den SEM dar**

In Abb. 8 dargestellt sind Mittelwerte aus vier bis sechs Versuchen nach Abzug der blank-Werte. Für die Endkonzentrationen der verwendeten Liganden im Assay siehe Tabelle 4. Die Stimulation der Adenylatcyclase (AC) erfolgte durch die angegebenen Liganden (der basal-Wert entspricht der basalen Aktivität der AC ohne Rezeptor-Stimulation durch spezifische Liganden). Gemessen wurde das [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP nach Substratumsetzung durch die Adenylatcyclase. Die cpm-Werte korrelieren direkt mit der Menge an gebildetem radioaktiv markiertem cAMP und mit der Anzahl der vorhandenen funktionellen Adenosinrezeptoren.

Das Ergebnis des Adenylatcyclaseassays nach Behandlung der HEC-1-A-Zellen mit NECA und DPCPX zeigt eine Signalverstärkung. Dies verifiziert das Vorhandensein von G<sub>s</sub>-gekoppelten A<sub>2A</sub>-Rezeptoren, da die A<sub>1</sub>-Rezeptoren durch DPCPX antagonisiert wurden. Die Signalstärke bleibt bei den mit CGS und DPCPX behandelten Zellen weitgehend gleich. Da CGS in der verwendeten Konzentration nicht an A<sub>2B</sub>-Rezeptoren bindet, müsste in Gegenwart von A<sub>2B</sub>-Rezeptoren das Signal nach Behandlung mit NECA und DPCPX höher sein als nach der Behandlung mit CGS und DPCPX. Das erhaltene Ergebnis schließt somit das Vorhandensein bedeutsamer Mengen A<sub>2B</sub>-Rezeptoren auf HEC-1-A-Zellen aus. Nach der Behandlung mit dem hochaffinen und selektiven A<sub>1</sub>-Agonisten CCPA zeigt sich wie erwartet ein abgeschwächtes Signal.

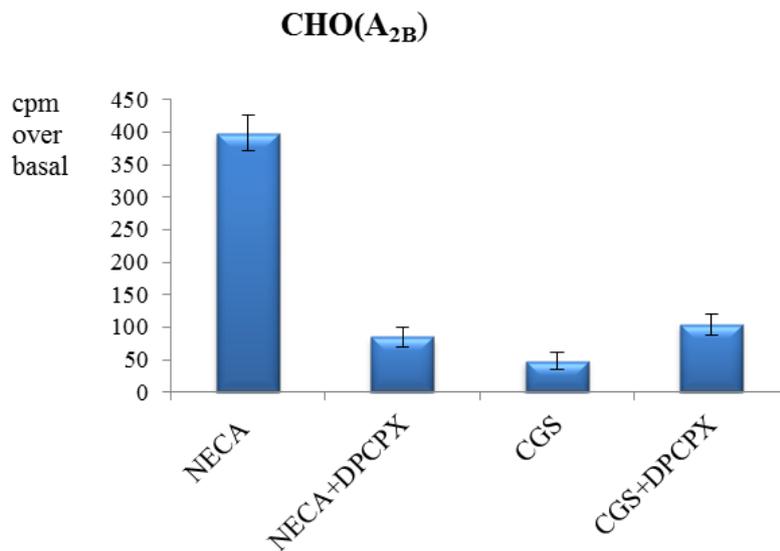
In einem t-Test wurden die Rohdaten auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Im Einzelnen wurden die Rohdaten der basalen Werte mit denen der mit spezifischen Liganden stimulierten Werte verglichen. Es sollte ermittelt werden, ob unterschiedliche Werte in den basalen und stimulierten Werten auch statistischen Anforderungen entsprechen oder diese bei statistischer Auswertung aus einer Grundgesamtheit mit demselben Mittelwert stammen. Der Test wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzlevel von 95% angenommen und der Test 2-seitig (Seiten=2) und gepaart (Typ=1) vorgenommen. Der p-Wert gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit an. Wenn  $p > 0,05$  gilt die Nullhypothese (NH) als statistisch hinreichend wahrscheinlich. Etwaige Unterschiede in den Ergebnissen der Rohdaten zwischen basalen und stimulierten Werten werden als zufällige Abweichungen betrachtet. Bei  $p < 0,05$  wird in der Regel die Nullhypothese verworfen, es gilt die Alternativhypothese. Unterschiede in den Ergebnissen der Rohdaten von basalen und stimulierten Werten besitzen statistische Relevanz.

Die Nullhypothese lautete: Es ist keine funktionelle Form eines Adenosinrezeptor-Subtyps auf den getesteten Zellen vorhanden.

Die Alternativhypothese lautete: Es befindet sich eine funktionelle Form eines Adenosinrezeptor-Subtyps auf den getesteten Zellen.

Für die HEC-1-A-Zellen konnte für alle Kombinationen von Liganden mit den entsprechenden basal-Werten eine statistische Signifikanz der Ergebnisse ermittelt werden, das entspricht dem Vorhandensein einer funktionellen Form des jeweiligen Rezeptor-Subtyps.

Auf den CHO(A<sub>2B</sub>)-Zellen ist nur der stabil transfizierte A<sub>2B</sub>R-Subtyp vorhanden. Abb. 9 zeigt also das typische Profil der AC-Aktivität nach A<sub>2B</sub>R-Aktivierung mittels spezifischer Liganden (Messung radioaktiv markierten cAMP's). Die Daten aus einem Einzelexperiment sind exemplarisch dargestellt. Der Fehlerbalken stellt den SEM dar. Für die Endkonzentrationen der verwendeten Liganden im Assay s. Tab. 4.



**Abbildung 9: A<sub>2B</sub>-Rezeptor vermittelte Stimulation der Adenylatcyclase in CHO(A<sub>2B</sub>)-Zellen**

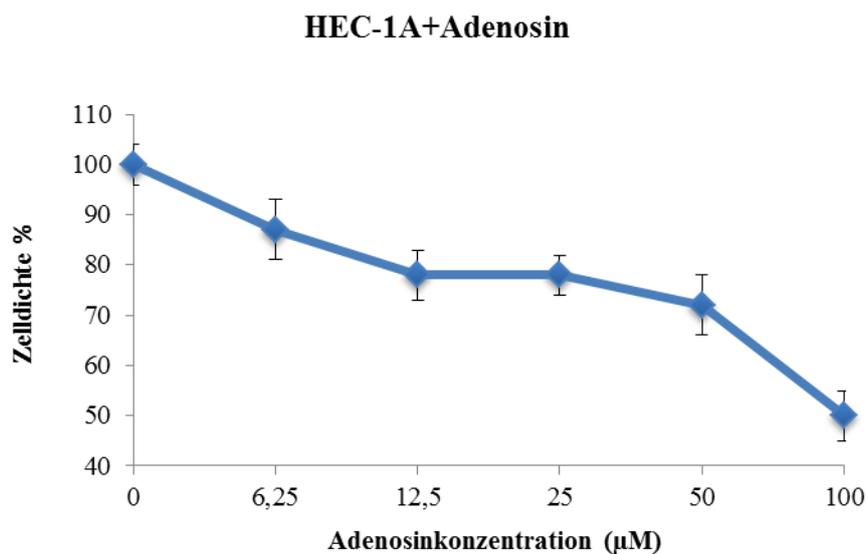
Nach Behandlung der CHO(A<sub>2B</sub>)-Zellen mit NECA zeigt sich im Diagramm ein starker Anstieg des cAMP-Signals. Das gleichbleibend abgeschwächte Signal nach Inkubation mit NECA/DPCPX, CGS und CGS/DPCPX bestätigt, dass die Stimulation der AC durch NECA via A<sub>2B</sub>R und nicht A<sub>2A</sub>R-vermittelt erfolgt ist.

Der Vergleich des Profils mit dem der HEC-1-A-Zellen bestätigt die Vermutung, dass auf unserer HEC-1-A-Zelllinie keine funktionellen A<sub>2B</sub>R in nachweisbaren Mengen vorhanden sind.

### **4.3 Bestimmung der Zelldichte der Tumorzellen mittels Kristallviolett-Färbung nach Adenosinrezeptor-Stimulation**

Zielsetzung des Versuches war es, mit der Kristallviolett-Färbung das Apoptoseverhalten der Tumorzellen nach Stimulation mit selektiven und nicht-selektiven Adenosinrezeptor-Liganden zu untersuchen. In einem weiteren Versuchsaufbau wurden die Endometriumkarzinomzelllinien HEC-1-A und Ishikawa auf einen möglichen Synergismus zwischen Adenosinrezeptor-Stimulation und Behandlung der Zellen mit zytotoxischen Substanzen überprüft.

Zunächst wurden die HEC-1-A- und Ishikawa-Zellen wie unter Punkt 3.2.7 beschrieben mit Adenosin untersucht. Die Zellen wurden mit Adenosinkonzentrationen zwischen 6,25 und 100  $\mu\text{M}$  72 Stunden lang inkubiert und mit Kristallviolettlösung angefärbt. Anschließend erfolgte die Auswertung im ELISA-Reader und es wurde die Zelldichte in Prozent im Verhältnis zu einem Vergleichswert von unbehandelten Zellen ermittelt. Bei beiden Zelllinien war eine leichte Abnahme der Zelldichte bei höheren Adenosinkonzentrationen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen. Diese fiel für die Ishikawa-Zellen geringer aus (s. Abb. 10 und 11). Die Werte für die Diagramme stammen jeweils aus zwei unabhängigen Kristallviolett-Assays mit je 10 Werten pro Konzentration. Die blank-Werte sind bereits abgezogen. Der Fehlerbalken stellt den SEM in Prozent des Mittelwerts dar.



**Abbildung 10: Zelldichte der HEC-1-A-Zellen nach Inkubation mit Adenosin**

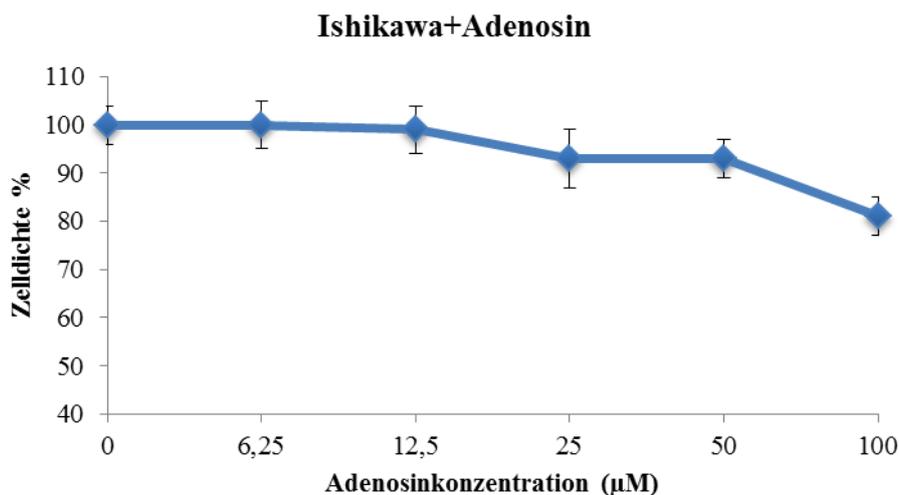


Abbildung 11: Zeldichte der Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit Adenosin

Für die Kristallviolett-Assays der HEC-1-A- und Ishikawa-Zelllinie wurde ein t-Test wie unter Punkt 4.2 beschrieben durchgeführt, um die Zuverlässigkeit der Rohdaten zu überprüfen.

Die Nullhypothese lautete: Die Zugabe von Adenosin hat keinen antiproliferativen Effekt auf die untersuchten Tumorzellen.

Die Alternativhypothese lautete: Die Zugabe von Adenosin hat einen antiproliferativen Effekt auf die untersuchten Tumorzellen.

Das Signifikanzlevel wurde mit 95% festgelegt ( $p < 0,05$ ), das heißt bei  $p < 0,05$  gilt die Alternativhypothese.

Die Ergebnisse für den Kristallviolett-Versuch der HEC-1-A-Zellen mit Adenosin zeigt Tabelle 7. Gegenübergestellt wurden jeweils die Ergebniswerte der verschiedenen Adenosinkonzentrationen und die Vergleichswerte von unbehandelten Zellen. Die Stichprobenanzahl betrug 10 Werte je Konzentration oder 0-Wert. Die Assays wurden einzeln ausgewertet, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen.

Tabelle 7: P-Werte aus dem t-Test für die Kristallviolett-Assays der HEC-1-A- und Ishikawa-Zellen

Adenosinkonz. (µM)		0/6,25	0/12,5	0/25	0/50	0/100
HEC-1-A	V1	0,004	0,0009	0,002	0,0007	0,00001
	V2	0,006	0,0004	0,001	0,04	0,00004

Eine statistische Signifikanz der aus dem Versuch mit den HEC-1-A-Zellen gewonnenen Daten konnte für alle Adenosinkonzentrationen nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass sich bei steigender Adenosinkonzentration auch eine umso stärkere antiproliferative Wirkung entfaltet, konnte verifiziert werden.

Die Rohdaten der Ishikawa-Zellen unterlagen größeren Schwankungen; unter den beschriebenen Bedingungen konnte keine statistische Signifikanz festgestellt werden. Der fehlende Nachweis einer statistisch nachgewiesenen antiproliferativen Wirkung könnte auf eine geringere Sensitivität der AR auf den Ishikawa-Zellen gegenüber Adenosin zurückzuführen sein. Zu bedenken ist ebenfalls, dass trotz Nachweis von A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Rezeptoren im Radioliganden-Bindungsassay (s. Punkt 4.1; in etwa gleiche Quantität wie bei den HEC-1-A-Zellen) der Adenylatcyclaseassay (s. Punkt 4.2) keine deutlichen Hinweise auf das Vorhandensein eines funktionellen AR-Subtyps auf den Ishikawa-Zellen lieferte. Weiterhin muss (bei beiden Zelllinien) eine generelle Toxizität von Adenosin in hohen Konzentrationen in Erwägung gezogen werden.

Nach Stimulation der Adenosinrezeptoren mit NECA und einer Inkubationszeit von 72 Stunden im Brutschrank zeigte sich ebenfalls eine Abnahme der Zelldichte bei steigenden Konzentrationen. In einem ersten Versuchsansatz betrug die NECA-Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 100 µM. Den diversen Verdünnungen wurde jeweils Adenosindesaminase (ADA) zugesetzt, um endogenes Adenosin aus dem Medium zu eliminieren. Da im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 100 µM die Zelldichte, bezogen auf den Vergleichswert von nicht Ligand-stimulierten, aber mit Adenosindesaminase versetzten Zellen von annähernd 100% auf 4-9% absank, musste der Konzentrationsbereich neu definiert werden. Dieser wurde auf finale Konzentrationen im Ansatz zwischen 6,25 und 50 µM festgelegt. Als Vergleichswert dienten Zellen, die zwar nicht mit NECA behandelt wurden, denen aber ADA beigelegt worden war. Die Zelldichte in Prozent wurde jeweils auf diesen Kontrollwert bezogen. Die Zelldichte nahm in diesem Fall mit steigender NECA-Konzentration stärker ab als beim Zytotoxizitätsassay mit Adenosin. Die Unterschiede zwischen den beiden behandelten Zelllinien bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber NECA allerdings waren hier marginal (s. Abb. 12 und 13). In den Diagrammen sind exemplarisch die Werte aus einem Kristallviolett-Assay mit je fünf Werten pro Konzentration dargestellt. Die blank-Werte sind bereits abgezogen. Der Fehlerbalken stellt den SEM in Prozent des Mittelwerts dar.

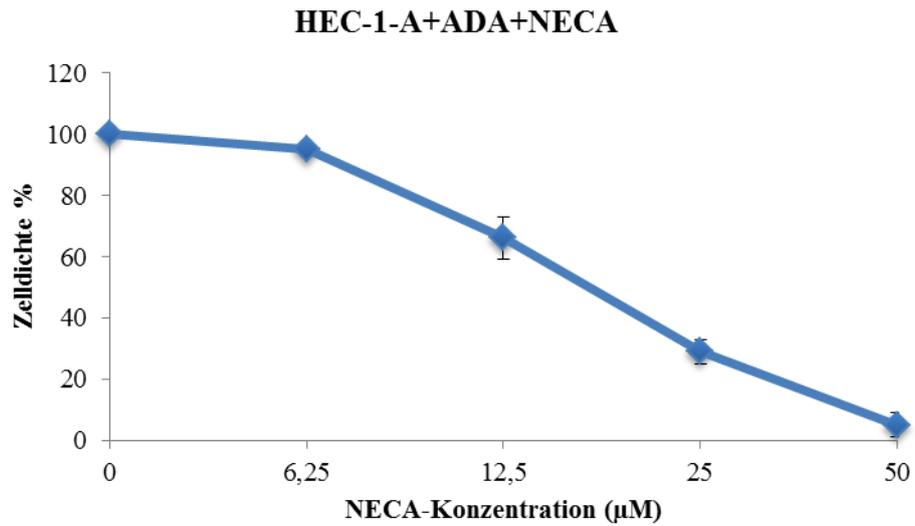


Abbildung 12: Zelldichte der HEC-1-A-Zellen nach Inkubation mit NECA

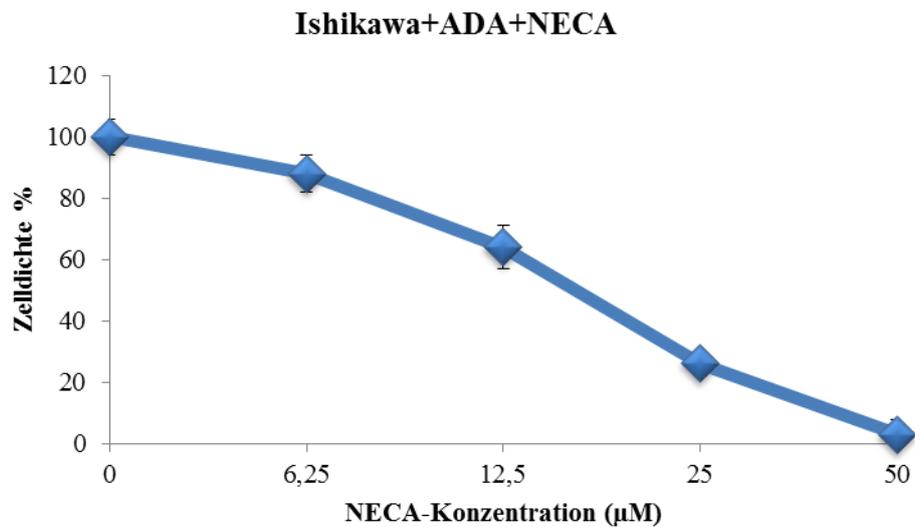


Abbildung 13: Zelldichte der Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit NECA

Auch für den Kristallviolett-Assay mit NECA wurden t-Tests durchgeführt (s. Tab. 8). Es gelten dieselben Bedingungen wie für Test in Gegenwart von Adenosin.

**Tabelle 8: P-Werte aus den t-Tests für die Zytotoxizität-Assays der Tumorzellen nach Inkubation mit NECA**

<b>NECA-Konz. (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>0/6,25</b>	<b>0/12,5</b>	<b>0/25</b>	<b>0/50</b>
<b>HEC-1-A</b>	0,38	0,001	0,0002	0,0001
<b>Ishikawa</b>	0,08	0,002	0,0003	0,0001

Getestet wurden jeweils die Rohdaten der unbehandelten Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von NECA behandelt worden waren. Allen Konzentrationen (auch den „0-Werten“) war zuvor ADA zugesetzt worden. Da es sich bei den Diagrammen um exemplarisch aufgeführte Daten handelt, wurde pro Zelllinie nur ein Assay ausgewertet, die Stichprobenanzahl betrug fünf Werte.

Der zytotoxische Effekt von NECA war ab der Konzentration von 12,5  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant. Eine antiproliferative Wirkung nach Inkubation der Zellen mit NECA kann also als erwiesen angesehen werden.

Nach Stimulation der Adenosinrezeptoren mit CCPA und ADA-Zusatz war bei beiden Zelllinien kein deutlicher Effekt zu sehen, die Zelldichte änderte sich hier sehr diskontinuierlich und nur um Prozentpunkte im einstelligen Bereich. Der Assay wurde für jede Zelllinie dreimal wiederholt. Die verwendeten Konzentrationen an CCPA betrug zwischen 0,25 und 2  $\mu\text{M}$ . In diesem Konzentrationsbereich hat CCPA also keine erkennbare  $A_1R$ -vermittelte zytotoxische Wirkung auf die Tumorzellen.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Tumorzellen zunächst 24 Stunden mit Adenosin bzw. NECA inkubiert, dann mit den Apoptosestimuli Cisplatin, Fas Ligand, TRAIL oder Doxorubicin für weitere 24 Stunden kombiniert.

Cisplatin ist eine platinhaltige Verbindung, die als Zytostatikum in der Krebstherapie Anwendung findet. Die Wirkungsweise beruht auf der Bildung sogenannter intra- und interstrand Crosslinks, d.h. Cisplatin bindet an Basen innerhalb eines DNA-Stranges oder zwischen beiden Strängen, wodurch Querverbindungen entstehen. Dies verhindert Replikation und Transkription und führt somit durch Beeinträchtigung des Zellzyklus zu einem zytotoxischen Effekt [72].

Doxorubicin ist ein antineoplastisches Antibiotikum, das aus *Streptomyces peucetius* gewonnen wird und zur Stoffgruppe der Anthracycline gehört. Es wird ebenfalls als Zytostatikum in der Chemotherapie eingesetzt [73] und entfaltet seine Wirkung durch

Bildung freier Radikale [74]. In hohen Dosen wirkt Doxorubicin system- und kardiotoxisch [75].

Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ist ein Todesrezeptor-Ligand, der in multiplen Tumorzelllinien apoptoseinduzierend wirkt [76]. Dabei kann TRAIL an vier verschiedene Rezeptoren binden, von denen jedoch nur zwei (TRAIL-R1 = DR4 und TRAIL-R2 = DR5) funktionell sind. Dementsprechend hängt die Wirkung von TRAIL stark von der Expression der jeweiligen Rezeptoren und dem Verhältnis zwischen Todesrezeptoren und „Decoy“-Rezeptoren ab. Substanzen, die in der Lage sind, dieses Verhältnis zu Gunsten der Todesrezeptoren zu modulieren, können somit Tumorzellen gegen TRAIL sensibilisieren.

superFasLigand (sFasL): Das Fas/FasL-System ist ein wichtiger Regulator der Apoptose. Der Fas-Rezeptor ist ein Protein, das auf der Oberfläche vieler Zellmembranen im Körper exprimiert wird, er findet sich aber ebenfalls auf Malignomzellen. Der Fas Ligand (FasL) wird von aktivierten T-Zellen exprimiert und gehört wie TRAIL und TNF- $\alpha$  zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF). sFas und sFasL sind dessen lösliche Isoformen. Das Fas/sFasL-System scheint eine Rolle bei sog. Immuno-evasionsmechanismen diverser Tumoren zu spielen [77].

Es sollte nun überprüft werden, ob die Vorbehandlung der Zellen mit NECA bzw. Adenosin die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika oder Todesliganden verändert. Ein solcher Effekt konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. In Kombination mit Adenosin waren beide Zelllinien gegen TRAIL resistent, die Zellen zeigten nach Behandlung mit Adenosin eine geringfügige Tendenz zu einer geringeren Dichte, eine konstante Abnahme der Zelldichte durch TRAIL zeichnete sich nicht ab. In Kombination mit NECA fiel die Zelldichte nur mit steigender NECA-Konzentration ab, durch steigende TRAIL-Konzentrationen änderte sie sich nicht weiter. In Anbetracht der geringen Stabilität von Adenosin in Zellkultur könnten die mit dem freien Nukleosid erhaltenen Negativergebnisse allerdings auf Abbauprozesse im Medium zurückzuführen sein, sodass die Daten, die mit dem metabolisch stabilen Analogon NECA erhalten wurden, mutmaßlich robuster sind.

Generell sank die Zelldichte bei den übrigen proapoptotischen Substanzen wie erwartet mit steigenden Konzentrationen. Adenosin hatte insgesamt eine geringere Wirkung auf

die Apoptoserate als NECA, die Zelldichte sank erst merklich bei hohen Konzentrationen. Die Steigung der Kurven änderte sich jedoch nicht oder nur marginal, das heißt es wurde zwar ein additiver Effekt, aber keine Synergie zwischen AR-Stimulation und Todesliganden nachgewiesen. Abbildungen 14 und 15 zeigen jeweils einen solchen Kurvenverlauf für Doxorubicin. Es sind exemplarisch die Werte aus jeweils einem Kristallviolett-Assay dargestellt, für die einzelnen Konzentrationen wurden Doppelwerte oder Triplikate pipettiert.

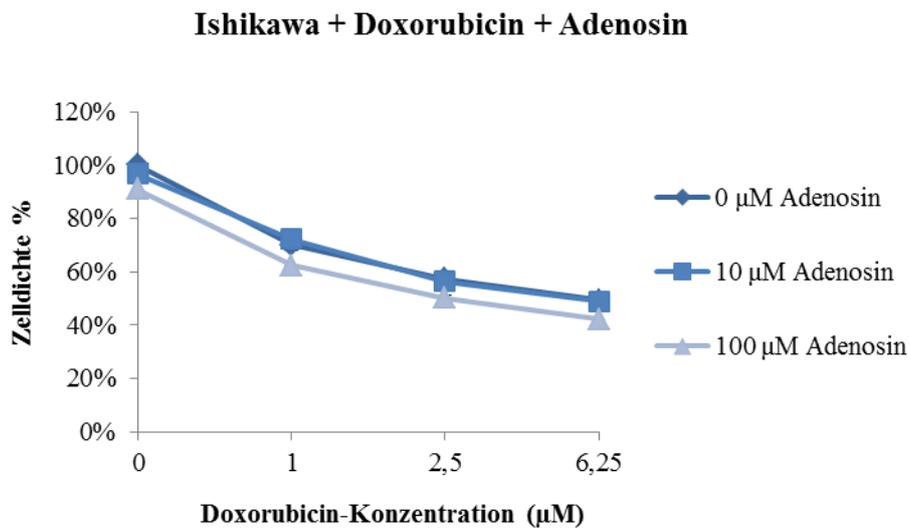


Abbildung 14: Apoptoseverhalten von Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Adenosin- und Doxorubicin-Konzentrationen. Der Fehlerbalken stellt den SEM in Prozent des Mittelwerts dar

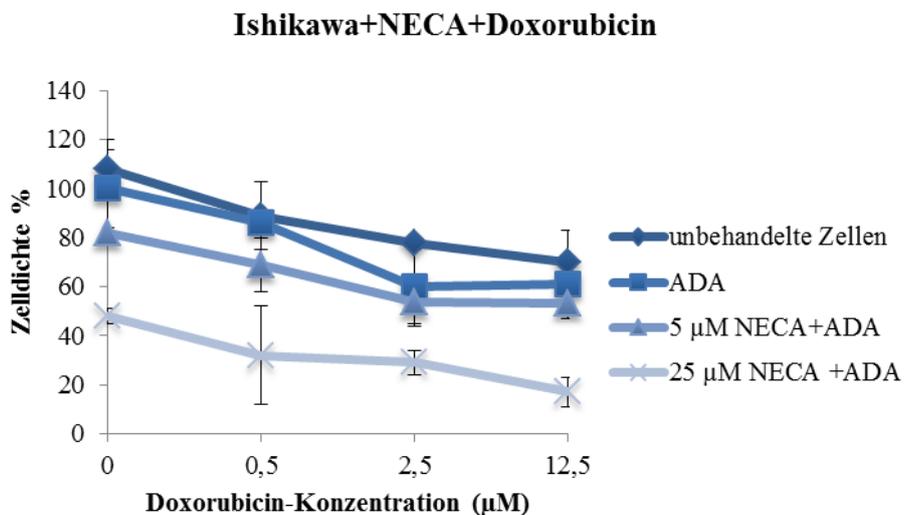


Abbildung 15: Apoptoseverhalten von Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen NECA- und Doxorubicin-Konzentrationen. Der Fehlerbalken stellt den SEM in Prozent des Mittelwerts dar.

Die Ergebnisse unterlagen insgesamt großen Schwankungen. Die eher geringe Sensitivität des Kristallviolett-Assays und größere Beeinflussung der Ergebnisse durch äußere Faktoren mögen hierfür verantwortlich sein; durch weitere Tests könnten genauere Aussagen über die sich hier abzeichnende zytotoxische Wirkung von Adenosin und NECA getroffen werden. Weiterhin wäre interessant, zu untersuchen, ob dieser Effekt tatsächlich über Adenosinrezeptor-vermittelte Signalwege abläuft.

#### **4.4 Proliferationsverhalten der Tumorzellen im BrdU-Assay**

Ziel des Versuches war es, das Proliferationsverhalten der HEC-1-A- und Ishikawa-Tumorzellen nach AR-Stimulation mit diversen Agonisten und Antagonisten zu untersuchen. Im Gegensatz zum unter Punkt 3.2.7 und 4.3 beschriebenen Kristallviolett-Assay, mit dem die Zytotoxizität bestimmter Substanzen nachgewiesen werden kann (absolute Zellzahl), ist der BrdU-Assay ein Zellproliferationsassay. Hier wird die während der DNA-Synthese inkorporierte Menge an BrdU quantifiziert, die mit der Anzahl an neu gebildeten Tumorzellen korreliert (s. Punkt 3.2.8). Zunächst wurde das Proliferationsverhalten der Tumorzellen nach Inkubation mit Adenosin verschiedener Konzentrationen untersucht. Die Ergebnisse (in rlu/s = relative light units/second) wurden auf den Vergleichswert von unbehandelten Zellen prozentualisiert und so die Proliferationsrate errechnet. Hier konnte bei keiner der beiden Zelllinien ein Effekt auf die Zellteilung festgestellt werden. Bei steigenden Konzentrationen an Adenosin (0, 12,5, 25, 50 und 100  $\mu\text{M}$ ) blieb die Proliferationsrate weitestgehend gleich, sie änderte sich nur um Prozentpunkte im einstelligen Bereich und diskontinuierlich (s. Abb. 16), was allerdings wiederum mit der geringen Stabilität von Adenosin in Zellkultur zusammenhängen könnte. In der Abbildung sind die gemittelten Werte aus drei BrdU-Assays dargestellt, die Einzelwerte wurden jeweils in Triplikaten pipettiert, die Stichprobenanzahl betrug also 9 Proben je Konzentration.

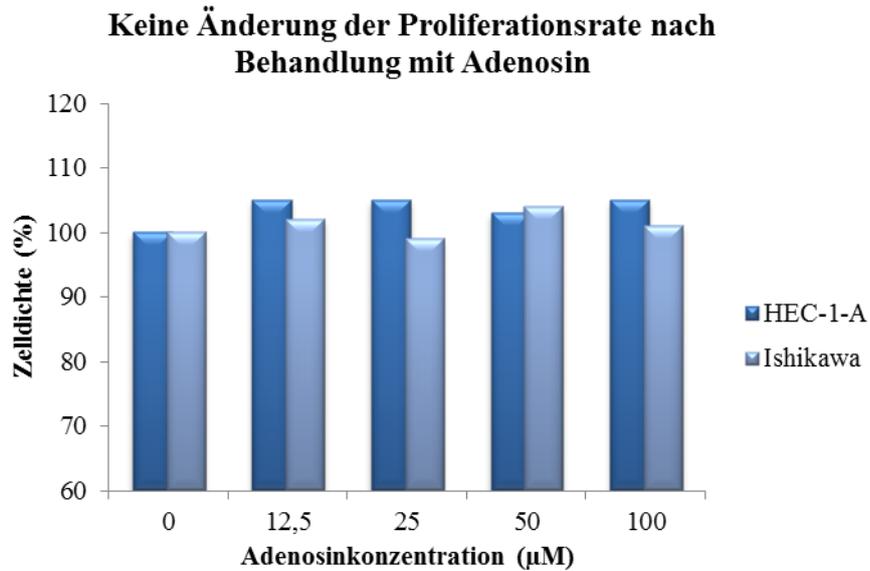


Abbildung 16: Zellproliferationsrate nach Stimulation der Adenosinrezeptoren mit Adenosin

Nun wurden die Tumorzellen mit NECA behandelt, den verschiedenen Konzentrationen wurde ADA zugesetzt, als Vergleichswerte dienten gänzlich unbehandelte Zellen sowie mit ADA behandelte Zellen in Abwesenheit von NECA. Die Proliferationsrate wurde jeweils auf den Wert ohne NECA mit ADA prozentualisiert. Bei beiden Zelllinien fiel die Proliferationsrate mit steigenden Konzentrationen an NECA zunächst nicht ab, bei einer NECA-Konzentration von 10 µM betrug die Proliferationsrate dann noch um die 70% im Vergleich zu den unbehandelten Vergleichszellen. Abbildung 17 zeigt die Proliferationsraten für die HEC-1-A-Zellen.

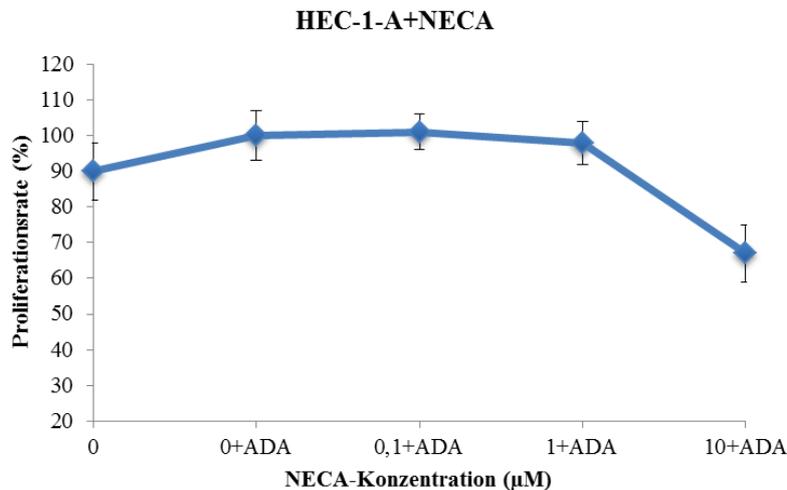


Abbildung 17: Untersuchung der Zellproliferationsrate nach Stimulation der Adenosinrezeptoren mit NECA

Es sind die gemittelten Werte aus drei BrdU-Assays dargestellt, die Einzelwerte wurden jeweils in Triplikaten pipettiert, die Stichprobenanzahl betrug also 9 Proben je Konzentration. Da der SEM im Gegensatz zur Proliferationsrate ein Absolutwert ist, wurde der Fehlerbalken als SEM in Prozent des Mittelwerts dargestellt.

Ein t-Test, in dem die Rohdaten der Vergleichszellen (NECA-Konz. 0  $\mu$ M, versetzt mit ADA) und die der mit 10  $\mu$ M NECA und ADA inkubierten HEC-1-A-Zellen gegenübergestellt wurden, ergab einen p-Wert von 0,0004. Die beiden Matrizen der Rohdaten stammen aus Grundgesamtheiten mit unterschiedlichen Mittelwerten. Eine negative Auswirkung auf die Proliferationsrate nach Behandlung der HEC-1-A-Zellen mit 10  $\mu$ M NECA kann als statistisch erwiesen angesehen werden.

#### **4.5 Expression von CD39 und CD73 auf Tumorzellen nach Adenosinrezeptorstimulation**

Mittels FACS-Analyse sollte überprüft werden, ob sich die Expression der Oberflächenmoleküle CD39 und CD73 auf den HEC-1-A-Zellen und den Ishikawa-Zellen ändert, wenn sie zuvor mit Adenosin oder NECA behandelt wurden. Diese Ektonukleotidasen befinden sich auf regulatorischen T-Zellen des Immunsystems (Treg), werden aber auch besonders stark von Tumorzellen exprimiert. Sie katalysieren unter anderem den Abbau von ATP zu Adenosin, welches im Mikromilieu des Tumors einen immunsuppressiven Effekt ausübt [43]. Der Versuch wurde wie unter Punkt 3.2.9 beschrieben für beide Tumorzelllinien durchgeführt. Die untersuchten Zellen wurden zunächst mit Adenosinkonzentrationen von 20 und 100  $\mu$ M vorbehandelt, in einem zweiten Versuchsansatz nur mit ADA oder mit ADA und Konzentrationen von 5 oder 25  $\mu$ M NECA vorbehandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Es konnte bei keiner der Zelllinien eine signifikante Änderung der Expression von CD39 oder CD73 festgestellt werden, der SFI blieb weitgehend gleich.

In den Abbildungen 18-23 ist dies exemplarisch für die Expression von CD73 auf HEC-1-A-Zellen sowie für die Expression von CD39 auf Ishikawa-Zellen vor und nach NECA-Behandlung dargestellt. Der SFI wurde nach der Formel wie unter Punkt 3.2.9 be-

schrieben errechnet. Die x-Achse repräsentiert die Lichtintensität, die y-Achse die Zellzahl.

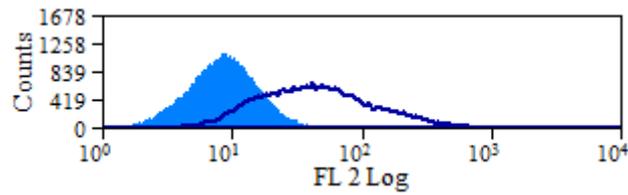


Abbildung 18: Fluoreszenzspektrum der CD73-Antikörperfärbung (dunkelblaue offene Linie) und des zugehörigen Isotypen (hellblaue ausgefüllte Kurve) der durchflusszytometrisch untersuchten HEC-1-A-Zellen nach Vorbehandlung mit ADA. SFI s. Abb. 20

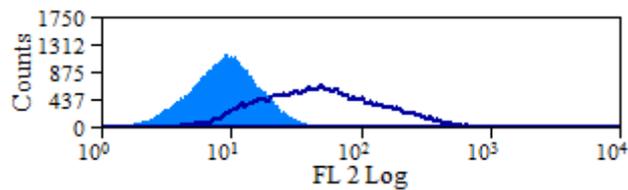


Abbildung 19: Fluoreszenzspektrum der CD73-Antikörperfärbung (dunkelblaue offene Linie) und des zugehörigen Isotypen (hellblaue ausgefüllte Kurve) der durchflusszytometrisch untersuchten HEC-1-A-Zellen nach Vorbehandlung mit ADA und einer Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  NECA. SFI s. Abb. 20

### Expression von CD73 auf HEC-1-A-Zellen

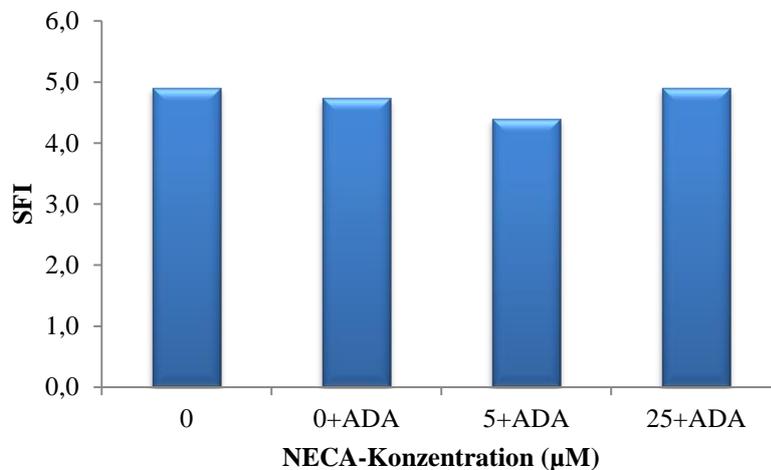


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD73-Expression auf HEC-1-A-Zellen mittels SFI (Specific Fluorescence Index) nach Vorbehandlung mit NECA. Exemplarische Darstellung aus einem Experiment.

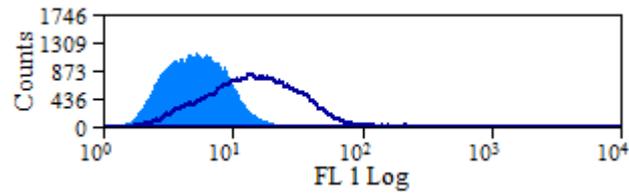


Abbildung 21: Fluoreszenzspektrum der CD39-Antikörperfärbung (dunkelblaue offene Linie) und des zugehörigen Isotypen (hellblaue ausgefüllte Kurve) der durchflusszytometrisch untersuchten Ishikawa-Zellen nach Vorbehandlung mit ADA. SFI s. Abb. 23

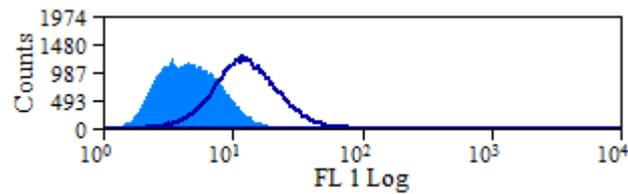


Abbildung 22: Fluoreszenzspektrum der CD39-Antikörperfärbung (dunkelblaue offene Linie) und des zugehörigen Isotypen (hellblaue ausgefüllte Kurve) der durchflusszytometrisch untersuchten Ishikawa-Zellen nach Vorbehandlung mit ADA und einer Konzentration von 25  $\mu$ M NECA. SFI s. Abb. 23

### Expression von CD39 auf Ishikawa-Zellen

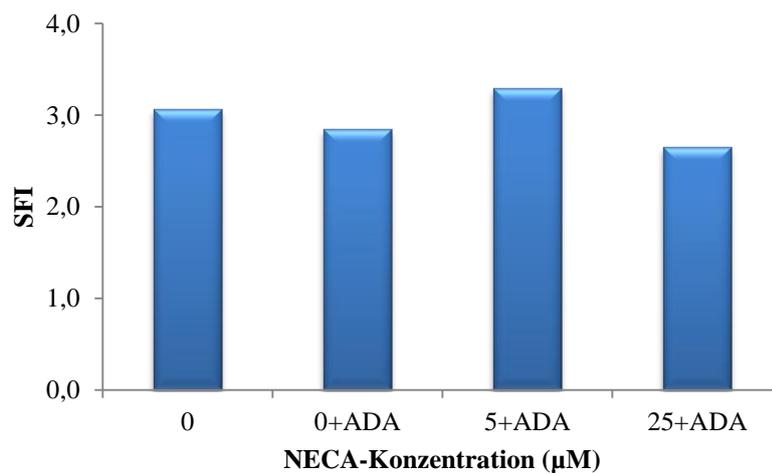


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD39-Expression auf HEC-1-A Zellen mittels SFI (Specific Fluorescence Index) nach Vorbehandlung mit NECA. Exemplarische Darstellung aus einem Experiment.

## 5 DISKUSSION

Es ist allgemein bekannt, dass Adenosinrezeptoren auf nahezu allen Körperzellen von Säugetieren exprimiert werden. Dies ist mittlerweile auch für Zellen vieler Krebsarten belegt. So wurden beispielsweise auf Prostatakrebs- [78], Mammakarzinom-, Melanom-, Lymphom- oder kolorektalen Adenokarzinomzellen AR nachgewiesen [45, 49, 61]. Aufgrund der vielfältigen Signale, die über die Aktivierung von AR ausgelöst werden können, weckten die verschiedenen AR-Subtypen bald als mögliches drug target das Interesse von Wissenschaftlern. In der Bekämpfung von Krankheiten wie Asthma, inflammatorischen Erkrankungen wie Arthritis, Glaukom, neurologischen Erkrankungen wie Parkinson oder eben Krebs sind die Adenosinrezeptoren Gegenstand vieler Forschungsarbeiten [44, 49, 79].

In unserer ersten Versuchsreihe mit den Radioliganden-Bindungsassays konnten auf vier der fünf getesteten Tumorzelllinien AR festgestellt werden.

### Die Brustkrebszelllinien HCC1937 und HCC1806

Die Untersuchung der Hormonrezeptor- und HER2-negativen (triple-negativen) HCC1937-Zellen ergab keine mit dieser Methode messbaren Mengen an Adenosinrezeptoren. Von Beginn an zeigten die HCC1937-Zellen das schwächste Wachstumsverhalten und die größte Anfälligkeit für Mycoplasmen. Während die anderen Zelllinien alle 2-3 Tage in einem Verhältnis von bis zu 1:6 gesplittet wurden, war der Zellrasen der HCC1937-Zellen häufig noch so dünn, dass nur ein Mediumwechsel vorgenommen werden konnte. Einer der in regelmäßigen Abständen durchgeführten Mycoplasmentests fiel bei dieser Zelllinie positiv aus, das Wachstumsverhalten änderte sich aber auch nach Heranzüchtung neuer mycoplasmenfreier Zellen kaum, so dass die Infektion - wie in den meisten Fällen zu beobachten - keine Rolle für Zellwachstum und -vermehrung zu spielen scheint. Der Proteinassay ergab in allen durchgeführten Experimenten den geringsten Proteingehalt. Für die Bindungsassays musste z.T. die unverdünnte Membransuspension verwendet werden, um die (annähernd) gewünschte Proteinmenge zu erreichen. Dies könnte eine mögliche Erklärung sein für die gegenüber den übrigen Zelllinien abweichenden Ergebnisse. Die HCC1937-Zelllinie wurde im Folgenden nicht weiter betrachtet.

Die zweite triple-negative Brustkrebszelllinie HCC1806 zeigte im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien die geringste absolute Anzahl an AR im Bindungsassay. Es fand sich in nachweisbarer Menge nur der  $A_{2A}$ -Rezeptorsubtyp mit durchschnittlich 24 fmol Rezeptor pro mg Membranprotein. Für diesen konnte jedoch im Adenylatcyclaseassay kein Effekt auf die AC-Aktivität nachgewiesen werden. Sofern diese etablierten Zelllinien als repräsentativ für das triple-negative Mammakarzinom gelten können, ist nicht davon auszugehen, dass Adenosinrezeptoren einen therapeutischen Angriffspunkt für das triple-negative Mammakarzinom liefern. Dennoch wären weitere Untersuchungen an Primärmaterial grundsätzlich zu begrüßen.

Diese negativen Befunde treffen aber sicherlich nicht auf alle Brustkrebszelllinien zu. Auf Zellen der Linie MDA-MB468 konnten Panjehpour et al. z.B. funktionelle Formen von  $A_3$ - und  $A_{2B}$ -Rezeptoren nachweisen [80]. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel wurde allerdings nur durch  $A_3$ - und  $A_{2B}$ -selektive Agonisten signifikant verändert, hierbei zeichnete sich eine besondere Relevanz der  $A_3R$  ab. Nur bei  $A_3R$ -Stimulation ergab sich eine reduzierte Lebensdauer der untersuchten Zellen. Diese Wirkung konnte durch vorherige Behandlung mit einem  $A_3R$ -Antagonisten aufgehoben werden. Adenosin triggert hier ein zytotoxisches Signal via  $A_3R$ -Aktivierung, das bei den übrigen Subtypen nicht beobachtet werden konnte [80]. Auf einer anderen Brustkrebs-Zelllinie, MDA-MB-231, hatte eine Stimulation des  $A_{2B}R$  jedoch ebenfalls einen Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Levels via AC und PLC zur Folge [45].

Dies deckt sich insofern mit unseren Ergebnissen für die HCC1806-Zelllinie, als dass wir im AC-Assay keine veränderten cAMP-Spiegel nach Stimulation des  $A_{2A}R$  nachweisen konnten.

In einer Untersuchung von Panjehpour et al. zeigte der Vergleich von gesundem Gewebe mit diversen Brustkrebs-Zelllinien eine 1,27-fach höhere Genexpression von  $A_3R$ -Transkripten im Tumorgewebe, was die Theorie unterstützt, dass den  $A_3R$  eine Funktion im Tumorgeschehen zukommen könnte [81]; in einer anderen Studie wurde eine um 78% gesteigerte  $A_3R$ -Expression gefunden und als charakteristisch für solide Primärtumoren und Metastasen bezeichnet [65]. Chung et al. konnten einen Antitumor-Effekt in ER-positiven sowie ER-negativen Brustkrebszellen bei  $A_3R$ -Stimulation mit dem Agonisten LJ-529 nachweisen [82]. Für die Genexpression von  $A_1R$ -Transkripten konnten Panjehpour et al. keinen signifikanten Unterschied zwischen normalem Gewebe und

Brustkrebszellen feststellen [81], während man in einer weiteren Studie fand, dass von 24 getesteten Brustkrebs-Zelllinien der A<sub>1</sub>R in über 62% der Proben im Gegensatz zu gesundem Brustdrüsengewebe überexprimiert war. An der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-468 konnte nach Ausschaltung des A<sub>1</sub>R ein verlangsamender Effekt auf Zellwachstum und -proliferation sowie ein vermehrter Zelltod festgestellt werden [83]. Eine weitere Untersuchung zeigte, dass in ER-positiven Brustkrebszelllinien der A<sub>1</sub>R als Mediator für die proliferativen Effekte des Estradiol fungiert [53].

Über die Rolle des A<sub>2A</sub>R für den Brustkrebs ist wenig bekannt. Wir konnten in unseren Versuchen keinen Effekt von A<sub>2A</sub>R-Stimulation auf die AC-Aktivität feststellen, was sich mit den Ergebnissen aus anderen Versuchen mit Brustkrebszellen deckt (s.o.). Dies schließt nicht aus, dass der A<sub>2A</sub>R doch eine Rolle bei Brusttumoren spielt. Etique et al. konnten anhand der (ER-positiven) MCF-7 Brustkrebszelllinie zeigen, dass der selektive Agonist CGS 21680 sich sowohl wachstumsfördernd auf die Zellen, als auch stimulierend auf die Transkription des Progesteronrezeptors auswirkte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zwischen dem A<sub>2A</sub>R und dem ERalpha ein Crosstalk stattfindet, der die Effekte von Ethanol auf Brustkrebszellen beeinflusst [84].

Das Vorkommen von Adenosinrezeptoren auf Brustkrebszellen scheint sehr unterschiedlich. Ebenso unterschiedlich sind die beschriebenen Effekte auf das Tumorge-schehen. Zu bedenken sind die verwendeten Untersuchungsmethoden (von Adenylatcyclaseassays über Western-Blots bis hin zu genetischen Tests wie der RT-PCR), die Unterschiede in den Zelllinien (wie z.B. der Hormonstatus) und die Vielfalt der zur Rezeptorstimulation oder -blockade verwendeten Liganden sowie Rezeptor-unabhängige Effekte der Substanzen. So wurden etwa für CI-IB-MECA diverse Anti-tumor Effekte nachgewiesen, die nicht über den Adenosinrezeptor-vermittelten Signalweg ablaufen. Untersuchungen an Zellen eines Schilddrüsenkarzinoms zeigten, dass hier die Zellproliferation gänzlich unabhängig von einer A<sub>3</sub>R-Aktivierung inhibiert wurde. Der antiproliferative Effekt besteht hier aus einem Aussetzen des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase sowie einer Inhibierung der Phosphorylierung von ERK1/2 (eine Protein-Kinase, die unter anderem für die Regulation von Zellproliferation und -differenzierung sowie Apoptose involviert ist [85]). Selbst eine Kombination von Antagonisten an allen vier Adenosinrezeptor-Subtypen konnte diese Wirkung nicht schmälern [48]. Eine gene-

relle Aussage über den Einfluss von AR auf Brustkrebs treffen zu können, bleibt eine Herausforderung; klinische Tests sind bislang noch weitestgehend ausgeblieben.

#### Die Zervix- bzw. Uteruskarzinomzellen SiHa, Ishikawa und HEC-1-A

Im Radioliganden-Bindungsassay fanden wir auf den Zervixkarzinomzellen der SiHa-Zelllinie den AR-Subtyp  $A_{2A}$ , auf den Uteruskarzinomzellen der Ishikawa- und HEC-1-A-Zelllinien die AR-Subtypen  $A_1$  und  $A_{2A}$  in nachweisbarer Menge (s. Abb. 7).

Der Adenylatcyclaseassay wurde nur mit den Ishikawa- und HEC-1-A-Zellen durchgeführt, ein Effekt auf die AC konnte nur bei den HEC-1-A-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 8). Durch vorherige Stimulation mit NECA oder CCPA wurde die AC in ihrer Aktivität gehemmt (hauptsächlich via  $A_1R$ ). Zur Unterscheidung, ob das Signal durch  $A_{2A}$ - und/oder  $A_{2B}$ -R ausgelöst wird, wurde CGS 21680 herangezogen. Durch Vorbehandlung mit dem  $A_1R$ -Antagonisten DPCPX sollten die Bindungsstellen an den auf den Zellen vorhandenen  $A_1R$  abgesättigt werden. Verglichen mit der Signalstärke, die nach der Behandlung der Zellmembranen mit NECA in Gegenwart von DPCPX zu beobachten war, fiel diejenige nach Behandlung mit CGS 21680 und DPCPX in etwa gleich hoch aus. Aufgrund der sehr viel geringeren Affinität von CGS 21680 zum  $A_{2B}$ -R (s. Tab. 1) müsste dieses Signal ausbleiben, wäre ein  $A_{2B}R$  in den Proben enthalten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das bei den HEC-1-A-Zellen beobachtete Signal nicht über einen  $A_{2B}R$  vermittelt wird.

Während die SiHa-Zellen nach Rezeptorstimulation im Kristallviolettassay nicht mit einer Veränderung der Apoptoserate reagierten, fiel die Zelldichte bei den Ishikawa- und HEC-1-A-Zellen nach Behandlung mit Adenosin bzw. NECA ab. Bei Behandlung der HEC-1-A-Zellen mit Adenosin erreichte die Kurve bei einer Adenosinkonzentration zwischen 12,5 und 25  $\mu M$  ein Plateau bei knapp 80% der Vergleichszelldichte, um danach weiter abzufallen (s. Abb. 10). Möglicherweise ist bei diesen Konzentrationen die Grenze erreicht, bis zu der Adenosin einen Rezeptor-vermittelten Einfluss auf die Apoptoserate der Zellen hat; bei sehr hohen Konzentrationen ist eine generell toxische Wirkung von Adenosin nicht auszuschließen. Bei den Ishikawa-Zellen fällt die Kurve deutlich flacher aus (s. Abb. 11). Erst bei einer Adenosinkonzentration von 100  $\mu M$  ist eine Verringerung der Zelldichte um etwa 20% zu verzeichnen. Für den  $A_3R$  wurde bereits nachgewiesen, dass die Induktion von Apoptose oder Zellwachstum von der

Konzentration des Agonisten abhängt; des Weiteren bestätigen Ohana et al., dass Adenosin in niedrigen Konzentrationen (unterer mikromolarer Bereich) an diversen „normalen“ Zellen wachstumsfördernd wirkt, während ab einer Konzentration von mehr als 100  $\mu\text{M}$  Adenosin die Apoptose in bestimmten Tumor- oder normalen Zellen induziert wird [86].

Im Besonderen bei der Ishikawa-Zelllinie könnten weitere Tests Aufschluss darüber geben, ob ein Rezeptor-vermittelter Effekt vorliegt, oder ob Adenosin Rezeptor-unabhängig in dieser hohen Konzentration zum Zelltod führte. So könnte der Kristallviolett-Assay mit Zellen wiederholt werden, die keine Adenosinrezeptoren exprimieren, um unspezifische Effekte auszuschließen. Weiterhin ist eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch endogenes Adenosin und dessen Metabolite zu bedenken, da in dieser Versuchsreihe keine ADA zugesetzt wurde.

Im Versuch mit NECA wurden hingegen alle Proben mit ADA versetzt, wobei eine Kontrolle durch gänzlich unbehandelte Zellen erfolgte (s. Abb. 12 und 13). Unbehandelte und nur mit ADA versetzte Zellen zeigten hier jedoch keine deutlichen Unterschiede bezüglich ihres Apoptoseverhaltens, was gegen einen relevanten Beitrag von endogenem Adenosin spricht. Die Kurven fielen nach Behandlung mit NECA deutlich stärker ab als nach Behandlung mit Adenosin. Ein Grund für die unterschiedliche Wirkung von NECA und dem natürlichen Agonisten auf die Zellen könnte die höhere Stabilität (und damit einhergehend höhere Potenz) von NECA sein. Bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  NECA waren fast keine lebenden Zellen mehr vorhanden. Da der Kristallviolettassay nur adhärenz Zellen erfasst, ist allerdings nicht gänzlich auszuschließen, dass NECA nicht (nur) zum Zelltod, sondern vermehrt zu einer Ablösung der Zellen führt. Weitere Versuchsansätze, etwa in Form von Lebend-/Totfärbungen oder Zellzyklusanalysen würden helfen, die Ergebnisse zu verifizieren.

Eine Untersuchung an Patientinnen mit gynäkologischen Krebserkrankungen lieferte erste Hinweise darauf, dass die ADA-Aktivität peripherer Lymphozyten einen Einfluss auf die Tumorprogression hat. Fehlte das Enzym oder lagen die Werte weit unter dem Durchschnitt, konnte ein schnelleres Fortschreiten der Krankheit beobachtet werden [87]. Welch schwerwiegende Auswirkungen das Fehlen von ADA hat, zeigt sich auch am Beispiel der ADA-Defizienz, einer Form der sogenannten severe combined immunodeficiencies (SCID) mit genetischem Defekt auf Chromosom 20q12-+13. Die Krank-

heit zeigt erste Symptome meist zwischen dem 3. und 6. Lebensmonat, wenn die von der Mutter übertragenen Immunglobuline schwinden. Die betroffenen Patienten haben mit rekurrenten Infektionen zu kämpfen [88], etwa die Hälfte von ihnen weisen skeletale Anomalien auf und einige entwickeln neurologische Störungen. Das Fehlen der ADA bewirkt eine Akkumulation von Adenosin und Desoxyadenosin, was eine indirekt toxische Wirkung auf Lymphozyten und insbesondere Thymozyten hat. Ein schwerer Mangel an T- und B-Zellen sowie NK-Zellen ist die Folge [89]. Der zytotoxische Effekt von Adenosin und Desoxyadenosin in Abwesenheit von ADA konnte auch für die Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB468 nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte durch den AR-Inhibitor 8-Phenyltheophyllin nicht aufgehoben werden [90].

Nach Stimulation der Adenosinrezeptoren mit CCPA und ADA-Zusatz wurde bei beiden Zelllinien keine kontinuierliche Änderung der Apoptoserate festgestellt. Zu bedenken ist, dass die Endkonzentrationen an CCPA möglicherweise zu gering dosiert waren. Weiterhin konnte im Adenylatcyclaseassay bei den Ishikawa-Zellen keine funktionelle Form des A<sub>1</sub>-Rezeptors nachgewiesen werden, die einen Effekt über den Signalweg der Adenylatcyclase ausübt.

Im Kristallviolettassay konnten wir keinen Synergismus von AR-Agonisten mit diversen Chemotherapeutika nachweisen. Rickles et al. fanden in einer Studie an Knochenmarkszellen von Patienten mit multiplem Myelom einen Synergismus von Agonisten am A<sub>2A</sub>-Rezeptor und am β<sub>2</sub>-adrenergen Rezeptor sowie einen zusätzlichen Synergismus mit Chemotherapeutika wie Doxorubicin [91]. In der Onkologie gehört die Kombination verschiedener Wirkstoffe schon längst zur Basistherapie; dies macht häufig eine Dosisanpassung der Medikation möglich, was für die Patienten nicht selten weniger Nebenwirkungen bedeutet. Einen weiteren vielversprechenden Ansatz im Kampf gegen Krebs neben der direkt synergistischen Wirkung zweier Chemotherapeutika konnten Emanuelov et al. an Ratten in vivo zeigen. Die herzscheidigenden Nebenwirkungen von Doxorubicin konnten durch vorherige Behandlung mit einem A<sub>3</sub>R-Agonisten deutlich abgemildert werden [92]. Wir haben für den Kristallviolett-Assay die Todesliganden mit Adenosin oder NECA kombiniert. Dies sind nicht-selektive Agonisten an AR; NECA besitzt gerade an den auf den getesteten Zellen vorhandenen A<sub>1</sub>- und A<sub>2A</sub>-Rezeptoren eine ähnliche Affinität (s. Tab. 1). Ein möglicher Grund für den nicht erkennbaren Synergismus in unserem Versuch könnte sein, dass sich die Effekte des A<sub>1</sub>-

und A<sub>2A</sub>R gegenseitig beeinflussen oder gar aufheben. Weitere Tests mit selektiveren Liganden könnten dies klären.

Im BrdU-Assay reagierten die Ishikawa- und HEC-1-A-Zellen auf eine AR-Stimulation mit Adenosin selbst bei einer Adenosinkonzentration von 100 µM nicht mit einer verminderten Proliferationsrate, während im Zytotoxizitätsassay bereits ab Konzentrationen zwischen 6,25 und 25 µM ein Effekt beobachtet werden konnte (s. Abb. in 3.3 und 3.4). Da ein proapoptotischer Effekt (geringere absolute Zahl an lebenden bzw. adhären-ten Zellen im Kristallviolettassay bei steigender Adenosinkonzentration) auch die Zahl der BrdU-einbauenden Zellen reduzieren müsste, dürfte dieses negative Versuchsergebnis am ehesten durch raschen Abbau von Adenosin zu erklären sein. Auf die Behandlung mit dem metabolisch stabilen Adenosin-Analogon NECA reagierten die Zellen bei einer Konzentration von 10 µM dann auch im BrdU Assay mit einer verminderten Proliferationsrate, im Kristallviolettassay war ebenfalls ab einem Konzentrationsbereich zwischen 6,25 und 12,5 µM ein Effekt zu beobachten. Um die gleichermaßen proapoptotische wie wachstumsverringende Wirkung von NECA näher zu untersuchen, wären weitere BrdU-Assays in einem weiteren NECA-Konzentrationsbereich sowie weitere apoptosespezifische Tests (AnnexinV-Färbung, Caspasenaktivitätsmessung, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Nachweis der DNA-Fragmentierung) sinnvoll.

Für weitere Purinrezeptoren sind Effekte auf Zellzyklus und Apoptose bereits belegt. Katzur et al. fanden in einer Studie an HEC-1-A- und Ishikawa-Zellen erste Hinweise auf eine Minderung der Proliferationsrate via Aktivierung des P2Y<sub>2</sub>-Rezeptors durch ATP [93]. Eine andere Studie zeigte anhand von humanen Epithelzellen der Zervix, dass die Aktivierung des P2X<sub>7</sub>-Rezeptors durch ATP ebenfalls zu einer Steigerung der Apoptoserate führt [94].

Ishikawa- und HEC-1-A-Zellen exprimieren CD39- und CD73-Moleküle. Diese Ektonukleotidasen bauen ATP zu Adenosin ab und sind unter anderem in von Krebszellen sezernierten Exosomen enthalten. Adenosin unterdrückt in der Folge die Immunantwort von T-Zellen im Mikromilieu des Tumors [43]. Im Mausmodell konnten Künzli et al. einen Zusammenhang zwischen CD39-Expression und der Aggressivität des Kolorektalen Karzinoms zeigen; niedrige CD39-Levels schienen mit längerem Überleben zu korrelieren [95]. Auch Bastid et al. sehen in der Inhibition von CD39-Molekülen eine viel-

versprechende Möglichkeit, Krebserkrankungen zu therapieren [96]. Noch zahlreicher sind die Nachweise, dass CD73 auf Tumorzellen die T-Zell-vermittelte Antitumor-Wirkung mindert [97], während eine Hemmung von CD73 Tumorwachstum und Metastasierung beeinträchtigt [98]. Es wird angenommen, dass CD73 eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese spielt und CD73-exprimierende Tumorzelllinien sich aggressiver ausbreiten. In einer Studie zur klinischen Bedeutung von CD73 fand man jedoch heraus, dass die Expression von CD73 auf Brustkrebszelllinien mit einer guten Prognose korrelierte. 136 Patientinnen mit Brustkrebs wurden untersucht, wobei sich herausstellte, dass Patientinnen mit CD73-exprimierenden Tumoren länger krankheitsfrei überlebten [99]. Im FACS-Assay an den HEC-1-A- und Ishikawa-Zellen konnten wir zwar das Vorhandensein von CD39- bzw. CD73-Molekülen, aber keine veränderte Expression nach AR-Stimulation feststellen. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Tests, z.B. mit längeren Inkubationszeiten, zu einem anderen Ergebnis geführt hätten. Durch unseren Versuchsaufbau konnte aber kein direkter Regelkreis nachgewiesen werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Adenosinrezeptoren werden auf nahezu allen Körperzellen exprimiert und übernehmen dort vielfältige und wichtige Funktionen. Auch auf diversen Tumorzelllinien konnten bereits Adenosinrezeptoren nachgewiesen und – je nach Subtyp – mit Pro- oder Antitumor-Effekten in Zusammenhang gebracht werden.

In dieser Arbeit wurden Gebärmutterhalskrebszellen sowie endometriale und triple-negative Brustkrebszellen auf Expression und mögliche Funktionen von Adenosinrezeptoren untersucht. Da spezifische Antikörper bis heute nicht verfügbar sind, wurde ein pharmakologischer Ansatz mit subtypspezifischen Agonisten und Antagonisten gewählt.

In Radioliganden-Bindungsassays, konnte nachgewiesen werden, dass sich auf der Zervixkarzinom-Zelllinie SiHa und der Brustkrebs-Zelllinie HCC1806 Adenosinrezeptoren des Subtyps  $A_1$  befinden. Die endometrialen Krebszelllinien Ishikawa und HEC-1-A exprimieren Rezeptoren vom Subtyp  $A_1$  und  $A_{2A}$ .  $A_3$ -Adenosinrezeptoren wurden auf keiner der untersuchten Zelllinien gefunden.

Der Nachweis von  $A_{2B}$ -Rezeptoren kann mit dem Radioliganden-Bindungsassay nicht erbracht werden, da bislang kein Radioligand bekannt ist, der eine ausreichende Affinität besitzt, um diesen Subtyp zweifelsfrei nachweisen zu können.

Obwohl die Mehrheit der untersuchten Zelllinien Adenosinrezeptoren exprimiert, konnte ein signifikanter Effekt auf die Adenylatcyclase bei Stimulation der auf den Zellen vorhandenen Adenosinrezeptoren nur bei den HEC-1-A-Zellen festgestellt werden. Auch auf funktionelle  $A_{2B}$ -Rezeptoren fand sich im Adenylatcyclaseassay kein Hinweis.

Im durchgeführten Kristallviolettassay zeigte sich ein proapoptotischer Effekt auf Ishikawa- und HEC-1-A-Zellen bei hohen Adenosin-Konzentrationen (100  $\mu$ M). Die im BrdU-Assay gemessene Proliferationsrate hingegen änderte sich nach Vorbehandlung mit Adenosin nicht. Das metabolisch stabilere NECA (in Kombination mit ADA) hatte im Kristallviolettassay einen stärkeren Einfluss auf die Apoptoserate der jeweiligen Zelllinie als Adenosin und auch im BrdU-Assay sank die Menge an inkorporiertem BrdU. Ein Synergismus zwischen Stimulation von Adenosinrezeptoren und diversen Todesliganden bzw. Chemotherapeutika konnte nicht nachgewiesen werden.

Freies extrazelluläres Adenosin kann auch aus dem Abbau von ATP generiert werden, wenn Zellen die Ektonukleotidasen CD39 und CD73 exprimieren. Aufgrund der immunsuppressiven Wirkung von Adenosin können diese Enzyme T-Zell- und NK-Zellantworten im Mikromilieu von Tumoren hemmen. Die durchflusszytometrische Analyse von HEC-1-A- und Ishikawa-Zellen zeigte zwar, dass die Expression von CD39 und CD73 nach Stimulation der Adenosinrezeptoren unverändert blieb. Die Expression von Enzymen, lässt aber vermuten, dass die Zellen *in vivo* von Adenosin profitieren könnten. Angesichts der *in vitro* Daten, die allenfalls einen wachstumshemmenden Effekt von Adenosin zeigten, könnte die vorrangige Wirkung von Adenosin im Tumormikromilieu tatsächlich auf der Inhibition von Immunantworten beruhen. Möglicherweise würden die Rezeptoren dann in erster Linie als Sensoren dienen.

Weitere Forschungsarbeit wird helfen, die Rolle der Adenosinrezeptoren im Tumorge-schehen vollständig zu verstehen und möglicherweise für die Krebstherapie nutzbar zu machen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Helmholtz-Gemeinschaft, D.K.i.d. *Die fünf häufigsten Krebstodesursachen in Deutschland für Frauen*. 2012 27.03.2012; Available from: [http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort\\_6.html#inhalt4](http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_6.html#inhalt4).
2. Beckmann, M.W., *Frauenheilkunde Up2Date*. 2009, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
3. Amant, F., et al., *Endometrial cancer*. *Lancet*, 2005. **366**(9484): p. 491-505.
4. *Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends*. Broschüre des Robert Koch-Instituts (Hrsg.) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), 7. Ausgabe, 2010.
5. Gatta, G., M.B. Lasota, and A. Verdecchia, *Survival of European women with gynaecological tumours, during the period 1978-1989*. *EUROCARE Working Group*. *Eur J Cancer*, 1998. **34**(14 Spec No): p. 2218-25.
6. Amant, F., et al., *Treatment modalities in endometrial cancer*. *Curr Opin Oncol*, 2007. **19**(5): p. 479-85.
7. *interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Therapie und Diagnostik des Endometriumkarzinoms*. Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2008.
8. Rodriguez Villalba, S., C. Diaz-Caneja Planell, and J.M. Cervera Grau, *Current opinion in cervix carcinoma*. *Clin Transl Oncol*, 2011. **13**(6): p. 378-84.
9. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
10. *GBE-Heft 37 "Gebärmutterhals"*. [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de), 2007.
11. *interdisziplinäre S2-Leitlinie Zervixkarzinom der deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und der deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG)*. 2009.
12. Schiffman, M. and N. Wentzensen, *From human papillomavirus to cervical cancer*. *Obstet Gynecol*, 2010. **116**(1): p. 177-85.
13. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 32*. Robert Koch Institut (Hrsg.), 2009.
14. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. *Lancet*, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
15. Davies, P., et al., *The future of cervical cancer prevention in Europe*. *Coll Antropol*, 2007. **31 Suppl 2**: p. 11-6.
16. *Epidemiologisches Bulletin Nr. 30*. STIKO des Robert Koch-Instituts (Hrsg.), 2011.
17. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Deutsche Krebsgesellschaft e.V. (Hrsg.) und Deutsche Gesellschaft für Geburtshilfe und Gynäkologie (Hrsg.) 2008.
18. 08.05.2009; Available from: <http://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/brustkrebs-mann/index.php>.
19. *Stufe-3-Leitlinie Brustkrebs-Früherkennung in Deutschland*. Deutsche Gesellschaft für Senologie e.V. (Hrsg.) und deutsche Krebshilfe e.V. (Hrsg.), 1. Aktualisierung 2008.
20. Janni, W.e.a., *Therapie des primären, invasiven Mammakarzinoms*. *deutsches Ärzteblatt*, 2005. **41**.
21. Sloane, J.P., et al., *[Guidelines for pathology--supplement to European guidelines for quality assurance in mammography screening. Report by the Pathology Working Group of the European Community]*. *Pathologie*, 1997. **18**(1): p. 71-88.

22. Goldhirsch, A., et al., *Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011*. Ann Oncol, 2011. **22**(8): p. 1736-47.
23. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1687-717.
24. Burnstock, G., *Purinergic nerves and receptors*. Prog Biochem Pharmacol, 1980. **16**: p. 141-54.
25. Birnbaumer, L., J. Abramowitz, and A.M. Brown, *Receptor-effector coupling by G proteins*. Biochim Biophys Acta, 1990. **1031**(2): p. 163-224.
26. Rosenbaum, D.M., S.G. Rasmussen, and B.K. Kobilka, *The structure and function of G-protein-coupled receptors*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 356-63.
27. Karnik, S.S., et al., *Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(9): p. 431-7.
28. van Calker, D., M. Muller, and B. Hamprecht, *Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells*. J Neurochem, 1979. **33**(5): p. 999-1005.
29. Zhou, Q.Y., et al., *Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(16): p. 7432-6.
30. Fredholm, B.B., et al., *Nomenclature and classification of purinoceptors*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 143-56.
31. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): p. 527-52.
32. Jaakola, V.P. and A.P. Ijzerman, *The crystallographic structure of the human adenosine A2A receptor in a high-affinity antagonist-bound state: implications for GPCR drug screening and design*. Curr Opin Struct Biol, 2010. **20**(4): p. 401-14.
33. Klotz, K.N., *Adenosine receptors and their ligands*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 382-91.
34. Liang, B.T. and K.A. Jacobson, *A physiological role of the adenosine A3 receptor: sustained cardioprotection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6995-9.
35. Kristiansen, K., *Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function*. Pharmacol Ther, 2004. **103**(1): p. 21-80.
36. Ralevic, V. and G. Burnstock, *Receptors for purines and pyrimidines*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(3): p. 413-92.
37. Deussen, A., *Metabolic flux rates of adenosine in the heart*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2000. **362**(4-5): p. 351-63.
38. Ballarin, M., et al., *Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism*. Acta Physiol Scand, 1991. **142**(1): p. 97-103.
39. Baldwin, S.A., et al., *The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 735-43.

40. Fredholm, B.B., et al., *Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells*. *Biochem Pharmacol*, 2001. **61**(4): p. 443-8.
41. Klotz, K.N., et al., *[3H]HEMADO--a novel tritiated agonist selective for the human adenosine A3 receptor*. *Eur J Pharmacol*, 2007. **556**(1-3): p. 14-8.
42. Ongini, E., et al., *Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1999. **359**(1): p. 7-10.
43. Clayton, A., et al., *Cancer Exosomes Express CD39 and CD73, Which Suppress T Cells through Adenosine Production*. *J Immunol*, 2011. **187**(2): p. 676-83.
44. Gessi, S., et al., *Adenosine receptors in health and disease*. *Adv Pharmacol*, 2011. **61**: p. 41-75.
45. Panjehpour, M., M. Castro, and K.N. Klotz, *Human breast cancer cell line MDA-MB-231 expresses endogenous A2B adenosine receptors mediating a Ca<sup>2+</sup> signal*. *Br J Pharmacol*, 2005. **145**(2): p. 211-8.
46. Gessi, S., et al., *Adenosine receptors in colon carcinoma tissues and colon tumoral cell lines: focus on the A(3) adenosine subtype*. *J Cell Physiol*, 2007. **211**(3): p. 826-36.
47. Fishman, P., et al., *Adenosine receptors and cancer*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(193): p. 399-441.
48. Morello, S., et al., *Cl-IB-MECA inhibits human thyroid cancer cell proliferation independently of A3 adenosine receptor activation*. *Cancer Biol Ther*, 2008. **7**(2): p. 278-84.
49. Gessi, S., et al., *Adenosine receptors and cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1808**(5): p. 1400-12.
50. Khoo, H.E., et al., *Differential expression of adenosine A1 receptors in colorectal cancer and related mucosa*. *Cancer Lett*, 1996. **106**(1): p. 17-21.
51. Lelievre, V., J.M. Muller, and J. Falcon, *Adenosine modulates cell proliferation in human colonic adenocarcinoma. I. Possible involvement of adenosine A1 receptor subtypes in HT29 cells*. *Eur J Pharmacol*, 1998. **341**(2-3): p. 289-97.
52. Woodhouse, E.C., et al., *Adenosine receptor mediates motility in human melanoma cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **246**(3): p. 888-94.
53. Lin, Z., et al., *Adenosine A1 receptor, a target and regulator of estrogen receptoralpha action, mediates the proliferative effects of estradiol in breast cancer*. *Oncogene*, 2010. **29**(8): p. 1114-22.
54. Shaban, M., R.A. Smith, and T.W. Stone, *Purine suppression of proliferation of Sertoli-like TM4 cells in culture*. *Cell Prolif*, 1995. **28**(12): p. 673-82.
55. D'Ancona, S., et al., *Effect of dipyrindamole, 5'-(N-ethyl)-carboxamidoadenosine and 1,3-dipropyl-8-(2-amino-4-chlorophenyl)-xanthine on LOVO cell growth and morphology*. *Anticancer Res*, 1994. **14**(1A): p. 93-7.
56. Hausler, S.F., et al., *Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. **60**(10): p. 1405-18.
57. Sitkovsky, M.V., et al., *Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(19): p. 5947-52.
58. Ohta, A., et al., *A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(35): p. 13132-7.

59. Ma, D.F., et al., *Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells*. Hum Pathol, 2010. **41**(11): p. 1550-7.
60. Cekic, C., et al., *Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 198-205.
61. Fishman, P., et al., *A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy*. Anticancer Drugs, 2002. **13**(5): p. 437-43.
62. Fishman, P., et al., *Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the A3 adenosine receptor*. Eur J Cancer, 2000. **36**(11): p. 1452-8.
63. Fishman, P., S. Bar-Yehuda, and L. Vagman, *Adenosine and other low molecular weight factors released by muscle cells inhibit tumor cell growth*. Cancer Res, 1998. **58**(14): p. 3181-7.
64. Fishman, P., et al., *Evidence for involvement of Wnt signaling pathway in IB-MECA mediated suppression of melanoma cells*. Oncogene, 2002. **21**(25): p. 4060-4.
65. Madi, L., et al., *The A3 adenosine receptor is highly expressed in tumor versus normal cells: potential target for tumor growth inhibition*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(13): p. 4472-9.
66. Klotz, K.N., et al., *Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1998. **357**(1): p. 1-9.
67. Löffler, G., P.E. Petrides, and P.C. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*. 8 ed. 2006: Springer. 1288.
68. Lohse, M.J., et al., *8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX)--a selective high affinity antagonist radioligand for A1 adenosine receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1987. **336**(2): p. 204-10.
69. Jakobs, K.H., W. Saur, and G. Schultz, *Reduction of adenylate cyclase activity in lysates of human platelets by the alpha-adrenergic component of epinephrine*. J Cyclic Nucleotide Res, 1976. **2**(6): p. 381-92.
70. *Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)*. 2005, Roche Applied Science.
71. Rahman, M., *Introduction to Flow Cytometry*, AbD Serotec.
72. *Cisplatin - Compound Summary (CID 441203)*. 2004.
73. *Doxorubicin - Compound Summary (CID 31703)*. 2005.
74. Rezk, Y.A., et al., *Use of resveratrol to improve the effectiveness of cisplatin and doxorubicin: study in human gynecologic cancer cell lines and in rodent heart*. Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(5): p. e23-6.
75. Hanusova, V., I. Bousova, and L. Skalova, *Possibilities to increase the effectiveness of doxorubicin in cancer cells killing*. Drug Metab Rev, 2011.
76. El-Zawahry, A., J. McKillop, and C. Voelkel-Johnson, *Doxorubicin increases the effectiveness of Apo2L/TRAIL for tumor growth inhibition of prostate cancer xenografts*. BMC Cancer, 2005. **5**: p. 2.
77. Naumnik, W., et al., *Serum levels of sFas and sFasL during chemotherapy of lung cancer*. Exp Oncol, 2007. **29**(2): p. 132-6.
78. Aghaei, M., et al., *Molecular mechanisms of A3 adenosine receptor-induced G1 cell cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and independent prostate cancer cell lines: involvement of intrinsic pathway*. J Cancer Res Clin Oncol, 2011.

79. Stone, T.W., S. Ceruti, and M.P. Abbracchio, *Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration*. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(193): p. 535-87.
80. Panjehpour, M. and F. Karami-Tehrani, *Adenosine modulates cell growth in the human breast cancer cells via adenosine receptors*. *Oncol Res*, 2007. **16**(12): p. 575-85.
81. Panjehpour, M., S. Hemati, and M.A. Forghani, *Expression of A1 and A3 adenosine receptors in human breast tumors*. *Tumori*, 2012. **98**(1): p. 137-41.
82. Chung, H., et al., *The antitumor effect of LJ-529, a novel agonist to A3 adenosine receptor, in both estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative human breast cancers*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(3): p. 685-92.
83. Mirza, A., et al., *RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis*. *Cancer Biol Ther*, 2005. **4**(12): p. 1355-60.
84. Etique, N., et al., *Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells*. *Oncol Rep*, 2009. **21**(4): p. 977-81.
85. Garnett, M.J. and R. Marais, *Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(4): p. 313-9.
86. Ohana, G., et al., *Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor*. *J Cell Physiol*, 2001. **186**(1): p. 19-23.
87. Specchia, G., et al., *Adenosine deaminase activity in peripheral lymphocytes of patients with gynaecologic malignancies*. *Boll Ist Sieroter Milan*, 1985. **64**(5): p. 404-7.
88. Gaspar, H.B., K.C. Gilmour, and A.M. Jones, *Severe combined immunodeficiency--molecular pathogenesis and diagnosis*. *Arch Dis Child*, 2001. **84**(2): p. 169-73.
89. Fischer, A., *Severe combined immunodeficiencies (SCID)*. *Clin Exp Immunol*, 2000. **122**(2): p. 143-9.
90. Hashemi, M., et al., *Adenosine and deoxyadenosine induces apoptosis in oestrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cells via the intrinsic pathway*. *Cell Prolif*, 2005. **38**(5): p. 269-85.
91. Rickles, R.J., et al., *Adenosine A2A and Beta-2 Adrenergic Receptor Agonists: Novel Selective and Synergistic Multiple Myeloma Targets Discovered through Systematic Combination Screening*. *Mol Cancer Ther*, 2012. **11**(7): p. 1432-42.
92. Emanuelov, A.K., et al., *Adenosine A3 receptor-mediated cardioprotection against doxorubicin-induced mitochondrial damage*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **79**(2): p. 180-7.
93. Katzur, A.C., et al., *Expression and responsiveness of P2Y2 receptors in human endometrial cancer cell lines*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(11): p. 4085-91.
94. Wang, Q., et al., *P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **287**(5): p. C1349-58.
95. Kunzli, B.M., et al., *Impact of CD39 and purinergic signalling on the growth and metastasis of colorectal cancer*. *Purinergic Signal*, 2011. **7**(2): p. 231-41.
96. Bastid, J., et al., *ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology*. *Oncogene*, 2012.

97. Jin, D., et al., *CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression*. *Cancer Res*, 2010. **70**(6): p. 2245-55.
98. Stagg, J., et al., *Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(4): p. 1547-52.
99. Supernat, A., et al., *CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2012. **20**(2): p. 103-7.

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Einteilung der Purinrezeptoren.....	8
Abbildung 2: Kristallstruktur des an einen Antagonisten gebundenen A <sub>2A</sub> -Rezeptors..	10
Abbildung 3: Strukturformel von Adenosin.....	11
Abbildung 4: Mikroskopische Darstellung von Ishikawa-Zellen.....	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer .....	34
Abbildung 6: Exemplarische Darstellung eines Streudiagramms und eines Overlays der durchflusszytometrisch untersuchten Ishikawa-Zellpopulation. ....	41
Abbildung 7: Adenosinrezeptor-Radioligandenbindung in Tumorzellmembranen .....	43
Abbildung 8: A <sub>2B</sub> -Rezeptor vermittelte Stimulation der Adenylatcyclase in HEC-1-A-Zellen. ....	45
Abbildung 9: A <sub>2B</sub> -Rezeptor vermittelte Stimulation der Adenylatcyclase in CHO(A <sub>2B</sub> )-Zellen. ....	47
Abbildung 10: Zelldichte der HEC-1-A-Zellen nach Inkubation mit Adenosin.....	48
Abbildung 11: Zelldichte der Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit Adenosin .....	49
Abbildung 12: Zelldichte der HEC-1-A-Zellen nach Inkubation mit NECA .....	51
Abbildung 13: Zelldichte der Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit NECA.....	51
Abbildung 14: Apoptoseverhalten von Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Adenosin- und Doxorubicin-Konzentrationen .....	54
Abbildung 15: Apoptoseverhalten von Ishikawa-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen NECA- und Doxorubicin-Konzentrationen.....	54
Abbildung 16: Untersuchung der Zellproliferationsrate nach Stimulation der Adenosinrezeptoren mit Adenosin.....	56
Abbildung 17: Untersuchung der Zellproliferationsrate nach Stimulation der Adenosinrezeptoren mit NECA .....	56

Abbildung 18: Fluoreszenzspektrum der CD73-Antikörperfärbung und des zugehörigen Isotypen der durchflusszytometrisch untersuchten HEC-1-A-Zellen nach Vorbehandlung mit ADA .....	58
Abbildung 19: Fluoreszenzspektrum der CD73-Antikörperfärbung und des zugehörigen Isotypen der durchflusszytometrisch untersuchten HEC-1-A-Zellen nach Vorbehandlung mit ADA und einer Konzentration von 25 $\mu$ M NECA.....	58
Abbildung 20: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD73-Expression auf HEC-1-A-Zellen mittels SFI nach Vorbehandlung mit NECA .....	58
Abbildung 21: Fluoreszenzspektrum der CD39-Antikörperfärbung und des zugehörigen Isotypen der durchflusszytometrisch untersuchten Ishikawa-Zellen nach Vorbehandlung mit ADA .....	59
Abbildung 22: Fluoreszenzspektrum der CD39-Antikörperfärbung und des zugehörigen Isotypen der durchflusszytometrisch untersuchten Ishikawa-Zellen nach Vorbehandlung mit ADA und einer Konzentration von 25 $\mu$ M NECA.....	59
Abbildung 23: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD39-Expression auf HEC-1-A Zellen mittels SFI nach Vorbehandlung mit NECA.....	59

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Bindungsaffinität diverser Antagonisten und Agonisten an den Adenosinrezeptor-Subtypen ( $K_i$ -Werte in nM) .....	13
Tabelle 2: Pipettierschema für totale und unspezifische Bindung an $A_{1-}$ , $A_{2A-}$ und $A_{3-}$ Rezeptoren .....	29
Tabelle 3: Zusammensetzung des 5x REA-Mix für 50 ml .....	31
Tabelle 4: Endkonzentrationen der Agonisten und Antagonisten im Assay .....	32
Tabelle 5: Reagenzien des BrdU-Assays .....	37
Tabelle 6: Endkonzentrationen der Liganden im FACS-Versuch .....	39

## 10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μCi	Mikrocurie
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AC	Adenylatcyclase
ADA	Adenosindesaminase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AR	Adenosinrezeptoren
ATP	Adosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
BRCA	BReast CAncer
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCPA	2-Chloro- <i>N</i> <sup>6</sup> -cyclopentyladenosin
cDNA	Complementary DNA
CGS 15943	9-Chloro-2-(2-furanyl)-[1,2,4]triazolo[1,5- <i>c</i> ]quinazolin-5-amin
CGS 21680	(2-[p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino]adenosin-5'- <i>N</i> -ethyluronamid
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
Cpm	Counts per minute
DCIS	Duktales Carcinoma <i>in situ</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	European Medicines Agency
ENT	Equilibrative nucleoside transporter
ER	Östrogenrezeptor
FACS	Fluorescence assisted cell sorting
FasL	Fas Ligand
FCS	Fötales Kälberserum

FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward scatter channel
GDP	Guanosindiphosphat
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GPCR	G-protein-coupled receptors
GTP	Guanosintriphosphat
HEMADO	2-Hexyn-1-yl- $N^6$ -methyladenosin
HPV	Papillomavirus
LCIS	Lobuläres Carcinoma <i>in situ</i>
mAb	Monoklonale Antikörper
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Mittelwert
N	Normalität
NECA	Adenosin-5'- <i>N</i> -ethyluronamid
NH	Nullhypothese
nM	Nanomolar
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCO	Polycystic ovary
PENECA	2-(2-Phenyl)ethynyladenosine-5'- <i>N</i> -ethyluronamid
PgR	Progesteronrezeptoren
pH	Potentia Hydrogenii
POD	Peroxidase
rlu/s	Relative light units/second
RPIA	Ribose-5-phosphat-Isomerase
Rpm	Rotations per minute
SCID	severe combined immunodeficiency
SEM	Standard error of the mean
sFasL	Soluble Fas Ligand
SFI	Spezifischer Fluoreszenz Index
SSC	Side scatter channel
STIKO	Ständige Impfkommission
TNM	Tumor-Nodes-Metastases
TRAIL	Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand

UDP	Uridindiphosphat
UICC	Union internationale contre le cancer
UTP	Uridintriphosphat
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem



## **DANKSAGUNG**

Ich möchte meinen Doktorvätern Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz und Prof. Dr. Jörg Wischhusen von Herzen danken für ihre Unterstützung, die diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Stets hatten sie ein offenes Ohr für fachliche Fragen, denen sie nicht nur mit ihrem großartigen Wissen, sondern auch stets mit viel Menschlichkeit begegnet sind. Lieber Charly und lieber Jörg, Danke für Eure Zeit, Geduld und nicht zuletzt die vielen humorvollen Momente!

Ich danke Sonja Kachler und Monika Ossadnik, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, für die kompetente Hilfe im Labor, sowie Anoop Chandran, Markus Junker und Ahmed Adel Seida, die den Laboralltag leichter, bunter und fröhlicher machten.

Liebe Uu-Ju, ob ich ohne Dich den langen Atem gehabt hätte? Danke dass Du mich als Kommilitonin, Kollegin und vor allem Freundin nun schon so lange begleitest!

Danke Momo und meiner Familie für die liebevolle Unterstützung.

**PERSON**

---

Name: Anna Magdalena Šumski  
Geburtsdatum und -ort: 04.05.1985, Filderstadt

**BERUFSERFAHRUNG**

---

Seit März 2013 Angestellte Zahnärztin  
März 2013 Eintragung ins Zahnarztregister der KZV Hessen  
Mai 2010- Februar 2013 Assistenz Zahnärztin in Düsseldorf und Büttelborn

**AUSBILDUNG**

---

Seit September 2008 Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie in  
Zusammenarbeit mit der Universitäts-Frauenklinik Würzburg  
November 2009 Approbation als Zahnärztin  
Oktober 2004 - November 2009 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians Univer-  
sität Würzburg  
September 1995 - Juni 2004 Uhland-Gymnasium Tübingen  
September 1991 - Juni 1995 Köstlinschule Tübingen

Anna M. Šumski

Frankfurt, 10. März 2014