

Aus dem Institut für Anatomie
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. Jobst Sievers)
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**INTERAKTION DER CHEMOKINREZEPTOREN CXCR4 UND CXCR7 AM MO-
DELL DER MAMMAKARZINOMZELLINIE MCF-7**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
HOLZENBURG, ERIC
aus **Schwedt/Oder**
Kiel **2013**

1.Berichterstatter: Prof. Dr. R. Mentlein
2.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. A. Trauzold
Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2014
Zum Druck genehmigt, Kiel, den 13.05.2014

gez.: Prof. Dr. E. Maser
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1. CHEMOKINE.....	1
1.2. CHEMOKINREZEPTOREN.....	2
1.3. CHEMOKINBIOLOGIE.....	4
1.4. CHEMOKINE IN TUMOREN.....	5
1.5. DAS CHEMOKIN CXCL12 UND SEIN REZEPTOR CXCR4.....	6
1.6. DER 2006 ENTDECKTE CHEMOKINREZEPTOR CXCR7 MIT SEINEN LIGANDEN CXCL11 UND CXCL12.....	7
2. FRAGESTELLUNG	9
3. MATERIALIEN UND METHODEN	10
3.1. MATERIALIEN.....	10
3.1.1. <i>Geräte</i>	10
3.1.2. <i>Chemikalien</i>	10
3.1.3. <i>Puffer</i>	11
3.1.4. <i>Verbrauchsmaterialien</i>	11
3.1.5. <i>Stimulantien und Inhibitoren</i>	11
3.1.6. <i>Antikörper</i>	12
3.1.7. <i>Kits/Assays</i>	12
3.1.8. <i>Enzyme</i>	12
3.1.9. <i>TaqMan® Primer Probes</i>	12
3.1.10. <i>Zellkulturmedien</i>	13
3.1.11. <i>Zelllinie</i>	13
3.2. METHODEN.....	14
3.2.1. <i>Zellbiologische Methoden</i>	14
3.2.1.1. <i>Zellkultur, Subkultivierung</i>	14
3.2.1.2. <i>Zellzahlbestimmung</i>	14
3.2.1.3. <i>Einfrieren und Lagerung der Zellen</i>	15
3.2.1.4. <i>Auftauen der Zellen</i>	15
3.2.2. <i>Proteinbiochemische Methoden</i>	15
3.2.2.1. <i>Zelllysatherstellung für Western-Blot</i>	15
3.2.2.2. <i>Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford</i>	16
3.2.2.3. <i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	16
3.2.2.4. <i>Proteintransfer auf PVDF-Membran</i>	17
3.2.2.5. <i>Immunologische Detektion der Proteine</i>	18
3.2.2.6. <i>Reblotting</i>	18
3.2.2.7. <i>Caspase-3-Test zur Bestimmung der Apoptoserate</i>	19
3.2.3. <i>Migrationsversuche mittels Boydenkammer</i>	20
3.2.4. <i>Molekularbiologische Methoden</i>	21
3.2.4.1. <i>Isolierung von RNA</i>	21
3.2.4.2. <i>Bestimmung der RNA-Konzentration</i>	22
3.2.4.3. <i>Reinheitsbestimmung der RNA-Probe</i>	22
3.2.4.4. <i>Synthese der cDNA</i>	22

3.2.4.5. Quantitative PCR.....	23
3.2.5. <i>Morphologisch-optische Methoden</i>	24
3.2.5.1. Native immunzytochemische Färbung.....	24
3.2.5.2. Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	25
3.2.5.3. Apoptoseversuche nach Nicoletti.....	27
3.2.5.4. Kernfärbung.....	27
3.3. STATISTIK.....	27
4. ERGEBNISSE	28
4.1. QUANTITATIVER NACHWEIS VON CXCR4 UND CXCR7 AUF MCF-7-ZELLEN.....	28
4.2. SIGNALTRANSDUKTION.....	29
4.3. INTERNALISIERUNGSVERSUCHE.....	31
4.3.1. <i>Native Immunzytochemie</i>	31
4.3.2. <i>Transmissions-Elektronenmikroskopie</i>	34
4.4. MIGRATION IN DER BOYDEN-KAMMER.....	37
4.5. EFFEKTE AUF DIE APOPTOSE.....	39
4.5.1. <i>Apoptoseversuch nach Nicoletti</i>	39
4.5.2. <i>Apoptosemessung mittels Caspase 3</i>	42
4.5.3. <i>Apoptosenachweis durch Cytochrom C-Freisetzung</i>	44
4.5.4. <i>Apoptosenachweis mittels P53, P21, BAX und BCL-2</i>	44
5. DISKUSSION	47
5.1. CXCR4 UND CXCR7 VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION UND DIE ROLLE VON B-ARRESTIN.....	48
5.2. EINFLUSS VON CXCL11 UND CXCL12 AUF DIE INTERNALISIERUNG.....	50
5.3. STEUERUNG DER MIGRATION MITTELS CXCL11 UND CXCL12.....	51
5.4. ANTIAPOPTOTISCHE EFFEKTE DURCH CXCR4 UND CXCR7?.....	52
5.5. AUSBLICK.....	55
6. ZUSAMMENFASSUNG	56
7. LITERATURVERZEICHNIS:	57
DANKSAGUNG	65
LEBENS LAUF:	66

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sekundärstruktur der Chemokinklassen.....	1
Abbildung 2: Grundaufbau Chemokinrezeptor.....	3
Abbildung 3: Arrestin-abhängiger Signalweg.....	4
Abbildung 4: Einfluss von Chemokinen in der Tumorphathologie.....	6
Abbildung 5: Prinzip des Migrationsversuchs mit der Boydenkammer.....	20
Abbildung 6: Prinzip der immunzytochemischen Färbung.....	24
Abbildung 7: Nachweis der Liganden und Rezeptoren.....	28
Abbildung 8: Nachweis der Rezeptoren mittels Western Blot.....	29
Abbildung 9: Phosphorylierung von ERK durch CXCL12 und CXCL11.....	29
Abbildung 10: Phosphorylierung von ERK durch CXCL12 und CXCL11.....	30
Abbildung 11: Native immunzytochemische Färbung der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 an MCF-7-Zellen.....	33
Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Darstellung der mit Goldantikörpern markierten Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7.....	34
Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Darstellung der Chemokinrezeptoren CXCR4 (15 nm) und CXCR7 (5 nm) nach der Internalisierung mit CXCL11 für zehn Minuten.....	35
Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Darstellung der Chemokinrezeptoren CXCR4 (15 nm) und CXCR7 (5 nm) nach der Internalisierung mit CXCL12 für fünf und zehn Minuten.....	36
Abbildung 15: Migration von MCF-7-Zellen.....	38
Abbildung 16: Kontrolle und Staurosporin-stimulierte Zellkerne.....	40
Abbildung 17: Vorversuch zur Induktion der Apoptose in MCF-7-Zellen mittels Staurosporin.....	40
Abbildung 18: Stimulation von MCF-7-Zellen für 24h mit Staurosporin und Inhibitoren.....	41
Abbildung 19: Apoptosebeeinflussung durch AMD3100 und CCX733 unter 5 nM CXCL12 und 100 nM Staurosporin.....	41
Abbildung 20: Inhibition der STS-induzierten Apoptose durch CXCL11 und CXCL12.....	43
Abbildung 21: Western Blot auf Cytochrom C in Zytosol und Mitochondrien nach Stimulation mit 100 nM STS für 4 und 24 Stunden.....	44

Abbildung 22: Nachweis von P21, P53, BAX und BCL-2 nach Staurosporinstimulation und 5 nM CXCL12.....	45
Abbildung 23: Chemische Struktur von AMD3100 [Wong et al., 2008].....	48
Abbildung 24: Beeinflussung der Apoptose durch Caspasen und Cytochrom C..	53
Abbildung 25: Zusammenfassung der Interaktion von Rezeptoren, Liganden und Antagonisten. (Grafik: Kirsten Hattermann).....	54

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen, Einheiten sowie Zeit- und Maßangaben sind nicht aufgeführt:

α	gr. Buchstabe Alpha, hier teilweise <i>anti</i>
BAX	<i>BCL-2 associated X protein</i> , Apoptoseregulatorprotein
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , Apoptoseregulatorprotein
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	<i>copy DNA</i>
C-Terminus	Carboxyterminus
CXCR4/7	CXC-Chemokinrezeptor 4/7
C_t	Schwellenwertzyklus: <i>threshold cycle</i>
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor: <i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZR	Extrazellulärraum
FKS	fötale Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GTA	Glutaraldehyd
GRK	G-Protein-gekoppelte rezeptor-spezifische Kinase
GTP/GDP	Guanosintri-/diphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase: <i>horse radish peroxidase</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IP_3	Phosphatidylinositol-1,4,5-Trisphosphat
I-TAC	=CXCL11: <i>interferon-inducible T-cell α chemoattractant</i>
IZR	Intrazellulärraum
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N-Terminus	Aminoternus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung: <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion: <i>polymerase chain reaction</i>
PDL	Poly-D-Lysin
PFA	Paraformaldehyd
PTX	Toxin aus <i>Bordatella pertussis</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDF-1	=CXCL12: <i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Einbuchstabencodes für Aminosäuren:

A Alanin

C Cystein

D Asparaginsäure

E Glutaminsäure

F Phenylalanin

G Glycin

H Histidin

I Isoleucin

K Lysin

L Leucin

M Methionin

N Asparagin

P Prolin

Q Glutamin

R Arginin

S Serin

T Threonin

V Valin

W Tryptophan

Y Tyrosin

1. Einleitung

1.1. Chemokine

Chemokine gehören zur Gruppe der Zytokine und sind kleine, von der Zelle sezernierte Peptide mit einer Größe von 8 bis 10 kDa. Sie sind befähigt, Chemotaxis an Zellen zu induzieren und wurden zuerst als Zytokine mit chemotaktischen Eigenschaften beschrieben [Yoshimura et al., 1987]. Daher stammt auch ihr Name: Chemokin = chemotactic cytokine.

Aufgrund der unterschiedlichen dreidimensionalen Anordnung ihrer vier N-terminal gelegenen Cystein-Reste unterteilt man die Chemokine in vier Untergruppen. Die Cystein-Reste sind durch Disulfidbrücken verbunden. Die Lokalisation der Cystein-Reste ist hierbei in Abbildung 1 zu erkennen. Sind die Chemokine direkt benachbart, spricht man von CC-/ β -Chemokinen. Trennt sie hingegen eine Aminosäure sind es CXC/ α -Chemokine. Die zwei besonderen Gruppen sind zum einen die C-/ γ -Chemokine, welche nur zwei Cysteinreste besitzen und an diesen verbunden sind, zum anderen ist das einzige bekannte Chemokin mit drei Aminosäuren zwischen den Cysteinresten, das Fraktalkin/CX3CL-1, welches eine eigenständige Gruppe, nämlich die CX3C-/ δ -Chemokine, darstellt.

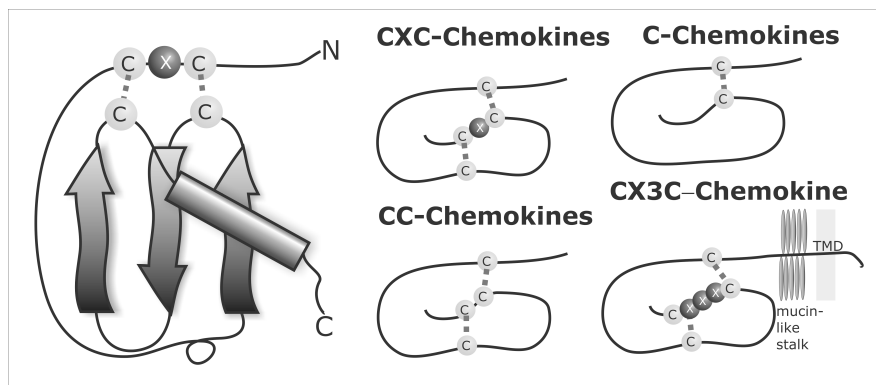


Abbildung 1: Sekundärstruktur der Chemokinklassen

C steht für die Cysteinreste und X für eine beliebige Aminosäure. Die Disulfidbrücken sind gestrichelt dargestellt. TMD kennzeichnet die hydrophobe Transmembranregion des CX3C-Chemokins. [Mentlein et al., 2013]

Chemokine kommen in allen Wirbeltieren, einigen Viren und Bakterien, jedoch nicht in Wirbellosen vor. Im menschlichen Körper gibt es über 50 bekannte Chemokine und 23 Chemokinrezeptoren. Allein zahlenmäßig bedingt dies schon die Bindungsfähigkeit eines Rezeptors für mehrere Chemokine (siehe Tabelle 1).

Ein Teil der Chemokine wird stark durch Wachstumsfaktoren und andere Zytokine induziert, ein anderer Teil permanent sezerniert.

Die Chemokine werden als Pre-/Pro-Peptide synthetisiert, dabei wird die Pre-/Pro-Sequenz, bestehend aus ca. 20 Aminosäuren durch eine Signal-Peptidase abgespalten, das aktive Chemokin gebildet und dann sezerniert.

Tabelle 1: Übersicht der Chemokine und ihrer Rezeptoren [Zlotnik et al., 2006]

Chemokin	Synonym	Rezeptor	Chemokin	Synonym	Rezeptor
<i>C-Chemokine</i>			CCL22	MDC	CCR4
	Lymphotacin,				
XCL1	SCM-1 α	XCR1	CCL23	MPIF-1	CCR1
XCL2	SCM-1 β	XCR1	CCL24	Eotaxin2	CCR3
<i>CC-Chemokine</i>			CCL25	TECK	CCR9
CCL1	I-309	CCR8	CCL26	Eotaxin3	CCR3
CCL2	MCP-1	CCR2	CCL27	CTACK, ILC	CCR10
CCL3	MIP-1 α , LD78 α	CCR1/5	CCL28	MEC	CCR10
CCL3L1	LD78 β	CCR1/5	<i>CXC-Chemokine</i>		
CCL4	MIP-1 β	CCR5	CXCL1	Gro α , MIP-2	CXCR2
CCL4L1	AT744.2	CCR1/5	CXCL2	Gro β	CXCR2
CCL5	RANTES	CCR1/3/5	CXCL3	Groy	CXCR2
CCL6	C10	CCR1/2/3	CXCL4	PF4	Unbekannt
CCL7	MCP-3	CCR1/2/3	CXCL5	ENA-78	CXCR2
CCL8	MCP-2	CCR1/2/3/5	CXCL6	GCP-2	CXCR1/2
CCL9/10	MRP-2	CCR1	CXCL7	NAP-2	CXCR1/2
CCL11	Eotaxin	CCR3	CXCL8	IL-8	CXCR1/2
CCL12	MCP-5	CCR2	CXCL9	MIG	CXCR3
CCL13	MCP-4	CCR1/2/3	CXCL10	IP-10	CXCR3
CCL14	HCC-1	CCR1	CXCL11	I-TAC	CXCR3/7
CCL15	HCC-2	CCR1/2/3	CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4/7
CCL16	HCC-4LEC	CCR1	CXCL13	BLC,BCA-1	CXCR5
CCL17	TARC	CCR4	CXCL14	BRAK, Bolekine	Unbekannt
CCL18	PARC	unbekannt	CXCL16	SCYB16	CXCR6
CCL19	MIP3 β , ELC	CCR7	CXCL17	DMC	Unbekannt
CCL20	MIP3 α , LARC	CCR6	<i>CX3C-Chemokin</i>		
CCL21	SLC	CCR7	CX3CL1	Fraktalkin	CX3CR1

1.2. Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind fast immer G-Protein-gekoppelte-7-Transmembran-Domänen-Rezeptoren.

Ein Rezeptor besteht aus 340-370 Aminosäuren und hat einen in den Extrazellulärraum gerichteten N-Terminus. Die sieben Helix-Transmembrandomänen weisen je drei hydrophile intra- und extrazelluläre Schleifen auf. Der C-Terminus befindet sich intrazellulär und bindet β -Arrestin durch phosphorylierte Serin- und Threonin-Reste [Allen et al., 2007].

An der zweiten intrazellulären Schleife befindet sich fast immer ein DRY-Motiv

(DRYLAIV oder ähnliche Sequenz). Dies ist für die G-Protein-gekoppelte Signalübertragung notwendig. An Chemokinrezeptoren ohne DRY-Motiv binden die Chemokine zwar, lösen aber keinen Signalweg aus. Diese Rezeptoren bezeichnet man als *decoy*-Rezeptoren (dt.: Fangstellen-Rezeptor). Das bedeutet sie regulieren die Chemokinkonzentration der Umgebung durch Bindung und Internalisierung.

Der normale Weg der Rezeptoraktivierung führt, nach der Bindung des Chemokins an den Rezeptor, über das G-Protein. Dieses aktiviert durch die Dissoziation der $G_{i\alpha}$ -Untereinheit von der $G_{\beta/\gamma}$ die Effektoren (siehe Abbildung 2).

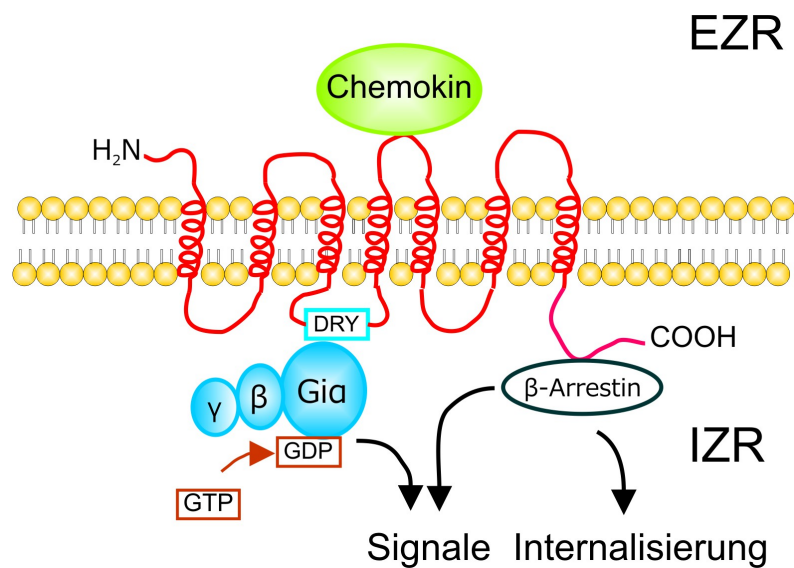


Abbildung 2: Grundaufbau Chemokinrezeptor

Chemokinrezeptoren sind sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren, die meist G-Protein-gekoppelt arbeiten. Das DRY-Motiv ist für diesen Signalweg von Bedeutung. Am C-Terminus kann sich β -Arrestin befinden und für die Rezeptorinternalisierung sorgen. Es besteht auch die Möglichkeit eines Signalweges über β -Arrestin.

Wie bei den meisten G_i -Proteinen beinhaltet die Signaltransduktion die Inhibition von Adenylatcyclasen (AC), die Aktivierung von Phospholipase C mit der Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP₃), Ca²⁺ oder Diacylglycerin (DAG) als „Second Messenger“; während die Arrestin-abhängige Signaltransduktion zur Aktivierung verschiedener Kinasen führt (siehe Abbildung 3). Die Signaltransduktion läuft über einen Zeitraum von Minuten bis Stunden und damit langsamer, als der G-Protein-gekoppelte Weg, welcher in Sekunden weiterleitet. Der G-Protein-abhängige Signalweg kann durch Pertussistoxin (PTX) von *Bordatella pertussis* inhibiert werden [Locht et al., 2011].

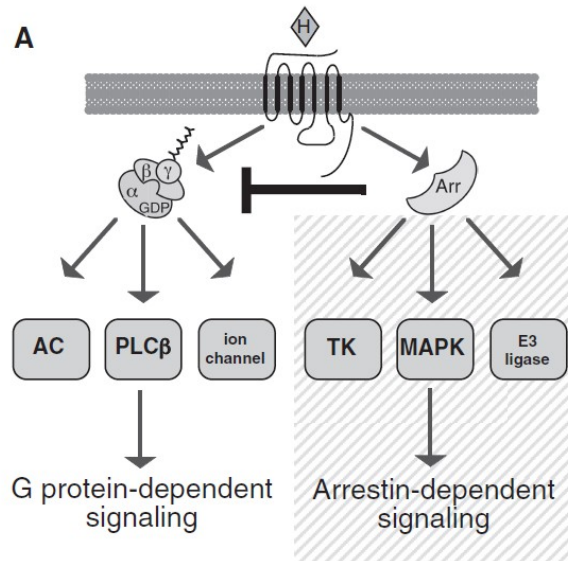


Abbildung 3: Arrestin-abhängiger Signalweg

Arrestin wirkt als liganden-regulierendes Gerüst, welches G-Protein-gekoppelte-7-Transmembranrezeptoren mit nicht-klassischen Signalwegen wie Tyrosin-Kinase (TK), MAP-Kinasen (MAPK) und E3-Ligasen verbindet [Luttrell, 2010].

Eine Internalisierung der Liganden wird durch eine Agonisten-abhängige-Phosphorylierung des C-Terminus erreicht. Dort ist die Bindung von β -Arrestin ermöglicht. Die Internalisierung erfolgt entweder Clathrin-abhängig oder Clathrin-unabhängig mit Caveolin, welches die Cytosolseite der Caveolae bedeckt.

1.3. Chemokinbiologie

Chemokine wurden zuerst als Voraussetzung der Leukozytenmigration beschrieben. Für Leukozyten stellt die Chemotaxis eine sehr wichtige Grundlage ihrer Funktion dar. Die Chemokine steuern direkt Beweglichkeits- und Entzündungsbedingungen, sie beeinflussen die Leukozyten auch in Adhäsion, Proliferation, Apoptose/Anti-Apoptose und Genexpression .

Da die Chemokinrezeptoren ebenfalls auf fast allen anderen Körperzellen, wie zum Beispiel Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Stromazellen und Epithelzellen zu finden sind, haben sie auch dort eine enorme Bedeutung für die Gewebeerwicklung, die Homöostase und die Pathogenese [Raman et al., 2011]. Insbesondere bei Tumoren wirken sie auf die Bildung, Entwicklung und Metastasierung.

Ein Beispiel für die Funktionen von Chemokinen ist die Gewebeerwicklung im

Gehirn. Chemokine steuern die Neuro- und Gliagenese und die Umscheidung von Neuronen [Ransohoff, 2009]. CXCL12/(SDF-1) – CXCR4/7 Interaktion reguliert die Bewegung und Positionierung von Neuronen und neuralen Vorläufern im Groß- und Kleinhirn [Borrell and Marin, 2006; Reiss et al., 2002]. CXCL12 wird von Meningealzellen sezerniert und die Rezeptorexpression an neuralen Vorläuferzellen reguliert.

CXCL12 wird als konstitutives Chemokin gesehen und sein Einfluss auf Migration und Stammzellentwicklung führt dazu, dass die Ursprungsfunktion der Chemokine nicht unbedingt im Immunsystem gesehen wird [Huising et al., 2003].

1.4. Chemokine in Tumoren

Chemokine und ihre Rezeptoren sind in vielen Tumoren nachweisbar. Sie werden differenziert reguliert und die Rezeptoren unterschiedlich exprimiert. (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Vorkommen von Chemokinrezeptoren auf verschiedenen Krebsarten

Krebsart	CXCR						CX3CR	CCR				Quellen
	1	2	3	4	5	7		5	7	9	10	
Ovarialkarzinom				x								[Scotton et al., 2001]
Ösophaguskarzinom				x								[Kaifi et al., 2005]
Prostatakarzinom				x			x					[Darash-Yahana et al., 2009]
Mammakarzinom				x		x		x	x			[Burns et al., 2006; Li et al., 2004; Müller et al., 2001]
Pankreaskarzinom				x								[Marchesi et al., 2008]
Colorektalkarzinom			x	x					x			[Kawada et al., 2007; Kim et al., 2005; Li et al., 2011]
Lungenkarzinom			x	x					x			[Miao et al., 2007; Phillips et al., 2003]
Melanom	x	x	x	x					x	x	x	[Letsch et al., 2004; Müller et al., 2001]
Neuroblastom				x								[Russell et al., 2004]
Glioblastom				x		x	x					[Hattermann et al., 2010; Held-Feindt et al., 2010]
Magenkarzinom									x			[Mashino et al., 2002]

Während der Karzinogenese bzw. Tumorigenese sind Chemokine in der Proliferation aktiv. Sie fördern sowohl auto-, als auch parakrin die Proliferation und Migration von Tumorzellen und steuern Angiogenese und Neovaskularisation [Keeley et al., 2010]. Daneben sind sie auch noch in Transmigration, Invasion und Metastasierung eingebunden (siehe Abbildung 4).

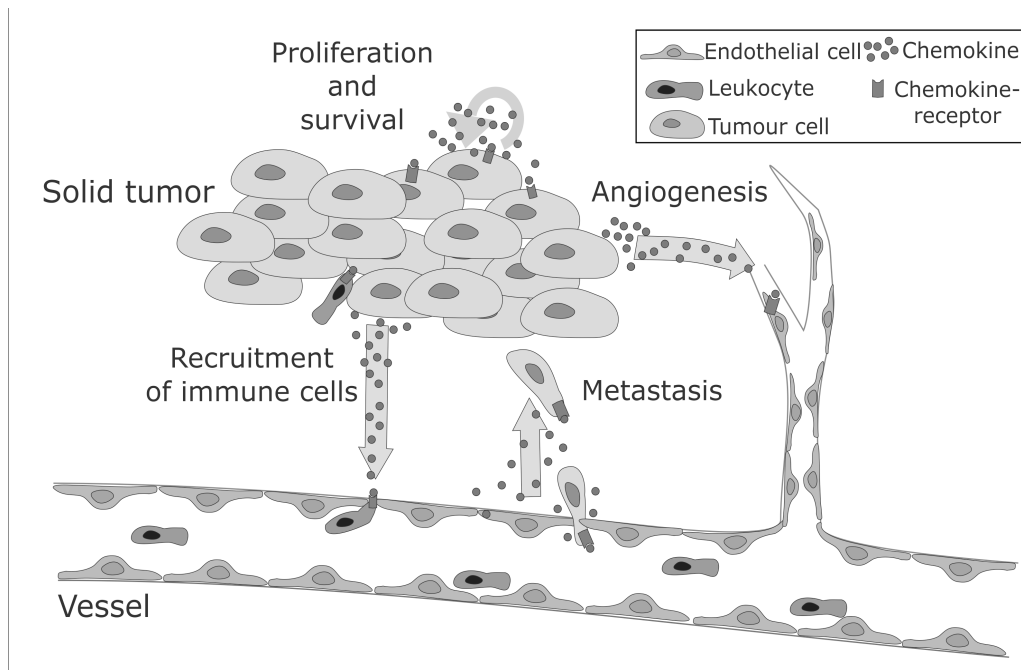


Abbildung 4: Einfluss von Chemokinen in der Tumorphathologie

Chemokinrezeptoren sind auf vielen Tumorzellen exprimiert, wobei die Liganden (Chemokin) von den malignen Zellen, von Stroma-Zellen und weit entfernten Zellen produziert werden und somit zur Metastasierung beitragen [Mentlein et al., 2013].

1.5. Das Chemokin CXCL12 und sein Rezeptor CXCR4

Der einzige Ligand für CXCR4 ist CXCL12. CXCL12/Stromal-cell-derived-factor-1 (SDF-1) ist ein sehr gutes Beispiel für ein Chemokin mit Tumor-steuernden Eigenschaften. Unter anderem bindet es an CXCR4 und CXCR7 [Duda et al., 2011].

Die Produktion von SDF-1 erfolgt durch eine große Vielfalt von Zellen, wobei hier nur einige genannt werden: Knochenmarkszellen, Fibroblasten, Hepatozyten, Gliazellen und Meningealzellen.

Von CXCL12 gibt es zwei Isoformen, die durch alternatives „Splicen“ des SDF-1-Gens entstehen. Die 1-alpha und 1-beta Formen bestehen aus 68 Aminosäuren, unterscheiden sich in vier Aminosäuren am C-Terminus, jedoch kaum in ihrer biologischen Aktivität.

Das Gen für CXCL12 ist auf dem humanen Chromosom 10 lokalisiert [Shirozu et al., 1995].

Unterschiedliche Umgebungskonditionen haben oft verschiedene Effekte, so zum Beispiel CXCL12 an humanen Glioblastomzellen. Glioblastome weisen eine sehr hohe Malignität auf und sind eine der häufigsten Formen von primären Hirntumoren. Alle Zellen im umgebenden Gewebe, zum Beispiel maligne Gliazellen, Astroglia, Mikroglia und Endothelzellen, produzieren CXCL12. Die

Tumor-Stammzellen bilden daher bevorzugt den Rezeptor CXCR4 an ihrer Oberfläche. *In-situ* exprimieren die stärker differenzierten Zellen in Kultur mit fötalem Kälberserum (FKS) hauptsächlich CXCR7 [Hattermann et al., 2010]. Diese Effekte konnten *in-vitro* durch unterschiedliche Faktoren und FKS imitiert werden. An den Glioblastomzellen bedingen unterschiedliche Rezeptoren unterschiedliche Eigenschaften. Die Zellen mit einer höheren Expression von CXCR4 proliferierten und migrierten besser und zeigten so eine höhere Präsenz. Die Zellen mit CXCR7 wiesen einen besseren Apoptoseschutz vor Chemotherapeutika auf und beschränkten einen veränderten Signalweg.

Das bedeutet, CXCL12 ist bei Glioblastomen auf zwei Wegen beeinflussend: Tumorexpansion und Invasion werden über den Rezeptor CXCR4 gesteuert und das Überleben des Tumors über CXCR7. Dies zeigt, dass Chemokine die Tumorprogression in unterschiedlichen Stadien beeinflussen können.

Die Expression des CXCR-Rezeptors 4 erfolgt auf Stammzellen, haematopoetischen Zellen, Leukozyten, Endothelzellen, jedoch nicht in gesunden Brustzellen [Müller et al., 2001], aber auf vielen Tumorzellen (siehe Tabelle 2).

Einen Einfluss darauf haben diverse Wachstumsfaktoren wie Interleukine, EGF und VEGF, inflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IFN- γ und Hypoxie. Letztere Bedingungen sind in Tumoren besonders häufig anzutreffen. Bei einer geringen lokalen Sauerstoffsättigung wird die Transkription und Translation des hypoxia inducible factor-1 (HIF-1 α) hochreguliert und dadurch die Expression von CXCR4 gefördert. Deshalb ist bei Hypoxie die mRNA von CXCR4 viermal stabiler als normal [Schioppa et al., 2003].

1.6. Der 2006 entdeckte Chemokinrezeptor CXCR7 mit seinen Liganden CXCL11 und CXCL12

Vor ein paar Jahren wurde neben CXCR4 ein neuer Rezeptor für CXCL12 entdeckt. Dieser ist CXCR7. Er ist ebenso Bindungsstelle für CXCL11/interferon-inducible T-cell-chemoattractant (I-TAC) [Burns et al., 2006], wenn auch mit einer deutlich geringeren Affinität. CXCL11 besteht aus 73 Aminosäuren. Es bindet außer an CXCR7 auch an CXCR3. CXCL12 bindet mit einer zehnfach höheren Affinität an CXCR7 als an CXCR4. Ebenso ist die Affinität von CXCL12 auf CXCR7 zehnfach höher als von CXCL11 [Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006].

Balabanian et al. beschrieben diesen Rezeptor 2005 zuerst. Der entdeckte Rezeptor RDC1 wies Ähnlichkeiten zu konservierten Domänen von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren auf. Er wurde kloniert und näher untersucht. Die chromosomale Lage des Gens und phylogenetische Studien ließen vermuten, dass es sich bei RDC1 um einen CXC-Chemokinrezeptor handelt [Fredriksson et al., 2003; Heesen et al., 1998]. Erst Burns et al. konnten 2006 zeigen, dass RDC1 ein CXC-Motiv Chemokinrezeptor ist und nannten ihn CXCR7.

CXCR7 wurde anfangs nur als so genannter *decoy*-Rezeptor für CXCL12 betrachtet, da er ein modifiziertes DRY-Motiv besitzt, also nicht über das Pertussistoxin-sensitive G_i-Protein Signale leitet. Nach neueren Studien kann der Rezeptor CXCR-7 über β -Arrestin eine Signalkaskade auslösen [Ödemis et al., 2012; Rajagopal et al., 2010]. Dieser Signalweg ist durch die Neuformierung von Rezeptor-homo- und -hetero-Oligomeren ungewöhnlich [Allen et al., 2007].

β -Arrestin ist auch an der Internalisierung von G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren beteiligt [Rajagopal et al., 2010]. *In-vivo*- Versuche an Mäusen mit CXCR7-Antagonisten zeigten, dass kleinere und weniger organisierte Tumormassen ohne Vaskularisierung resultieren [Miao et al., 2007]. Dies bedeutet, dass CXCR7 einen direkten Einfluss auf die Vaskularisierung von Tumoren hat. Ein erhöhtes Auftreten von CXCR7 in Prostatakarzinomen korreliert direkt mit der Aggressivität des Tumors [Wang et al., 2008].

CXCR4 und CXCR7 werden an der Endotheloberfläche oder an einigen Arten von Tumor-Stroma-Zellen (Makrophagen, Monozyten) allein oder gemeinsam exprimiert [Miao et al., 2007], wobei noch nicht gänzlich abzusehen ist, wie viel vom CXCR4 zugeordneten Effekt eventuell auch auf CXCR7 zurückzuführen sind.

2. Fragestellung

Chemokine spielen eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumoren. Eine besondere Bedeutung hat hierbei CXCL12 mit seinem häufig vorkommenden Rezeptor CXCR4 und dem erst vor wenigen Jahren entdeckten Rezeptor CXCR7. Während die bedeutende Rolle von CXCR4 in Bereichen der Metastasierung und Invasion von CXCL12-produzierenden Tumorzellen schon seit längerem bekannt ist, ist der Einfluss von CXCR7 noch nicht ausreichend geklärt.

Ziel ist, dass im Rahmen dieser Arbeit Lokalisation und Interaktion von CXCR4 und CXCR7 an für beide Rezeptoren positiven Mammakarzinomzellen untersucht werden. Um eine Interaktion der Rezeptoren morphologisch nachzuweisen, sollten immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die extrazellulären Domänen der Rezeptoren durchgeführt werden. Anhand der Stimulation mit den Liganden und synthetischen Inhibitoren, sollten die Rezeptoren darauf hin untersucht werden, ob sie internalisiert werden. Zur ultrastrukturellen Klärung einer Interaktion beider Rezeptoren, sollte eine Markierung und Internalisierung mit Gold-Antikörpern erfolgen. Die Betrachtung und Klärung einer möglichen Verbindung fand unter dem Transmissions-Elektronenmikroskop statt.

Als Agonisten dienen das Chemokin CXCL12, das auf beide Rezeptoren wirkt und das Chemokin CXCL11, welches bei Abwesenheit von CXCR3 selektiv auf CXCR7 wirkt, sowie die beiden nicht-peptidergen Antagonisten AMD3100 (an CXCR4) und CCX733 (an CXCR7). Die biologischen Effekte beider Rezeptoren auf die Chemotaxis von MCF-7-Mammakarzinomzellen sowie anti-apoptotische Eigenschaften sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Ebenfalls wird durch Stimulationen die Signaltransduktion in Hinblick auf Zusammenhänge von CXCR4 und CXCR7 untersucht.

Insgesamt sollten die Versuche zeigen, ob und in welchem Ausmaß CXCR7 eine Rolle bei der Regulation von CXCR4 durch Internalisierung spielt, welchen Einfluss die Rezeptoren auf das Überleben von Tumorzellen haben und ob es eine funktionelle und/oder morphologische Interaktion (Heterodimerisierung) zwischen beiden Rezeptoren gibt.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Boydenkammer 48-Wells	Neuro Probe, Inc., NY, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 35M, Zeiss, Jena, D
Fluoreszenzspektrophotometer	F2000, Hitachi, Tokio, Japan
inverses Mikroskop	CK2, Olympus Optical Co., LTD, Japan
	Axiovert 35M, Zeiss, Jena, D
Photometer	Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences, UK
Real-Time PCR Gerät	ABI Prism-7700 SDS, Applied Biosystems, Foster City CA, USA
Scanner	Epson Perfection V750Pro Epson Deutschland, Meerbusch, D
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen, D
Trans Blot Turbo	BioRad Laboratories, München, D
Transmissionselektronenmikroskop	EM900, Zeiss, Jena, D
Zentrifuge	DigifugeGL, Heraeus, Hanau, D Cenrifuge 5417R, Eppendorf, HH, D

3.1.2. Chemikalien

Acrylamid-Bis-Lsg. 29:1, 30%	Serva, Heidelberg, D
Bradford Reagenz	BioRad Laboratories, München, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
BSA (Bovines Serumalbumin)	BIOMOL, Research Labs., Inc., USA
Camptothecin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
EDTA	Fermentas, St. Leon-Rot, D
FCS (Fötale Kälberserum),	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
FKS Gold	
Immu-Mount	Thermo Electron Corp., Pittsburgh, USA
Microscopy Aquatex	Merck, Darmstadt, D
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, D
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, dt. Niederlassung, Hilden, D
Saccharose	ROTH, Karlsruhe, D
Staurosporin	Calbiochem, Darmstadt, D
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin)	ROTH, Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Tween	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

3.1.3. Puffer

Elektrodenpuffer	15,2 g TRIS, 72 g Glycin, 5 g SDS, 5 l H ₂ O, pH 8,2-8,3 HEPES, 10 mM, 25 mM, pH 7,4
Lysispuffer	50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1:500/2 mM Vanadat, 1:100 Glycerophosphat, pH 7,4
PBS	8,0 g NaCl (136 mM), 0,2 g KCl (2,7 mM), 0,24 g KH ₂ PO ₄ (1,8 mM), 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (8 mM); auf 1 l H ₂ O dest., pH 7,2-7,4
SDS-Probenpuffer	0,23 g SDS in 7,25 ml H ₂ O; 1,25 ml Trenngelpuffer, 1ml Glycerin, 20 mM DTT
Sammelgelpuffer TBST	0,5 M TRIS/HCl, 0,4% SDS; pH 6,8 50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA; 0,1% Tween, pH 7,5
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS/HCl, 0,4% SDS, pH 8,8
Trypsin-Lsg.	24 ml PBS, 1 ml 2,5% Trypsin, 37 mg EDTA, steril filtriert

3.1.4. Verbrauchsmaterialien

6-Well-Kulturschalen	Greiner, Frickenhausen, D
96-Well-Platten für rtPCR	Sarstedt, Nürnberg, D
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Filme	GE Healthcare, dt. Niederlassung, München, D
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe, D
Polycarbonatmembran	Neuro Probe, Inc., USA
sterile Plastikröhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
Whatmann-Papier	BioRad Laboratories, München, D
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg, D
Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnberg, D
Zellschaber	Sarstedt, Nürnberg, D

3.1.5. Stimulantien und Inhibitoren

AMD3100; 5 µM	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
CCX733 (11G8); 100 nM	Chemocentryx, Mountain View, Calif., USA
PTX; 100 ng/ml	Calbiochem, Darmstadt, D
rH EGF; 20 ng/ml	Immuno Tools, Friesoythe, D
rH I-TAC; 1 nM, 5 nM, 10 nM	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
rH SDF-1α; 1 nM, 5 nM	Immuno Tools, Friesoythe, D

3.1.6. Antikörper

Primärantikörper:

goat- α -cxcr4; ab1671	Abcam, Cambridge, UK
mouse- α -cxcr7; 11G8	Chemocentryx, Mountain View, Calif., USA
mouse- α -cytochrome-C; 556433	BD Biosciences dtl, Heidelberg, D
mouse- α -ERK-2; sc-1647	Santa Cruz, dt. Niederlassung, Heidelberg, D
rabbit- α -pERK-1/2; 5594	Cell Signaling dtl, Frankfurt, D

Sekundärantikörper:

donkey- α -goat-555; A21432	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, D
donkey- α -goat (Gold 15 nm); 815.333	Aurion, Wageningen, NI
goat- α -mouse-488; A11001	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, D
goat- α -mouse (Gold 5 nm); LM.GAF5	British BioCell, Cardiff, UK
rabbit- α -mouse IgG-HRP; P0260	Dako, Glostrup, DK

3.1.7. Kits/Assays

Caspase 3-Assay Asp-Glu-Val-Asp-AMC	Bachem, Torrance, CA, USA
ECL Advance™ Western Blotting-Detection Kit	GE Healthcare, dt. Niederlassung, München, D
TaqMan® Universal Master Mix mit AmpErase® UNG, 4304437	Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA

3.1.8. Enzyme

DNase (RNase-frei)	Fermentas, St.Leon-Rot, D
ReverseAid™ TH Minus M-MuLV Reserse Transkriptase	Fermentas, St.Leon-Rot, D
RNase(DNase-frei)	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D

3.1.9. TaqMan® Primer Probes

alle von Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA

<u>Primer</u>	<u>ID-Nummer</u>	<u>Reportersequenz</u>
hGAPDH	Hs99999905_m1	ATTGGGCCTGGTCACCAGGGCTG
hCXCR4	Hs00607978_s1	TGTCCTGCTATTGCATTATCATCTC
hCXCR7	Hs00664172_-s1	AGCTCACGTGCAAAGTCACACACCT
hCXCL12	Hs00171022_m1	CCTTCAGATTGTAGCCCGGCTGAA
hCXCL11	Hs00171138_mi_M	CTACAGTTGTTCAAGGCTTCCCAT
hCXCR3	Hs00171041_m1	GCCATGGTCCTTGAGGTGAGTGACC
hBAX	Hs00751844_s1	GGGGGGGGAGGCACCCGAGCTGGCC
hBCL-2	Hs00153350_m1	CGGAGGCTGGGATGCCTTTGTGGAA
hP53	Hs00153340_m1	CTTCCCTGGATTGGCAGCCAGACTG

3.1.10. Zellkulturmedien

Dulbecco´s Modified Eagle Medium mit 4 mM Glucose (DMEM) Gibco, Life Technologies, Darmstadt, D / PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D (PAN Cat.No P04-05540)

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 mit 25 mM HEPES PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D

3.1.11. Zelllinie

MCF-7 Karzinomzelllinie, isoliert aus einer 69-jährigen kaukasischen Frau mit Mamma-Adenokarzinom nach Pleuraerguss. Die Zellen weisen einen epithelialen Charakter auf.

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

3.2.1.1. Zellkultur, Subkultivierung

Die Arbeit an den Zellen wurde unter einer sterilen Werkbank (Bench) durchgeführt. Die Bench wurde vor jeder Arbeit mit 70% Ethanol desinfiziert, ebenso wie die genutzten Latex- bzw. Nitril-Einmalhandschuhe. Nach der Arbeit erfolgte ebenfalls eine Reinigung mit 70% Ethanol und der zusätzliche Einsatz einer UV-Lampe. Die zu sterilisierenden Materialien wurden entweder autoklaviert, mit 70 % Ethanol desinfiziert oder durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm aufbereitet. Die verwendeten Medien, die Trypsin-EDTA-Lösung und PBS, wurden bei 4°C, FKS hingegen bei -20°C gelagert. Im Wasserbad erfolgte ihre Erwärmung auf 37°C.

Die Kultivierung der MCF-7-Zellen fand im Medium bei 37°C und 5% CO₂ unter einer gesättigten Wasserdampfatosphäre statt. Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) von Gibco bzw. Pan Biotech verwendet. DMEM enthielt zusätzlich 4,5 g/l Glucose, 25 mM HEPES, Natrium-Pyruvat und 3,7 g/l NaHCO₃, sowie 10% FKS und 4 µM L-Glutamin. Zur Verhinderung einer möglichen Bakterieninfektion erfolgte die Zugabe von 1% Penicillin-/Streptomycin-Lösung (Ausgangskonzentration 100 units).

Zur Subkultivierung wurde nach dem Entfernen des Mediums mit PBS gespült und ca. 1-2 ml Trypsin-EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben. Das Trypsin wurde nach 30 Sekunden abgesaugt und die Zellen für 3 bis 5 Minuten in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Nach dem Lösen der Zellen vom Flaschenboden stoppte die Reaktion durch die Zugabe von 3 ml Zellkulturmedium. Auf- und Abpipettieren sowie das Spülen des Flaschenbodens führten zu einer besseren Lösung aller Zellen. Nach der Zellzahlbestimmung wurde mit weiterem Medium die gewünschte Zellzahl eingestellt und in neue Zellkulturflaschen überfüllt.

3.2.1.2. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde, wie oben beschrieben, die Zellsuspension hergestellt und anschließend 30 µl der erhaltenen Zellsuspension mit 30 µl Trypanblau gemischt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der defekte Zellmembranen durchdringt und an die internen Proteine bindet. Es fand mit der Neubauer-Zählkammer fand die Auszählung der lebenden Zellen statt.

3.2.1.3. Einfrieren und Lagerung der Zellen

Zur längerfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen abgelöst und auf eine Zellzahl von 1,6 Millionen MCF-7-Zellen eingestellt. 900µl dieser Zellsuspension wurden mit 100 µl Zellkultur-reinem DMSO versetzt und in Kryoröhrchen überführt. Zum schonenderen Einfrieren umwickelte man die Kryoröhrchen mit Zellstoff und frohr sie anschließend für einen Tag bei -70°C ein. Die weitere Lagerung erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

3.2.1.4. Auftauen der Zellen

Im Wasserbad, bei 37°C, wurden die Kryoröhrchen aufgetaut und mit 5 ml Zellkulturmedium versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 600 rpm für fünf Minuten wurde das Medium abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml warmem Medium resuspendiert und in einer kleinen Zellkulturflasche ausgesät. Nach einem Tag fand ein weiterer Mediumwechsel statt, um vorhandene abgestorbene und nicht angewachsene Zellen zu entfernen. Zum besseren Anwachsen wäre eine Erhöhung des FKS-Anteils auf 20% möglich.

3.2.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1. Zelllysatherstellung für Western-Blot

Zur Ermittlung der Signaltransduktion an MCF-7-Zellen wurden 240000 Zellen pro kleiner Zellkulturflasche 2 Tage vor der Stimulation ausgesät. Am Abend davor erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM + 1% BSA, ebenso 1-2 Stunden vor der Stimulation. Dadurch sollte das von den Zellen selbst produzierte CXCL-12 entfernt werden. 30 Minuten später erfolgte die Stimulation bzw. vor der Stimulation ein dritter Mediumwechsel unter Zugabe von Inhibitoren (AMD3100, CCX733). Die Stimulationszeit war je nach Stimulus unterschiedlich (Bsp.: CXCL-12 15 Minuten, EGF 10 Minuten). Die Stimulation wurde durch Absaugen des Zellkulturmediums und Waschen mit eiskaltem, sterilem PBS gestoppt. In jede Zellkulturflasche erfolgte die Zugabe von 250 µl eisgekühltem Lysispuffer mit Vanadat und Glycerophosphat. Das abkratzen mittels Zellschaber fand danach auf Eis statt. Die Suspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppis) überführt, bei 12000 rpm für drei Minuten abzentrifugiert und in neue Eppis überführt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode bestimmt und mit SDS-Probenpuffer auf einen Proteingehalt von 5 µg/ 20 µl eingestellt.

Nach dem Denaturieren durch Kochen für 10 Minuten erfolgte eine Lagerung bei -20°C.

3.2.2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mittels Bradford-Reagenz. Dafür wurden 5 µl Probe bzw. für den Leerwert Lysispuffer in 795 µl H₂O bidest. gegeben und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Der Standard setzte sich aus 785 µl H₂O bidest., 5 µl Lysispuffer, 10 µl einer 1 mg/ml BSA-Lösung und 200 µl Bradford-Reagenz zusammen. Durch die Komplexbildung mit Proteinen stabilisiert der Farbstoff von der kationische roten Form zu einer unprotonierten blauen Form und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm [Compton and Jones, 1985]. Nach einer kurzen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proteinlösung im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit der folgenden Formel:

$$\frac{OD_{595}(\text{Probe})}{OD_{595}(\text{Standard})} \times 2 = \text{Proteingehalt in mg/ml}$$

Darauf wurden die Proteinkonzentrationen für fünf Proben mit SDS-Probenpuffer auf 100 µl und 25 µg Protein eingestellt und für 10 Minuten bei 97°C gekocht. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nutzte man die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page). Dabei wurden 10- und 12,5- %ige Trenn- und 4,5 %ige Sammelgele verwendet. Die vorher mit Ethanol gereinigten Glasplatten spannte man in die Gießvorrichtung, das Trenngel wurde in der Zusammensetzung (siehe Tabelle 3) bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand gegossen und zur besseren Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach 15 Minuten wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen. Um die Taschen für die Proben zu schaffen, wurde ein Kamm in das noch nicht polymerisierte Gel gesteckt.

Tabelle 3: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen bei der SDS-Page

	Trenngel		Sammelgel
	10%	12,50%	4,50%
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	2,6 ml
Acrylamid-Bis-Lsg.	3,33 ml	4,17 ml	1,67 ml
Aqua bidest.	4,03 ml	3,29 ml	5,79 ml
APS 10%	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl

Nach weiteren 15 Minuten wurden die Taschen mithilfe einer stumpfen Kanüle mit H₂O bidest. gespült und in die Elektrophoresekammer eingespannt. In eine Tasche kamen 7 µl *PageRuler Prestained Protein Ladder* als Molekulargewichtsmarker. In die restlichen Taschen wurde 20 µl Probe mit einer Endkonzentration von 5 µg/20 µl gefüllt. Die Proben wurden vorsichtig mit Elektrodenpuffer aufgefüllt und danach in die gesamte Kammer gefüllt. In die mittlere Kammer wurde zusätzlich ein Tropfen Bromphenolblau als Indikatorfront gegeben. Nun erfolgte die Elektrophorese für ca. 30 Minuten bei 300 V, bis die Lauffront die Unterseite des Gels erreichte.

3.2.2.4. Proteintransfer auf PVDF-Membran

Die nun getrennten Proteine wurden im Blotter auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran übertragen. Die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran equilibrierte in Methanol und Transferpuffer. Die befeuchtete Anode(-) und das in Transferpuffer getränkte *Whatman*-Papier wurden zweilagig aufgelegt und danach legte man das Gel mit der PVDF-Membran auf, wobei die Membran zeigt hier zur Anode wies.

Obenauf wurden ebenfalls zwei getränkte *Whatmann*-Papiere gelegt. Mit einer kleinen Rolle strich man dieses „Paket“ glatt, um Luftblasen zu verdrängen und einen gleichmäßigen Proteintransfer zu gewährleisten. Die befeuchtete Kathode wurde obendrauf gelegt, die Kammer verschlossen und im *TransBlotTurbo* für 30 Minuten mit Programm 1 laufen gelassen.

3.2.2.5. Immunologische Detektion der Proteine

Die PVDF-Membran wurde nach dem Proteintransfer mit 5%iger Milchpulverlösung zwecks Absättigung freier Bindungsstellen für 50 Minuten inkubiert. Der Primärantikörper wurde in 1 ml Milchpulverlösung bzw. 5% BSA-Lösung bei phosphoryliertem Antikörper verdünnt. Die Membran musste vorher zusätzlich drei-mal zehn Minuten mit TBST gewaschen werden, wenn Antikörper gegen phosphorylierte Proteinbereiche verwendet wurden. Die Membran wurde zusammen mit dem Antikörper in eine Schlauchfolie eingeschweißt und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran drei mal zehn Minuten in TBST gewaschen um die unspezifisch gebundenen Antikörper von der Membran zu entfernen. Danach wurde der in 30ml TBST oder Milchpulverlösung verdünnte Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und wieder mit TBST für drei-mal zehn Minuten abgewaschen.

Die Detektionsreagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, die Membran auf Parafilm gelegt, ein ml Reagenz aufgetropft und gleichmäßig verteilt. Diese Inkubation dauerte fünf Minuten. Ziel dieser Reaktion ist die Sichtbarmachung der Antikörper-markierten Proteine. Das Detektionsreagenz ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit enthält Luminol und Wasserstoffperoxid und kann durch die Meerrettichperoxidase (HRP) umgesetzt werden. Welches an den Sekundärantikörper gekoppelt war.

Nach der Inkubation wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen, überflüssige Lösung abgetropft und in eine Filmkassette geklebt.

Der in der Dunkelkammer zugeschnittene Film wurde für 20 Sekunden auf die Membran gelegt und dann im Entwicklerbad so lange gebadet, bis Banden sichtbar wurden. Nach einer Spülung in Wasser wurden die Filme für fünf Minuten im Fixierbad fixiert, unter fließendem Wasser abgespült und nach dem Trocknen die Markerbanden von der Membran übertragen.

3.2.2.6. Reblotting

Um die gleiche PVDF-Membran gegebenenfalls auf einen anderen Effekt hin zu untersuchen, kann mit Antikörpern erneut inkubiert werden. Um die bereits gebundenen Antikörper zu entfernen, musste die Membran zuerst in Methanol

gewaschen werden, 30 Minuten in 0,1 M Glycin, 1% SDS (pH 2,5) und drei mal 15 Minuten in 0,1 M Tris (pH 7,5) folgten. Danach wurde wieder für 50 Minuten mit Milchpulverlösung blockiert und es konnte Primär- und Sekundär-Antikörperinkubation, wie oben beschrieben, durchgeführt werden.

3.2.2.7. Caspase-3-Test zur Bestimmung der Apoptoserate

Die Bestimmung der Apoptoserate auf Proteinebene erfolgte mit einem Caspase 3/7-Assay. Nach Apoptoseinduktion mittels Staurosporin folgt der Apoptoseprozess über Effektorcaspasen. Die Aktivität der Caspase-3 wurde als Maß für die Apoptoserate herangezogen. Nach der Stimulation in kleinen Zellkulturflaschen (ca. 300000 Zellen/Flasche), wurden diese im Medium abgeschabt und in der Zentrifuge DigifugeGL für fünf Minuten bei 1000 g zentrifugiert. So wurden auch tote, schwimmende Zellen für eine Messung erhalten. Danach wurde das Medium über dem Pellet entfernt und mit PBS gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit gleichen Einstellungen. Das Sediment wurde in einer möglichst kleinen Menge (mindestens 100 µl, maximal 250 µl) NP40-Lysispuffer (50 mM HEPES; pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1% NP40; 10 mM DTT; 1 mM EDTA; 10% Glycerol) gelöst und für mindestens 30 Minuten bei -70°C eingefroren. Es folgte die Proteinbestimmung nach Bradford und das Einstellen von 50 µg Protein auf 250 µl Lysispuffer.

Danach wurde das Substrat auf eine Konzentration von 40 µM in Lysispuffer verdünnt und 250 µl des Substrat-Lysispuffer-Gemischs zu jeder Probe hinzugegeben. Die Inkubation bei 37°C erfolgte für vier Stunden, bevor die Fluoreszenz gemessen wurde.

Das Substrat ist AC-Asp-Glu-Val-Asp-AMC und enthält eine für Caspase 3 spezifische Spaltungssequenz. Ebenso enthält es das Fluorophor AMC (7-Amino-4-methylcumarin). Dieses erzeugt, ist es an das Substrat gebunden, eine blaue Fluoreszenz unter UV-Licht ($\lambda_{\text{ex}}=360 \text{ nm}$); wird es hingegen vom Substrat abgetrennt, emittiert es gelb-grüne Strahlung der Wellenlänge 460 nm. Das bedeutet, dass die Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{ex}}=360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=460 \text{ nm}$) als Maß für die Caspase-Aktivität herangezogen werden kann.

Aufgrund von Hintergrundfluoreszenzen ist eine ausschließliche Bestimmung der Caspase 3 Aktivität notwendig. Dazu wurden in der Negativkontrolle 3 µl eines kompetitiven Inhibitors mit einer Endkonzentration von 40 µM vor Zugabe des Substrates gegeben. Dieser Inhibitor war Asp-Glu-Val-Asp-CHO und wird zwar

selektiv von Caspase 3 gebunden, aber nicht gespalten. Die Messung erfolgte im Fluoreszenzspektrophotometer F 2000 und die Berechnung der Signalstärke aus der Differenz von Probe ohne Inhibitor und Negativkontrolle mit Inhibitor.

3.2.3. Migrationsversuche mittels Boydenkammer

Die 1962 von Stephen Boyden [Boyden, 1962] erstmals beschriebene Boydenkammer zur Durchführung von Versuchen zur Chemotaxis besteht aus zwei zusammenschraubbaren Kunststoffplatten mit vier mal 12-Wellen. Die beiden Kompartimente sind durch eine Polycarbonatmembran mit definiertem Porendurchmesser getrennt. Im unteren Teil befindet sich das Zellkulturmedium mit dem Stimulus und in den oberen Wells die Zellen im Medium (siehe Abbildung 5). Aufgrund eines Konzentrationsgefälles wandern die Zellen nach einer bestimmten Inkubationszeit hindurch, lagern sich an der Unterseite der Membran an und lassen sich nach einer Färbung mit Häemalaun nachweisen und quantifizieren.

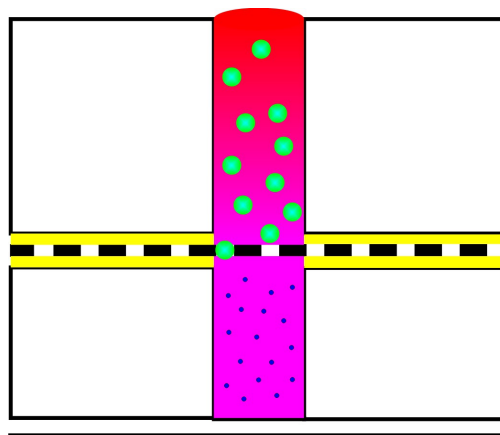


Abbildung 5: Prinzip des Migrationsversuchs mit der Boydenkammer

Im oberen Kompartiment befinden sich die Zellen, im unteren die Stimuli. Die Trennung erfolgt durch die hier schwarz dargestellte Polycarbonatmembran und die Abdichtung durch eine Silikonmatte (gelb).

Als zu durchwandernde Membran wurde eine entfettete Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 5 μm angewendet [Forstreuter et al., 2002]. Zum Entfetten wurde die Membran für 20 Minuten in Eisessig gelegt und danach vier mal fünf Minuten mit destilliertem Wasser gespült.

In die untere Kammer wurden in jedes Well 28,5 μl mit Medium verdünnte Stimuli und Kontrollmedium blasenfrei pipettiert. Die Stimuli (CXCL-11, CXCL-12, AMD3100, CCX733) wurden in DMEM + 0,5% FKS verdünnt. Als Kontrolle diente eine 12-Well-Platte mit Medium und Medium mit 10% Serum beladen. Die

entfettete Polycarbonatmembran wurde mit einer Pinzette blasenfrei auf die Wells aufgelegt. Dabei zeigte die glatte Seite nach oben. Anschließend wurde die Silikondichtung vorsichtig aufgelegt und die obere Zellkammer aufgeschraubt. In die oberen Wells wurden nun je 50 µl Zellsuspension in DMEM + 0,5% FKS blasenfrei pipettiert. Dabei war es wichtig, die Membran nicht zu berühren um keine Mikroperforationen und damit erleichterte Zellwanderung zu verursachen. Die Zellzahl pro Well betrug 25000. Zur Inkubation wurde die Boydenkammer in eine große Glasschale gestellt und die Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag wurde für die Färbung zuerst das Häemalaun filtriert. Die Boydenkammer wurde umgedreht und die Zellsuspension in Zellstoff ausgeklopft. Nach dem Aufschrauben und Entfernen der Silikondichtung wurde die Membran an der glatten Seite in PBS abgestreift und die migrierten Zellen für fünf Minuten in 100% Methanol fixiert. Die Zellen befanden sich zu dem Zeitpunkt nicht mehr auf der glatten Seite, sondern waren durchgewandert. Alle nicht-migrierten wurden mit PBS entfernt.

Danach wurde für 30 Minuten im filtrierten Häemalaun die Färbung der Zellen durchgeführt. Sollte die Färbung zu schwach gewesen sein, wäre es möglich mit Leitungswasser nachzuspülen, da die darin enthaltenen Metallionen die Zellpunkte stärker kontrastieren würden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde dieser Schritt bei allen Färbungen durchgeführt.

Die Folien wurden in destilliertem Wasser gewaschen, danach in der Mitte zerschnitten, auf Objektträger aufgebracht und mit Microscopy Aquatex® unter großen 24x50 mm Deckgläsern eingedeckelt.

Zur Auswertung wurden die Objektträger in einem Epson-Flachbettscanner als Positivfilm mit 8-Bit Graustufen bei 600 dpi eingescannt. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm PCbas wurde die Pixeldichte und Farbstärke der kreisförmigen Zelldurchtritte ermittelt und quantifiziert. Die Migration der stimulierten Zellen wurde relativ zum Kontrollwert DMEM + 0,5 % FKS in Prozent angegeben.

3.2.4. Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1. Isolierung von RNA

Die in kleinen Flaschen kultivierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und zur Lyse mit 0,5 ml QIAzol versetzt. Die mit einem Zellschaber abgekratzten

Zelltrümmer überführte man in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß. Zur eigentlichen RNA-Isolierung erfolgte das Zentrifugieren zur Entfernung der Zelltrümmer bei 800x g, bei 4°C für fünf Minuten. Der so entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt und mit 100 µl Chloroform überschichtet. Man konnte nun eine dreiphasige Trennung beobachten, wobei die untere rötliche Phase chloroform- und phenolhaltig war und DNA und Proteine enthielt. In der oberen wässrigen Phase befand sich die RNA, die in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde und mit 250 µl Isopropanol ausgefällt wurde. Die untere und die Interphase verwarf man. Die Probe wurde zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 12000x g, bei 4°C für zehn Minuten, zentrifugiert. Ein gelartiges Pellet befand sich nun am Boden, welches die RNA darstellt. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 500 µl 75%igem(v/v) Ethanol gewaschen und suspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 7500x g, 4°C für fünf Minuten, wurde das Pellet getrocknet und in 20-30 µl RNase-freiem-Wasser bei 56°C für zehn Minuten gelöst. Hier wäre eine kurzfristige Einlagerung bei -20°C möglich. Längerfristig sollte die Lagerung bei -70°C stattfinden.

3.2.4.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Das für die Bestimmung der RNA-Konzentration benötigte Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren befindet sich bei einer Extinktion von 260nm. Die Probe wurde 1:200 verdünnt und gegen Wasser im Photometer gemessen. Die Berechnung erfolgte mit folgender Formel:

$$\frac{OD_{260} * 40 * \text{Verdünnung}}{1000} = \text{RNA-Gehalt } (\mu\text{g/ml})$$

3.2.4.3. Reinheitsbestimmung der RNA-Probe

Zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Probe wurde eine weitere Messung bei einer Absorption von 280 nm durchgeführt. Ergibt der Quotient einen Wert von zwei, ist die Reinheit ausreichend.

3.2.4.4. Synthese der cDNA

Die nun isolierte RNA musste in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde als DNA-Polymerase *ReverseAid TM H Minus M-MuLV RT* verwendet. Der von der reversen Transkriptase benötigte *Random Hexamer Primer* wurde verwendet und

1 µg RNA zugesetzt. Durch DNase-Verdau wurde eventuell noch vorhandene DNA abgebaut. Dazu gab man zu 1 µl RNA 7 µl RNase-freies-Wasser sowie je 1µl DNase-Puffer und DNase. Danach wurde die Probe bei 37°C für 15 Minuten inkubiert und anschließend mit 1 µl 25 mM EDTA versetzt, das für die DNase notwendige Mg²⁺ chelatisierte. Die Inaktivierung der DNase und die Auflösung der RNA fand für fünf Minuten bei 65°C statt. Anschließend kühlte man die Probe herunter und gab 2 µl Primer hinzu. Der *Random Hexamer Primer* wurde bei 70°C für fünf Minuten inkubiert. Nach der Kühlung auf Eis wurden 4 µl Reaction-Puffer, 2 µl dNTP-Mix und 1 µl Wasser hinzugegeben. Die kurz an zentrifugierte Probe versetzte man fünf Minuten bei 25°C mit 1 µl reverser Transkriptase. Es folgte die tatsächliche cDNA-Synthese für zehn Minuten bei 25°C, dann 60 Minuten bei 42°C. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch ein zehnminütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt.

3.2.4.5. Quantitative PCR

Die real-time PCR wird zur Bestimmung der relativen Expression von RNA eingesetzt. Sie verbindet die klassische Polymerasekettenreaktion (PCR) mit der Quantifizierung der DNA. Die Quantifizierung erfolgt mittels einer Fluoreszenzmessung während der einzelnen PCR-Zyklen. Dabei nimmt die Fluoreszenz mit der Menge der Produkte proportional zu. Die Auswertung kann in Relation zu einem Referenzgen erfolgen. Genutzt wurde das Gen des Enzyms GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), da es als Bestandteil der Glykolyse in fast allen Körperzellen vorkommt und somit ideal geeignet ist.

Die benötigte Menge der gewonnenen cDNA betrug 2 ng. Dazu wurden bei einer Verdünnung von 10 ng/µl 2 µl pro Well in eine 96-Well-Platte gegeben. Diese musste hitzestabil und optisch durchlässig sein, um eine Auswertung im real-time PCR Gerät zu ermöglichen. In jedes Well wurden 18 µl vom Master Mix gegeben. Dieser bestand aus 1 µl Forward Primer (10 µM) und Reverse Primer (10 µM), 10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix und 7 µl Wasser.

Die real-time PCR wurde im ABI Prism-7700 SDS mit folgendem drei-schrittigen Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	50°C	2 min	1
2	95°C	10 min	1
3	95°C	15 sek	40

60°C

1 min

Zur Auswertung wurde der ΔCt -Wert verwendet. (Ct=Cycle of Threshold) Dieser markiert den PCR-Zyklus, an dem die Probenfluoreszenz sich signifikant von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Als Referenzgen wurde das GAPDH-Gen verwendet und somit ließ sich der ΔCt -Wert nach folgender Formel berechnen:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Probe}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

Die relative Genexpression lässt sich anschließend durch $2^{-\Delta Ct}$ berechnen.

3.2.5. Morphologisch-optische Methoden

3.2.5.1. Native immunzytochemische Färbung

Die Färbung der Rezeptoren beruht auf dem unterschiedlichen Bindungsverhalten der genutzten Antikörper. Zuerst wird der Rezeptor mit dem Primärantikörper markiert. Der Antikörper bindet mit seiner Fab-Region an den Zielrezeptor. Da dieser jedoch nicht sichtbar ist, erfolgt die Markierung mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper. Dieser bindet mit seinem Fab-Teil an die Fc-Region des Primärantikörpers. Das Prinzip der immunzytochemischen Färbung ist in Abbildung 6 dargestellt.

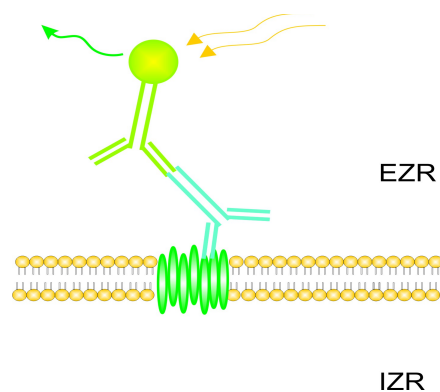


Abbildung 6: Prinzip der immunzytochemischen Färbung

Der Primärantikörper (blau) bindet an den Rezeptor (grün). An den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet der Sekundärantikörper (hellgrün). Nach einer Aktivierung durch Licht fluoresziert dieser.

Die am Vortag auf PDL-beschichteten-Deckgläschen ausgesäten MCF-7 Zellen wurden mit PBS + 0,5% BSA gespült und das Medium auf DMEM + 1% BSA gewechselt. Es folgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37°C, 30 Minuten bei

Raumtemperatur und dann 30 Minuten bei 4°C.

Nach dem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Deckgläschen in eine neue 6-Well-Platte umgesetzt und mit 100 µl verdünntem Primärantikörper überschichtet. Als Primärantikörper wurden Ziege- α -CXCR4 der Firma Abcam und Maus- α -CXCR7 von Chemocentryx genutzt, wobei diese in DMEM + 1% BSA je 1:100 verdünnt wurden.

Die Sekundärantikörper Ziege- α -Maus488 und Esel- α -Ziege555 der Firma Invitrogen wurden 1:800 in DMEM + 1% BSA im Dunkeln verdünnt und Esel- α -Ziege555 nach einem erneuten Spülen und Umsetzen der Deckgläschen in eine 6-Well-Platte für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abspülen mit PBS und Plattenwechsel wurde für 45 Minuten goat- α -mouse488 dazugegeben wurde.

Nach einem folgenden Waschgang mit PBS + 0,5% BSA wurden die Zellen zehn Minuten mit einem eiskaltem Aceton-Methanol-Gemisch fixiert.

Nach einer Spülung mit PBS + 0,5% BSA wurde für 45 Minuten mit DAPI eine Kernfärbung vorgenommen. Das Eindeckeln auf Objektträger erfolgte danach mit Immu-Mount.

Nach einer Aushärtung über Nacht bei 4°C konnte eine Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35M vorgenommen werden.

3.2.5.2. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Zur ultrastrukturellen Klärung der räumlichen Beziehung der Rezeptoren wurde die Transmissions-Elektronenmikroskopie angewendet. Dabei durchstrahlen Elektronen das untersuchte Objekt (Transmission). Die Elektronen werden in einer Elektronenkanone mit 80-400 kV beschleunigt. Diese Beschleunigungsspannung muss dem Objekt angepasst werden und erhöht sich mit zunehmender Objektdicke und Ordnungszahl. Letzteres ist vor allem für die Werkstoffprüfung von Bedeutung. Bei der Untersuchung biologischer Objekte findet eine Spannung von 80 kV Anwendung. Die in einem dünnen Strahl austretenden Elektronen werden durch ein Kondensator-Linsensystem parallelisiert. Die Linsen sind hierbei stromdurchflossene Spulen, welche die Elektronen durch ihr elektromagnetisches Feld im Strahlengang verändern. Treffen die Elektronen nun auf das zu untersuchende Objekt werden sie gestreut. Die verwendeten biologischen Objekte verursachen hierbei aufgrund ihres Anteils an Atomen mit geringer Ordnungszahl nur wenig Streuung. Beachtet

werden muss auch, dass bei höherer Beschleunigungsspannung die Absorption der Elektronen eine Hitze erzeugt, die die Probe zerstören kann.

An einer folgenden Blende werden nur die Elektronen hindurchgelassen, die nicht gestreut wurden. Das so entstandene Zwischenbild wird auf einen Detektor projiziert und auf lichtempfindlichen Chips digitalisiert. In der Elektronenmikroskopie sind nur Schwarz-Weiß-Bilder möglich, wobei hier ein höherer Schwärzegrad auch eine höhere Elektronendichte des Objektes darstellt.

Grundsätzlich lassen sich bei der Elektronenmikroskopie zwei Arten der Markierung mit Antikörpern unterscheiden. Beim *post-embedding* werden die Zellen erst fixiert, dann eingebettet, geschnitten und erst am Ende mit Antikörpern markiert. Um die Internalisierung der Rezeptoren zu untersuchen, fand im Rahmen dieser Arbeit die Färbung *pre-embedding* statt. Die Zellen wurden, wie in der Immunzytochemie, erst mit den Primärantikörpern markiert. Der Sekundärantikörper Esel- α -Ziege (Gold 15 nm) wurde für 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Abspülen mit PBS und Plattenwechsel wurde für 45 Minuten mit Ziege- α -Maus (Gold 5 nm) inkubiert. Nach der Internalisierung erfolgte die Fixierung für 30 Minuten mit 4% Paraformaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd in PBS bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden über Nacht in PBS bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag erfolgte das Osmieren der Zellen mit 2% in H₂O gelöstem Osmium und das Entwässern für je zwei mal fünf Minuten in einer aufsteigenden Reihe von 50%(v/v) auf 90%(v/v) mit unvergälltem Ethanol. Am Ende wurde noch für zwei mal zehn Minuten mit 100% Ethanol entwässert. Es erfolgte über Nacht die Lagerung in einer Lösung 1:1 aus Araldit mit 3% Beschleuniger und Propylenoxid. Am darauffolgenden Morgen fand die Umbettung in Araldit mit 2% Beschleuniger statt. Es folgte das Auspolymerisieren des Kunststoffes bei 65°C im Wärmeschrank. In einer in Methanol angesetzten Bleicitrat-Lösung wurden die Proben zur Kontrastierung für fünf Minuten gelagert. Nach einer weiteren Spülung mit 70, 50, 30% (v/v) Methanol und H₂O bidest. wurden die Proben auf eine Dicke von 60 nm geschnitten und im Elektronenmikroskop ausgewertet.

3.2.5.3. Apoptoseversuche nach Nicoletti

Zur Bestimmung der Apoptoserate mittels Nicoletti-Auswertung wurden 50000 Zellen pro Deckglas einen Tag vor der Stimulation auf PDL-beschichteten Deckgläsern ausgesät und über Nacht in Nährmedium bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Die Stimulation erfolgte nach einem Waschgang mit PBS + 0,5% BSA in DMEM + 0,2% FCS für eine festgelegte Zeit. Nach dieser festgesetzten Zeit wurden die Zellen fixiert. Dies geschah nach dreimaliger Waschung, mit einem 1:1 Aceton-/Methanol-Gemisch für zehn Minuten. Es folgte die Kernfärbung mit DAPI für 35 Minuten und nach weiteren Waschgängen das anschließende Eindeckeln auf dem Objektträger mit Immu-Mount. Nachdem das Immu-Mount im Kühlschrank ausgehärtet war, wurden die Objekte mittels Fluoreszenzmikroskop an je vier unterschiedlichen Stellen fotografiert. Die Fotos wurden anonymisiert und alle apoptotischen Zellkerne markiert und ausgezählt.

3.2.5.4. Kernfärbung

Die Kernfärbung mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) erfolgte sowohl für die Apoptosetests nach Nicoletti sowie bei der immunzytochemischen Darstellung der Internalisierung von Oberflächenrezeptoren. DAPI bindet an AT-reiche Regionen der DNA und AU-reiche Regionen der RNA [Tanius et al., 1992]. Aufgrund von Fluoreszenzunterschieden lässt sich RNA gut von DNA trennen. Die Emission bei 448 nm (blau) ist DNA-spezifisch und damit für eine Kernfärbung geeignet [Krishan and Dandekar, 2005].

3.3. Statistik

Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels eines zweiseitigen, homoskedastischen Student'schen T-Test berechnet und wie folgt kenntlich gemacht: * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001 .

4. Ergebnisse

4.1. Quantitativer Nachweis von CXCR4 und CXCR7 auf MCF-7-Zellen

An den MCF-7-Zellen wurde zunächst die mRNA-Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR7 und CXCR3 sowie der Liganden CXCL11, CXCL12 bestimmt. Dies erfolgte nach Umschreiben der mRNA in cDNA mithilfe der quantitativen real-time PCR.

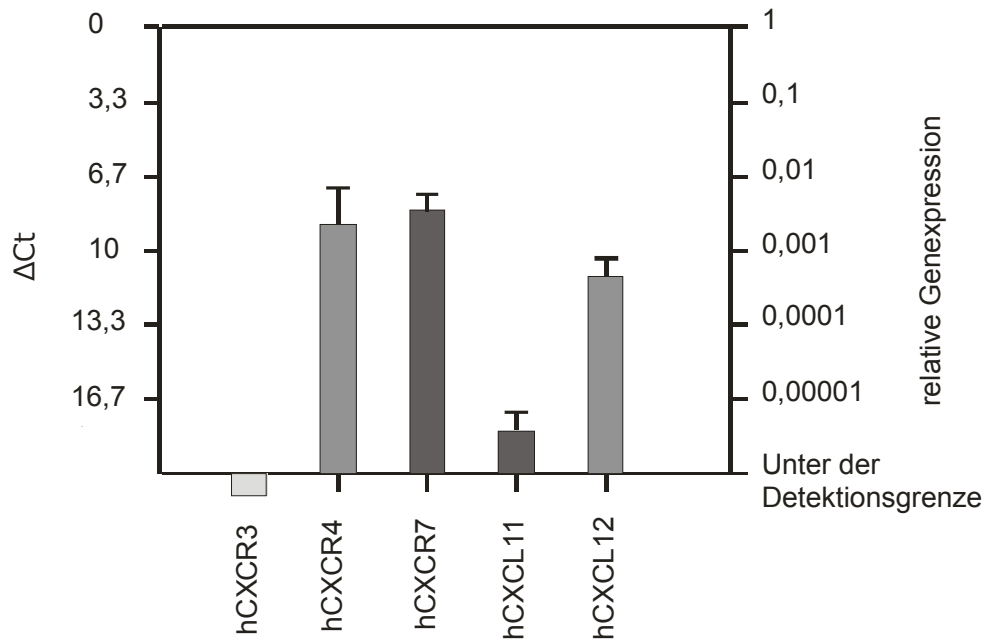


Abbildung 7: Nachweis der Liganden und Rezeptoren

In den MCF-7-Zellen wurde die relative Genexpression von Chemokinen und – Rezeptoren untersucht. Dazu wurde die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der quantitativen real-time PCR ausgewertet.

Die humanen Mammakarzinomzellen MCF-7 exprimieren wie in Abbildung 7 gezeigt die angegebenen Rezeptoren für CXCL12, jedoch nicht den CXCL11-Rezeptor CXCR3. Die Expression des Rezeptors CXCR7, CXCR4 und des Liganden CXCL12 ist nachweisbar. Die Expression der zu untersuchenden Rezeptoren wurde durch Western Blots ebenfalls bestätigt (Abb. 8). Dabei zeigte die Untersuchung anderer Zelllinien das gleiche Ergebnis, wie die vorher durchgeführten real-time PCR's.

Abbildung 8: Nachweis der Rezeptoren mittels Western Blot

Die zu untersuchenden Rezeptoren wurden mittels Western Blot nachgewiesen. Parallel zur MCF-7-Zelllinie wurden in der Arbeitsgruppe noch die Melanomzelllinie LOX und die Glioblastomzelllinien U343 und A772 auf die Rezeptoren CXCR 4 und CXCR7 untersucht.

4.2. Signaltransduktion

Nachdem die Rezeptoren CXCR4 und 7 auf MCF-7-Zellen nachgewiesen wurden, sollte zunächst ermittelt werden, ob deren Liganden CXCL11 und 12 eine Signaltransduktion auslösen. Dazu wurden die Zellen mit CXCL11 und 12 für 15 Minuten in serumfreiem Medium stimuliert und die Phosphorylierung der Kinasen ERK $\frac{1}{2}$ mittels Western Blot untersucht. Um zu Ermitteln, ob die Phosphorylierungen G-Protein- oder Rezeptor-Subtyp abhängig sind, wurden die Zellen mit Pertussis Toxin (PTX), AMD3100 und CCX733 vorinkubiert (siehe Abbildung 9).

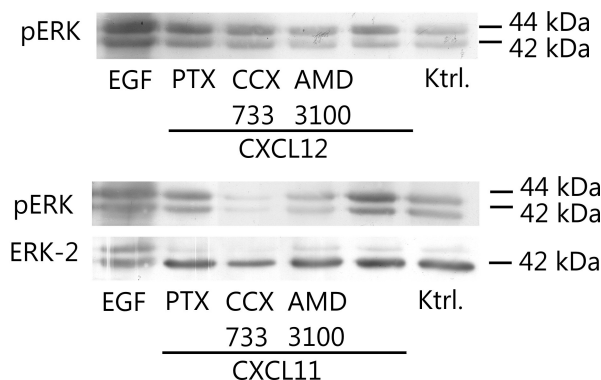


Abbildung 9: Phosphorylierung von ERK durch CXCL12 und CXCL11

CXCL12 wurde in einer Konzentration von 1 nM, CXCL11 in einer von 5 nM, CCX733 in 100 nM und AMD3100 in 10 μ M eingesetzt. Die ERK-Phosphorylierung wird durch AMD3100 leicht blockiert, ebenso wie durch CCX733. PTX hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung verglichen mit der EGF-Positivkontrolle.

Der verwendete Primärantikörper gegen phosphoryliertes ERK/ERK-2 wurde in einer Verdünnung von 1:333 in 5% BSA eingesetzt. Als Auftragskontrolle dienten 1:500 in Blockinglösung verdünnte α ERK-2 Antikörper. Die Zellen wurden am Abend vorher in serumfreies Medium überführt und zu den entsprechenden Flaschen PTX in einer Konzentration von 100 ng/ml gegeben. Am nächsten Morgen erfolgte die Vorinkubation mit den Antagonisten AMD3100 (10 μ M) und CCX733 (100 nM) für eine Stunde und dann die Inkubation mit CXCL11 (5 nM) und CXCL12 (1 nM) für 15 Minuten beziehungsweise mit EGF (20 ng/ml) für zehn Minuten.

Die Auswertung der Blots erfolgte nach dem Einscannen mit dem Bildbearbeitungsprogramm PCbas durch Quantifizierung der Pixeldichte und Farbstärke.

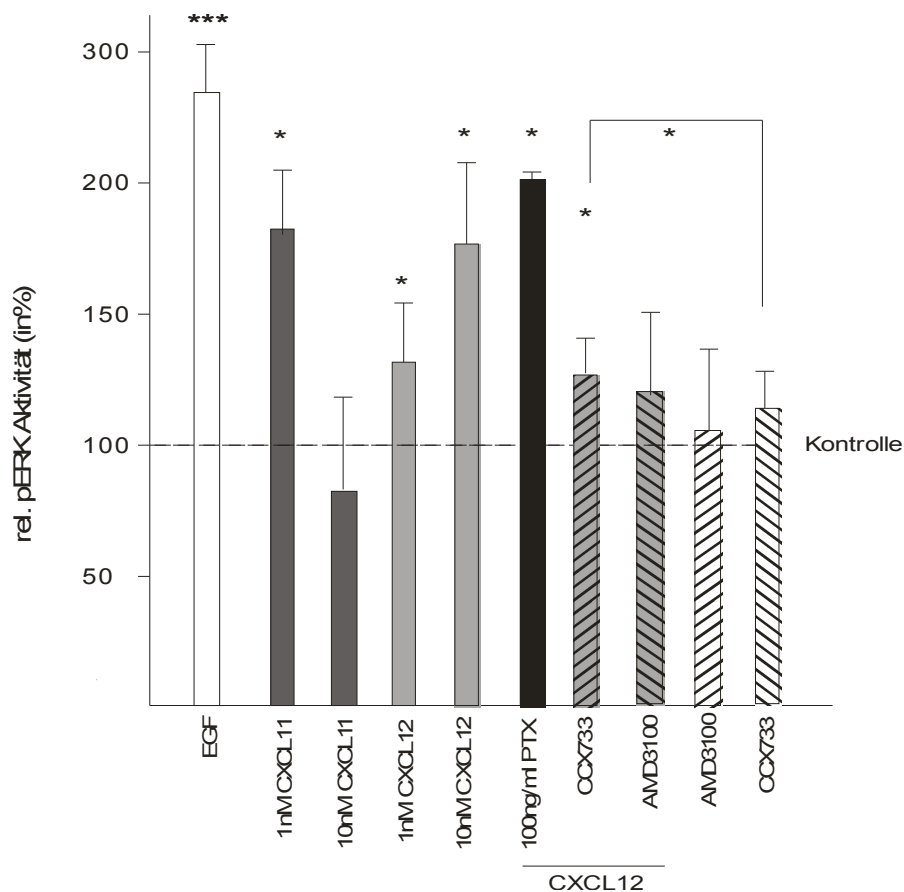


Abbildung 10: Phosphorylierung von ERK durch CXCL12 und CXCL11

Sowohl über CXCR4, als auch CXCR7 wird ERK phosphoryliert, aufgrund des fehlenden inhibitorischen Effekts bei PTX läuft dieser Prozess G-Protein-unabhängig ab (n=4).

Durch CXCL11 (182%±42% bei 1 nM) und CXCL12 (177%±49% bei 10 nM) lässt sich eine Phosphorylierung von ERK erkennen, PTX (202%) hat in Kombination mit CXCL12 keinen negativen Effekt auf die Phosphorylierung (siehe Abbildung

10). Eine Verringerung der Phosphorylierung sowohl durch den Antagonisten AMD3100 ($120\% \pm 34\%$), als auch durch CCX733 ($129\% \pm 8\%$) in Kombination mit CXCL12 ist nachzuweisen. Beide Antagonisten induzieren keine eigenen Effekte. Daraus ergibt sich, dass über beide Rezeptoren ERK phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung aufgrund des fehlenden Effektes von PTX G-Protein-unabhängig abläuft.

4.3. Internalisierungsversuche

4.3.1. Native Immunzytochemie

Um die Interaktion der Rezeptoren morphologisch nachzuweisen, wurden immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die extrazellulären Domänen der Rezeptoren durchgeführt. Als Primärantikörper wurde Ziege- α -CXCR4 der Fa. Abcam und Maus- α -CXCR7 der Fa. Chemocentryx genutzt. Die unterschiedlich fluoreszierenden Sekundärantikörper Esel- α -Ziege-555 und Ziege- α -Maus-488 wurden von der Fa. Invitrogen bezogen. Das Versuchsprotokoll fand in der Arbeitsgruppe schon Anwendung und wurde wie oben beschrieben umgesetzt. In hier nicht gezeigten Vorversuchen wurden die Rezeptoren zuerst einzeln gefärbt und die Antikörper dann auf ihre Befähigung zur Doppelfärbung getestet.

Anhand der Stimulation mit den partiell selektiven Liganden CXCL11 und CXCL12 und den synthetischen Inhibitoren wie AMD3100 und CCX733 sollten die Rezeptoren auf ihre Internalisierungsfähigkeit hin untersucht werden.

Dafür wurde mit CXCL12 (5 nM) und CXCL11 (10 nM) jeweils für fünf und zehn Minuten bei 37°C internalisiert. Mit AMD3100 (5 μM) und CCX733 (100 nM) erfolgte die Internalisierung ebenfalls für zehn Minuten.

Wie in Abbildung 11 dargestellt, befinden sich die Chemokinrezeptoren bei einer Markierung ohne Internalisierung auf der Zelloberfläche und sind einzeln angefärbt. In der Sekundärantikörperkontrolle sind nur die durch DAPI gefärbten Zellkerne zu sehen und keine Zellränder. Diese Kontrolle wurde in allen Färbungen zum Ausschluss von unspezifischen Antikörperreaktionen durchgeführt, aber in dieser Arbeit nicht abgebildet.

Bei den Internalisierungsversuchen zeigte sich ein Verlauf, sowohl mit CXCL12 als auch mit CXCL11. Nach fünf Minuten ist bei beiden Liganden eine beginnende Internalisierung zu erkennen, wobei die Zellränder noch deutlich zu identifizieren sind. Nach zehn Minuten befinden sich die Rezeptoren weiter im

Zellinneren und zeigen ein deutliches „Merging“. Das bedeutet, dass die Rezeptoren nicht mehr rot und grün gefärbt sind, sondern jetzt in gelben Mischfarben angefärbt sichtbar werden. Ursache ist die Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenzen.

Der gleiche Effekt ist nach der Internalisierung für zehn Minuten mit AMD3100 und CCX733 zu sehen.

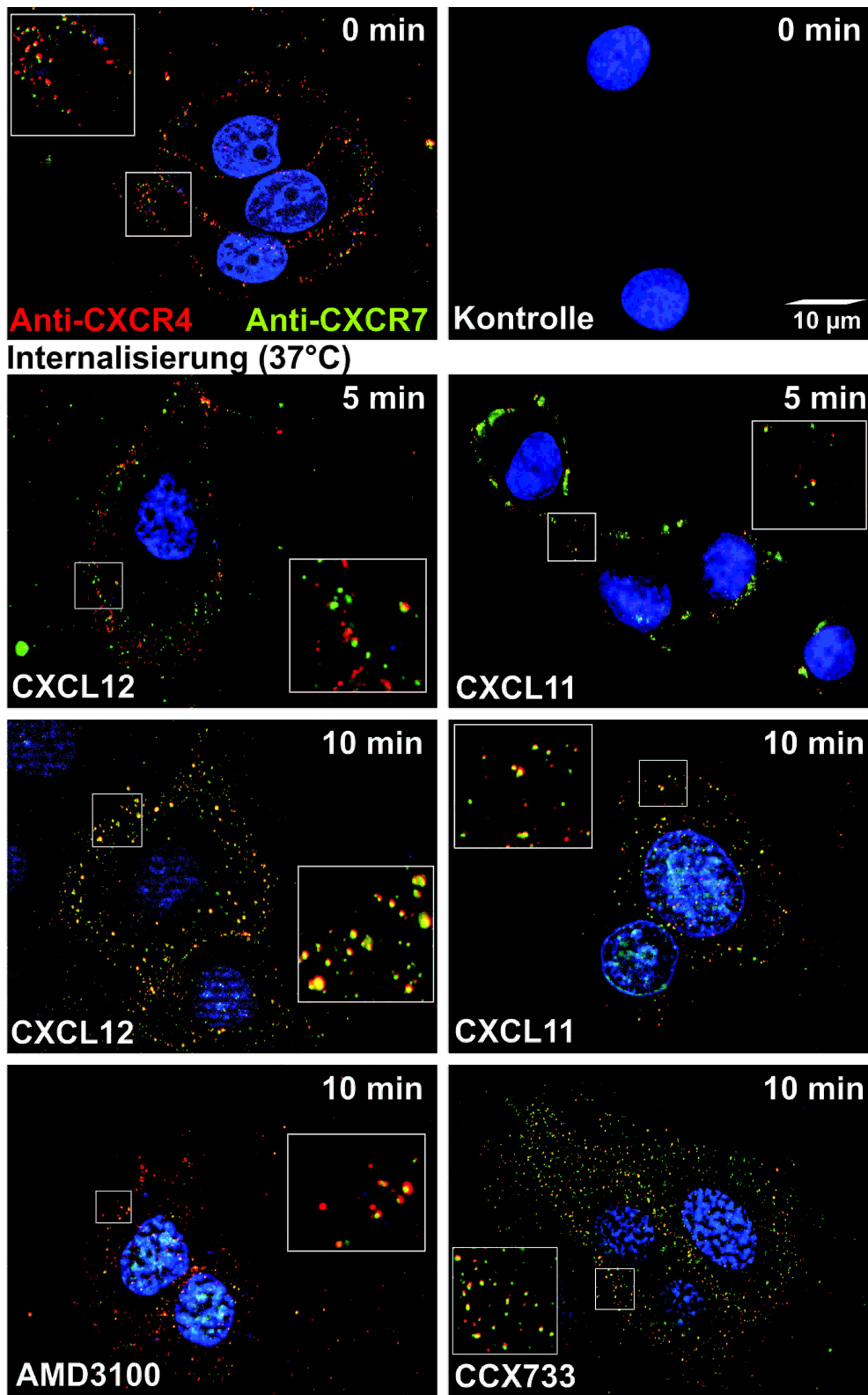


Abbildung 11: Native immunocytochemische Färbung der Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 an MCF-7-Zellen

Die Markierung der Rezeptoren (oben links) zeigt sie an der Zelloberfläche. Bei der Zugabe von CXCL11 und CXCL12 (37°C) ist eine zunehmende Internalisierung mit zunehmender Zeit wahrnehmbar. Mit den AMD3100 und CCX733 ist ebenfalls eine Internalisierung der Rezeptoren erkennbar.

4.3.2. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Klärung der Frage, ob die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 in einer räumlichen Beziehung zueinander stehen und gemeinsam internalisieren, erfolgte zusätzlich mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie. Die Zellen wurden wie bei der Immunzytochemie vorbehandelt. Es wurden zur Aufklärung des Sachverhaltes einmal unstimulierte Zellen, mit CXCL11 und CXCL12 stimulierte Zellen und Sekundärantikörperkontrollen durchgeführt. Die Sekundärantikörperkontrolle ist im Weiteren nicht abgebildet.

Als Sekundärantikörper fanden mit kolloidalem Gold markierte Ziege- α -Maus IgG (Gold 5 nm) und Esel- α -Ziege IgG (Gold 15 nm) Anwendung. Die Fixierung erfolgte mit 4% Paraformaldehyd und 0,5% Glutaraldehyd in PBS. Nach der wie oben beschriebenen Entwässerung wurden sie in Araldit eingebettet, mit Bleicitrat kontrastiert und unter dem Zeiss 902 Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht.

unstimulierte Zellen 4°C

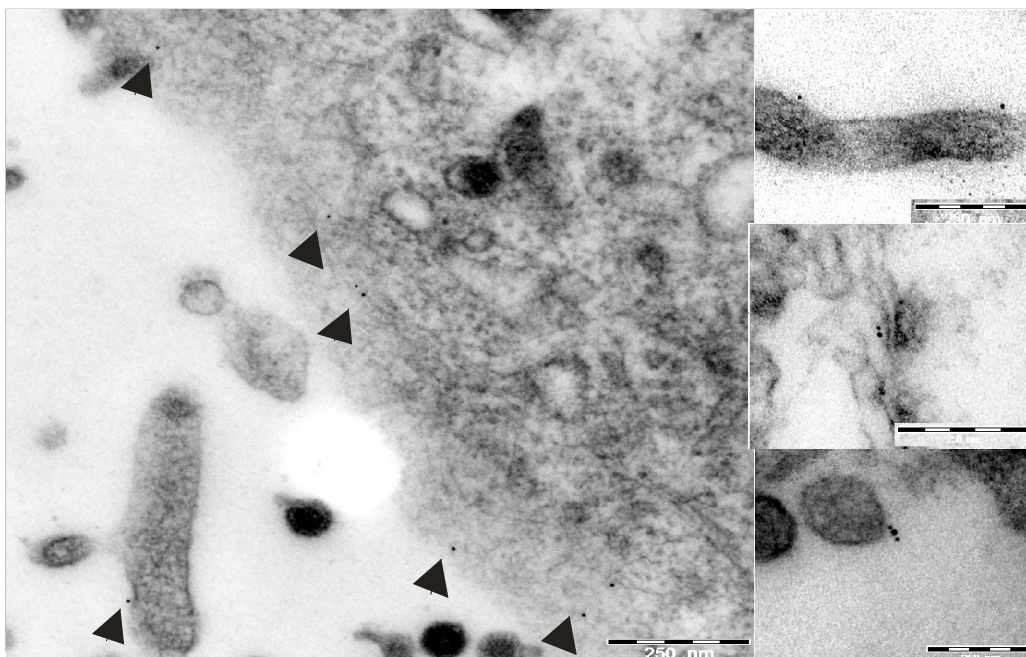


Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Darstellung der mit Goldantikörpern markierten Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7

Die Chemokinrezeptoren sind an der Zelloberfläche lokalisiert zu finden. CXCR4 ist mit 15 nm und CXCR7 mit 5nm großen Gold-AK markiert. Die Aufnahmen wurden mit einer Vergrößerung von 20-30000 aufgenommen.

+ CXCL11 10 min 37°C

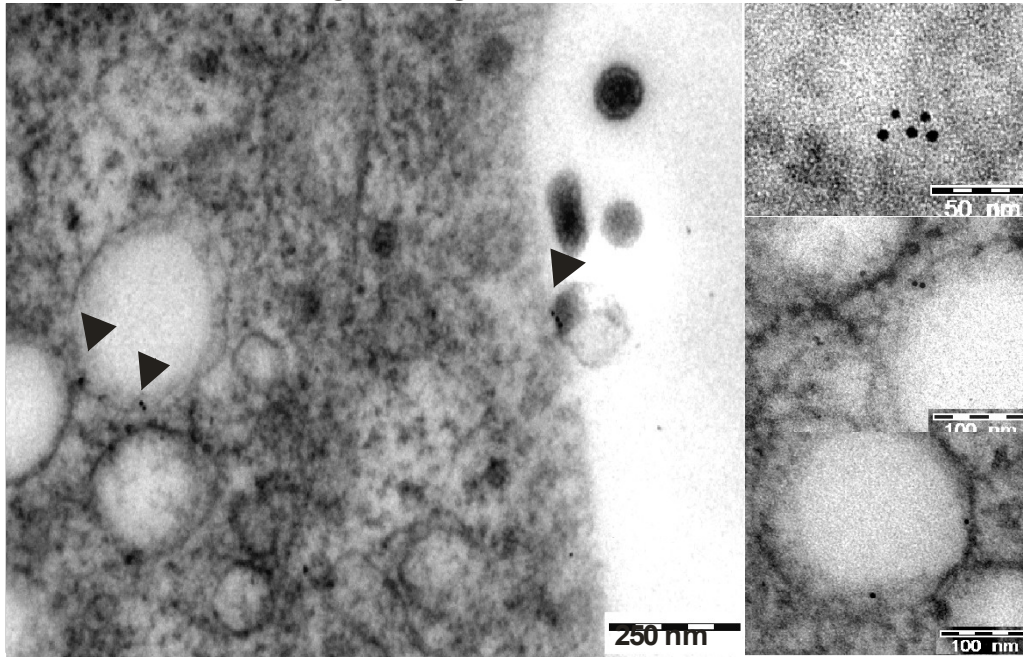
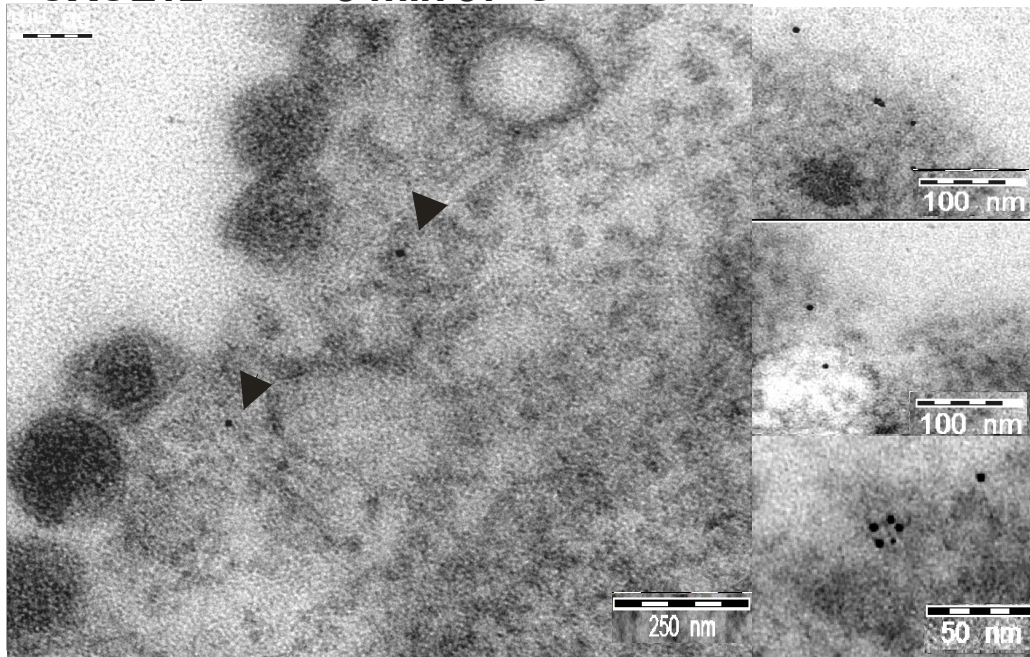


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Darstellung der Chemokinrezeptoren CXCR4 (15 nm) und CXCR7 (5 nm) nach der Internalisierung mit CXCL11 für zehn Minuten

Die Chemokinrezeptoren sind fast vollständig in der Zelle zu finden. Die Aufnahme links wurde mit 20000-facher Vergrößerung angefertigt. Die Vergrößerung der Detailaufnahmen beträgt 50-85000.

+ CXCL12 5 min 37°C



+ CXCL12 10 min 37°C

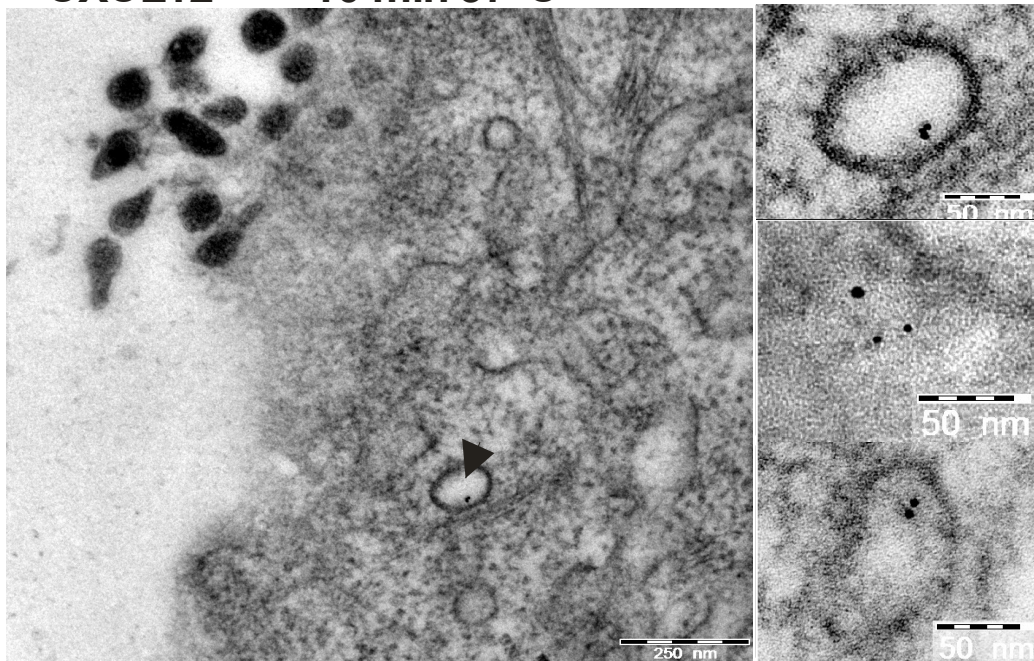


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Darstellung der Chemokinrezeptoren CXCR4 (15 nm) und CXCR7 (5 nm) nach der Internalisierung mit CXCL12 für fünf und zehn Minuten

Die Chemokinrezeptoren sind in Vesikeln internalisiert. Die Aufnahme links wurde mit 30000-facher Vergrößerung angefertigt. Die Vergrößerung der Detailaufnahmen beträgt 50-85000.

Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 sind bei unstimulierten Zellen an der Zelloberfläche markiert. CXCR4 tritt vermehrt auf und ist häufiger einzeln zu finden, als CXCR7. Dieser steht in der Membran fast immer in einer engen räumlichen Beziehung zu CXCR4, wie in dem Ausschnitt der Abbildung 12 unten

rechts zu sehen.

Nach der Internalisierung für zehn Minuten mit CXCL11 waren nur noch vereinzelt markierte Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu finden. Ein Großteil wurde in angeschnittenen Vesikeln internalisiert. Dies erfolgt für CXCR7 immer zusammen mit CXCR4, obwohl dieser auch selbstständig internalisiert (siehe Abbildung 13 u. 14).

Bei der Untersuchung mittels CXCL12 fällt im zeitlichen Verlauf auf, dass eine zügige Internalisierung beider Rezeptoren erfolgt. CXCR4 internalisiert sowohl allein als auch mit CXCR7.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Rezeptoren an der Zelloberfläche allein oder als Heterodimere vorliegen. Beide Liganden lösen eine Internalisierung aus und der CXCR7-spezifische Ligand CXCL11 sorgt auch für die Induktion des Vorganges bei CXCR4, obwohl er nicht direkt angesteuert wird. Dies unterstreicht die Existenz von Rezeptor-Heterodimeren.

4.4. Migration in der Boyden-Kammer

Ziel der Untersuchung des Migrationsverhaltens der MCF-7-Zellen war es, herauszufinden, ob die beschriebenen morphologischen Zusammenhänge der Rezeptoren einen Einfluss auf die Migration haben und sie sich durch selektive Stimulation beeinflussen lassen.

Zur Untersuchung wurden die Zellen wie oben beschrieben pipettiert und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Es zeigte sich, dass ein exaktes und blasenfreies Pipettieren absolut notwendig ist, um eine gute Zellmigration nachzuweisen.

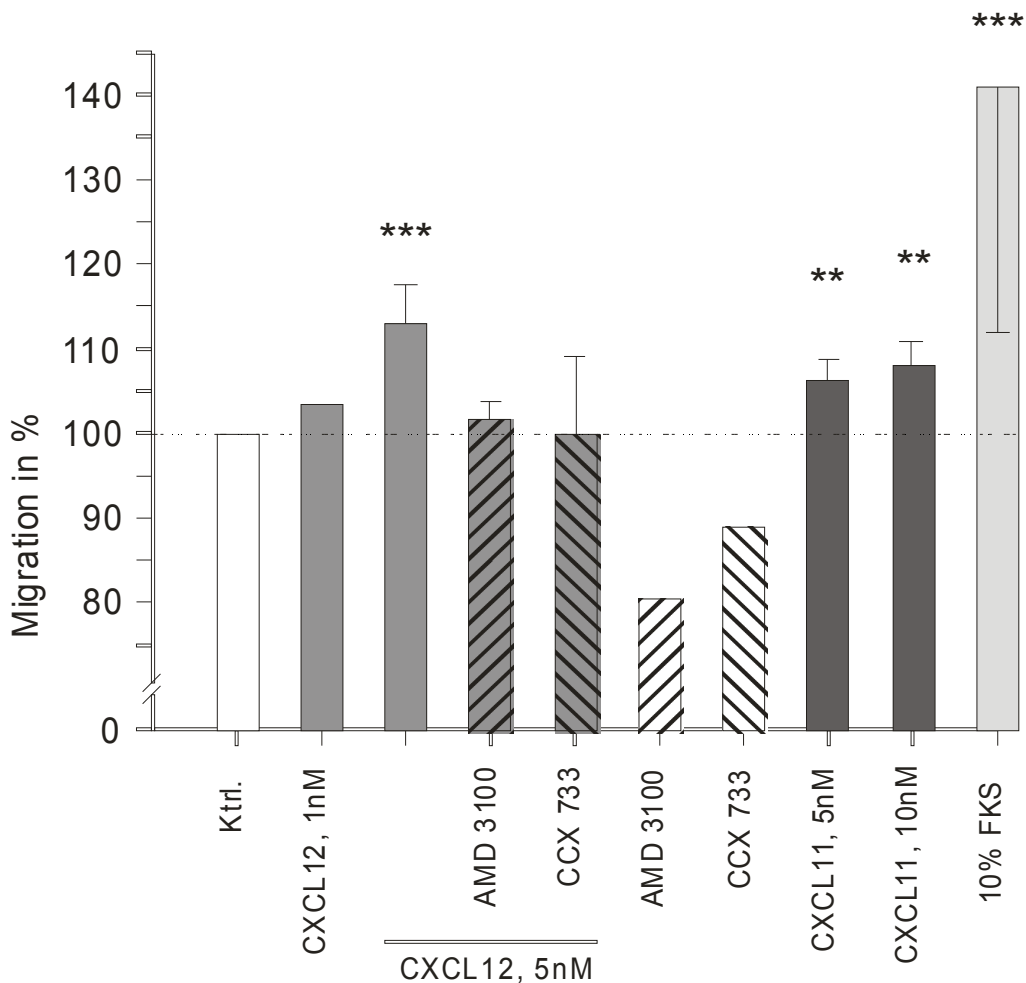


Abbildung 15: Migration von MCF-7-Zellen

Die Stimulation erfolgte für 24 Stunden in einer Boyden-Kammer mit den Liganden CXCL11/12 und den Inhibitoren AMD3100 und CCX733. Als Laufkontrolle wurden 10% FKS eingesetzt. (n=3-8)

Die Migration lag im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mit CXCL12 bei 114,1% ($\pm 4,5\%$), was eine leichte Erhöhung darstellt (siehe Abbildung 15). Bei Zugabe der Inhibitoren AMD3100 bzw. CCX733 verringerte sich die Migrationsrate wieder auf 102,0% ($\pm 2,2\%$) bzw. 100,5% ($\pm 9,3\%$). Bei der reinen Zugabe von AMD3100 ohne CXCL12 sank die Migration auf 89,2% ($\pm 6,0\%$) ab. Auch bei CCX733 war ein Abfall auf 95,2% ($\pm 4,8\%$) zu verzeichnen. AMD3100 wurde in einer Konzentration von 500 nM und CCX733 in einer Konzentration von 100 nM eingesetzt. Die Stimulation der Zellen mit CXCL11 erhöhte die Migrationsrate bei einer Konzentration von 5 nM auf 106,8% ($\pm 2,3\%$) und mit 10 nM auf 109,2% ($\pm 3,0\%$).

Als Kontrolle für die Migrationsfähigkeit der Zellen diente das Medium mit 10% FKS. Dabei war wichtig, dass die Migration mit FKS immer am höchsten war. Eine verringerte Migration mit FKS im Vergleich zu den unstimulierten Zellen

fürhte zum Ausschluss der Versuchsreihe.

Die Migration lässt sich sowohl durch CXCL11 als auch durch CXCL12 steuern und kann durch selektive Antagonisten moduliert werden.

4.5. Effekte auf die Apoptose

4.5.1. Apoptoseversuch nach Nicoletti

Nachdem bei Glioblastomzellen beschrieben wurde, dass CXCL12 über den Rezeptor CXCR7 die Camptothecin- und Temozolomid-induzierte Apoptose hemmt, sollte dieser Effekt an MCF-7-Zellen, die sowohl CXCR7 als auch CXCR4 exprimieren, überprüft werden.

Allerdings erzeugte Camptothecin an MCF-7-Zellen sehr unstete Ergebnisse, dass ein Umstieg auf den Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin vorgenommen wurde.

Zur Bestimmung der idealen Konzentration und Stimulationszeit für eine Apoptoserate von ca. 40% wurden mehrere Zeit- und Konzentrationsreihen durchgeführt.

Dafür wurde die Apoptose mit der Nicoletti-Methode bestimmt, bei der apoptotische Zellkerne, bezogen auf die gesamten Zellkerne, ermittelt wurden (siehe Abbildung 16).

Die Zeitreihe mit einer Stimulationskonzentration von 500 nM erbrachte unstete Ergebnisse im Bereich einer Apoptoserate von 40% (siehe Abbildung 17). Bei einer Stimulationszeit von 24 Stunden erwies sich eine Konzentration von 100 nM Staurosporin als am besten geeignet. Sie ergab eine Apoptoserate von 36,9% ($\pm 6,2\%$).

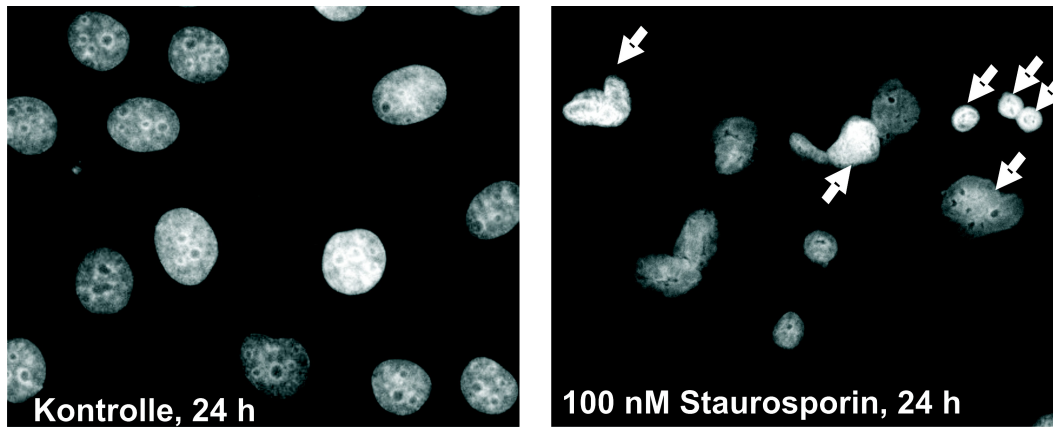


Abbildung 16: Kontrolle und Staurosporin-stimulierte Zellkerne

In der Kontrolle (links) sind die Zellkerne rund und ohne Apoptosegranula. In der Staurosporin-Stimulation (rechts) nach 24 h + 100 nM Staurosporin sind die Zellkerne pyknotisch und es sind dichte Granula von Apoptosevesikeln und verdichtetem Chromatin zu erkennen.

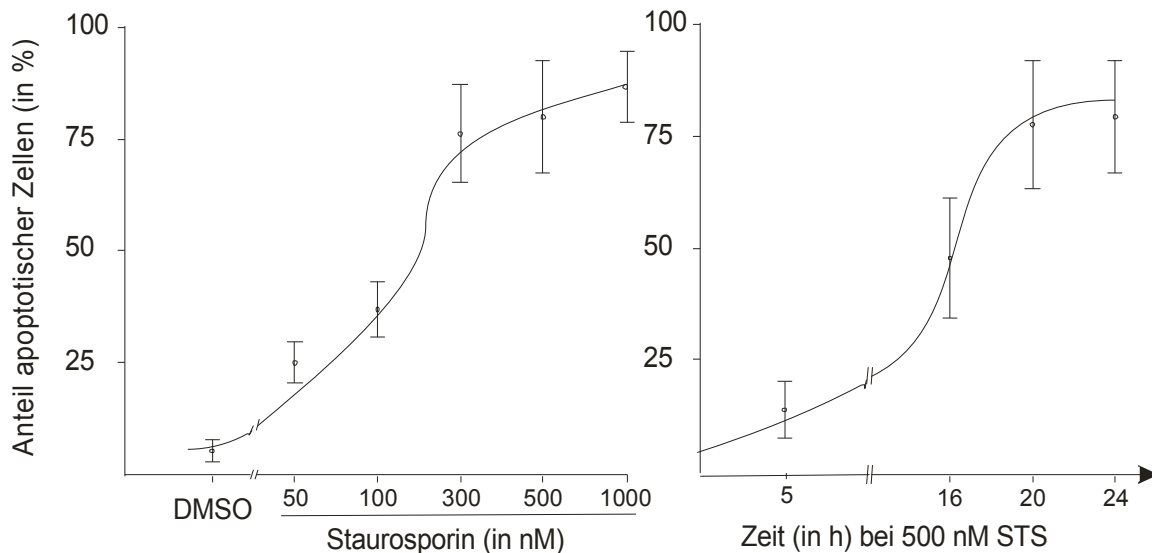


Abbildung 17: Vorversuch zur Induktion der Apoptose in MCF-7-Zellen mittels Staurosporin

Die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen (links) Staurosporin stimuliert und dann ausgewertet. Für die Zeitreihe (rechts) fand eine Konzentration von 500 nM Anwendung (n=2).

Bei der Aktivierung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 durch CXCL12 und CXCL11 unter dem Einfluss von Staurosporin ist zu beobachten, dass der Einfluss von CXCL12 auf die Apoptoserate höher ist, als der von CXCL11. (Abb. 18) CXCL12 senkte die Rate bei einer Konzentration von 1 nM von 36,9% ($\pm 6,2\%$) auf 25,9% ($\pm 14,3\%$), bei 5 nM stabilisierten sich die Werte auf 25,4% ($\pm 7,8\%$). Der Einfluss von CXCL11 erbrachte ebenfalls eine leichte Senkung auf 35,3% ($\pm 3,1\%$) bei 1 nM, aber eine signifikante Absenkung auf 28,3% ($\pm 2,3\%$) bei einer Konzentration von 5 nM.

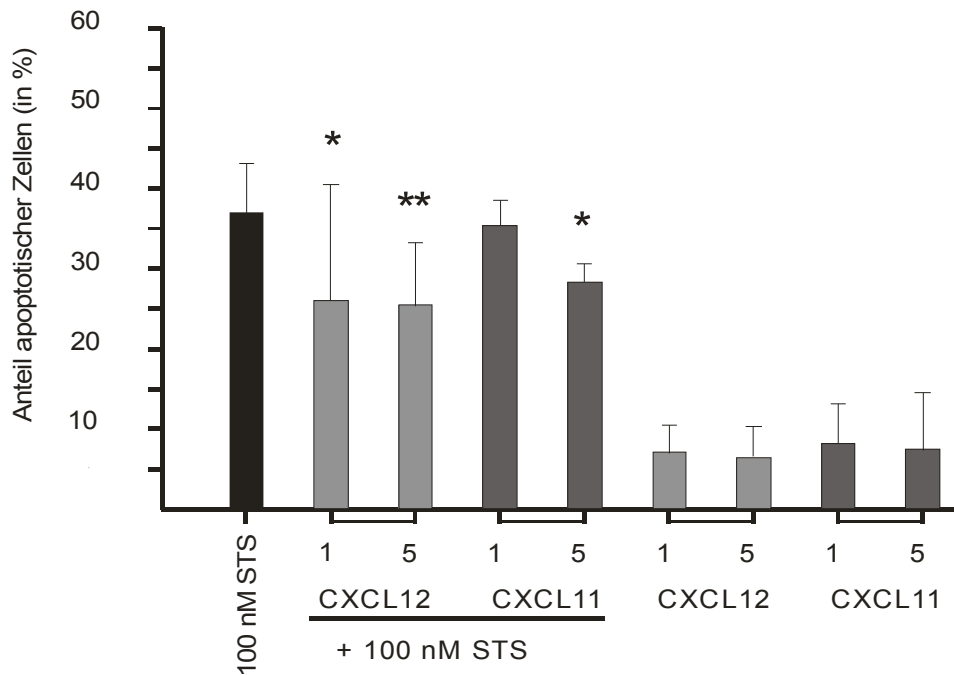


Abbildung 18: Stimulation von MCF-7-Zellen für 24h mit Staurosporin und Inhibitoren

Die Cytokine CXCL12 (SDF-1) und CXCL11 (I-TAC) wurden mit einer Konzentration von 1 und 5 nM dazugegeben. Es ist sowohl bei CXCL11, als auch bei CXCL12 eine Abnahme der Apoptoserate messbar. (n=3-5).

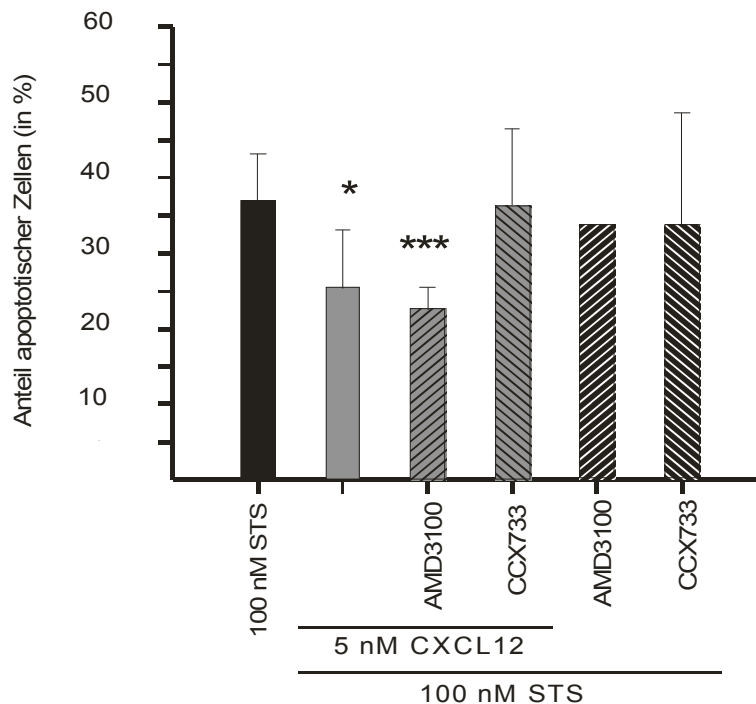


Abbildung 19: Apoptosebeeinflussung durch AMD3100 und CCX733 unter 5 nM CXCL12 und 100 nM Staurosporin

Die Zellen wurden für 24 h und mit den Chemokinrezeptor-Liganden AMD3100 (5 μ M) und CCX733 (100 nM) unter der permanenten Anwesenheit von 5 nM CXCL12 und 100 nM Staurosporin stimuliert.

Die Ausgangs-Apoptoserate von 36,9% ($\pm 6,2\%$) nach 24 Stunden ließ sich in diesem Versuch durch die Zugabe von AMD3100 (5 μM) signifikant auf 22,6% ($\pm 2,9\%$) senken. CCX733 (100 nM) hatte mit einer Apoptoserate von 33,6% ($\pm 14,9\%$) keinen Einfluss. Ebenso wenig hatten AMD3100 und CCX733 einen direkten Einfluss auf die Apoptose ohne die Anwesenheit von CXCL12 (siehe Abbildung 19).

Es zeigte sich, dass sowohl CXCR4 als auch CXCR7 chemisch induzierte Apoptose inhibieren. Die CXCL12 induzierte Apoptosereduktion kann durch den selektiven CXCR4-Antagonisten AMD3100 nicht inhibiert werden. Der CXCR7-Antagonist CCX733 inhibiert aber CXCR7 deutlich besser und führt zu einer erhöhten Apoptoserate.

4.5.2. Apoptosemessung mittels Caspase 3

Zusätzlich erfolgte zur Sicherung der Ergebnisse nach Nicoletti die Messung der Caspase 3/7 -Aktivität zur Bestimmung der Apoptose. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass auch beginnende Apoptosestadien mittels einer enzymatischen Methode gemessen werden.

Die Fluoreszenz der Caspaseaktivität wurde nach vier bis acht Stunden gemessen ($\lambda_{\text{ex}}=360$ nm, $\lambda_{\text{em}}=460$ nm) und der Maximalwert von Staurosporin 100% gesetzt.

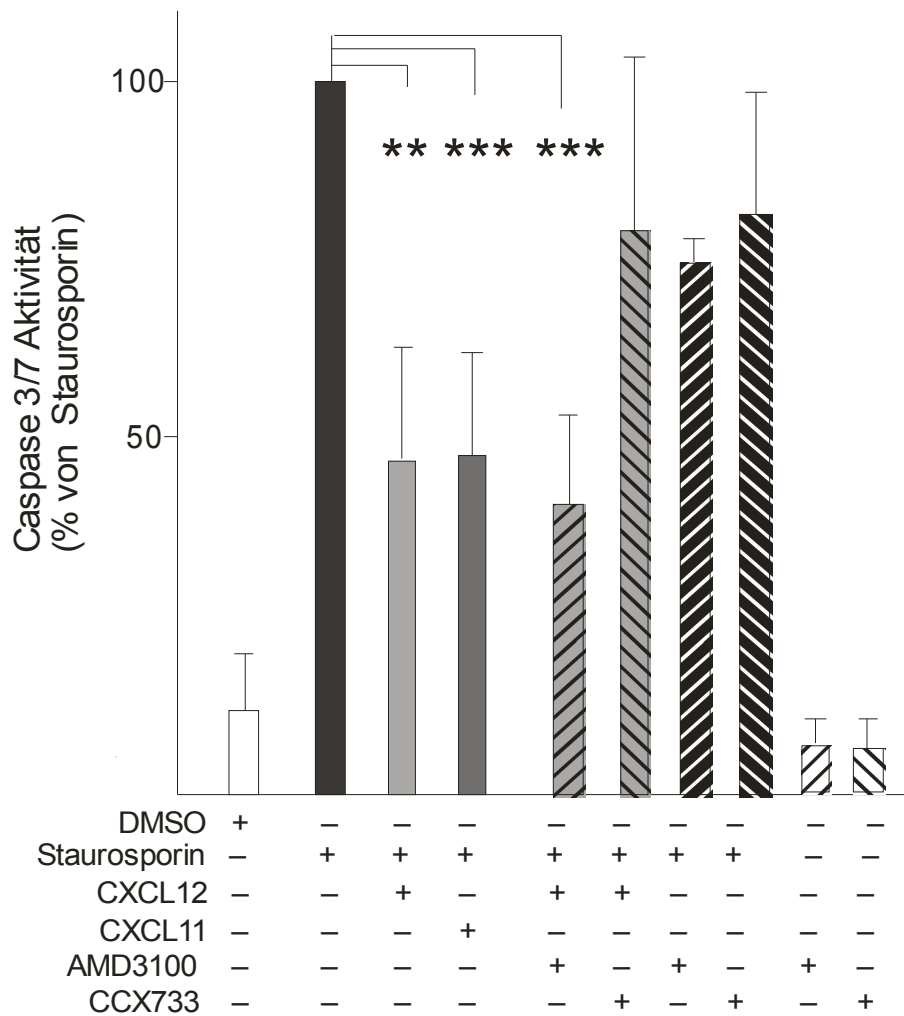


Abbildung 20: Inhibition der STS-induzierten Apoptose durch CXCL11 und CXCL12

Beide Liganden inhibieren die Apoptose. CCX733 kann als selektiver Antagonist diese Wirkung im Gegensatz zu AMD3100 aufheben.

Die als Referenz gemessene und auf 100% gesetzte Caspase 3/7 -Aktivität von Staurosporin wurde durch CXCL12 auf 46,7% ($\pm 17,5\%$) und durch CXCL11 auf 47,5% ($\pm 15,6\%$) inhibiert (siehe Abbildung 20). Die zusätzliche Stimulation mit CXCL12 und AMD3100 inhibierte die Caspase-3/7-Aktivität ebenfalls signifikant auf 40,8% ($\pm 15,8\%$). Bei der Stimulation durch CXCL12 und CCX733 wurde die Caspase-3/7-Aktivität mit 79,1% ($\pm 26,1\%$) hingegen fast gar nicht beeinflusst. Die selektiven Inhibitoren haben allein keinen Einfluss auf die Apoptoseinhibition. Es zeigt sich durch diesen Versuch auch, dass beide Rezeptoren die Caspase-3/7-Aktivität inhibieren und in einem engen Verhältnis stehen. Die Wirkung von CXCL12 kann auch in diesem Versuch durch CCX733 nahezu komplett aufgehoben werden.

4.5.3. Apoptosenachweis durch Cytochrom C-Freisetzung

Cytochrom C spielt als Elektronentransporter in der Atmungskette eine besondere Rolle und nimmt ebenfalls eine wichtige Stellung in der Apoptose ein. Deshalb sollte über die Bestimmung von zytosolischem Cytochrom C eine Validierung der Ergebnisse nach Nicoletti erfolgen. Dafür wurden die Zellen stimuliert und in PBS abgekratzt. Nach einer Zentrifugation bei 500x g für fünf Minuten bei 4°C wurde das Zellpellet nach Entfernung des PBS resuspendiert. Die Suspensionslösung bestand aus 10 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, 1 mM EGTA und 250 mM Saccharose. Die Zellen wurden durch „Pottern“ und anschließendes Auf- und Abziehen in einer feinen Nadel lysiert und danach bei 7000x g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet beinhaltet die Mitochondrien und der Überstand das Zytosol. Es folgte die Proteinbestimmung und Aufbereitung für Western Blot wie oben beschrieben. Der Primärantikörper war mouse- α -Cyt C in einer Verdünnung von 1:250. Als Sekundärantikörper wurde 1:30000 verdünntes rabbit- α -mouse verwendet.

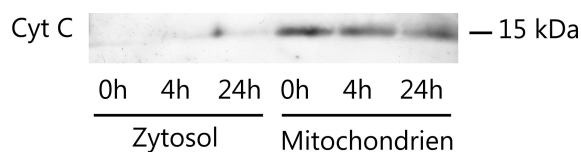


Abbildung 21: Western Blot auf Cytochrom C in Zytosol und Mitochondrien nach Stimulation mit 100 nM STS für 4 und 24 Stunden.

Es ist eine Abnahme von mitochondrialem Cytochrom C zu verzeichnen und eine Zunahme von Cytochrom C im Zytosol.

Wie in Abbildung 21 zu sehen nimmt mit zunehmender Stimulationszeit mit 100 nM Staurosporin das mitochondriale Cytochrom C ab. Nach 24 Stunden ist ebenfalls ein leichter Anstieg von zytosolischem Cytochrom C zu verzeichnen. Allerdings ist der Anstieg von zytosolischem Cytochrom C so gering, dass er nicht für Regulationsversuche ausreicht.

4.5.4. Apoptosenachweis mittels P53, P21, BAX und BCL-2

Die Versuche zur Apoptose mit Nicoletti sollten nun mit einer anderen Methode gegenkontrolliert werden. Dazu wurde der Nachweis der oben genannten Gene erwogen. Da die Steuerung des Zellzyklus unter anderem durch P53 geregelt wird und dieser als Transkriptionsfaktor den Inhibitor der cyclin-abhängigen-Kinasen P21 induziert, schien ein Nachweis dieser Proteine mittels real-time

PCR geeignet. Die durch P53 aktivierten Gene BAX und BCL-2 waren ebenfalls von Interesse, da BAX pro-apoptotische Eigenschaften hat und gleichzeitig die Aktivität vom Apoptose-Suppressor-Gen BCL-2 reduziert. Die Zellen wurden nach ihrer Stimulation lysiert und ihre mRNA in cDNA umgeschrieben. Nach der Bestimmung des cDNA-Gehalts erfolgte die real-time PCR im ABI Prism-7700 SDS.

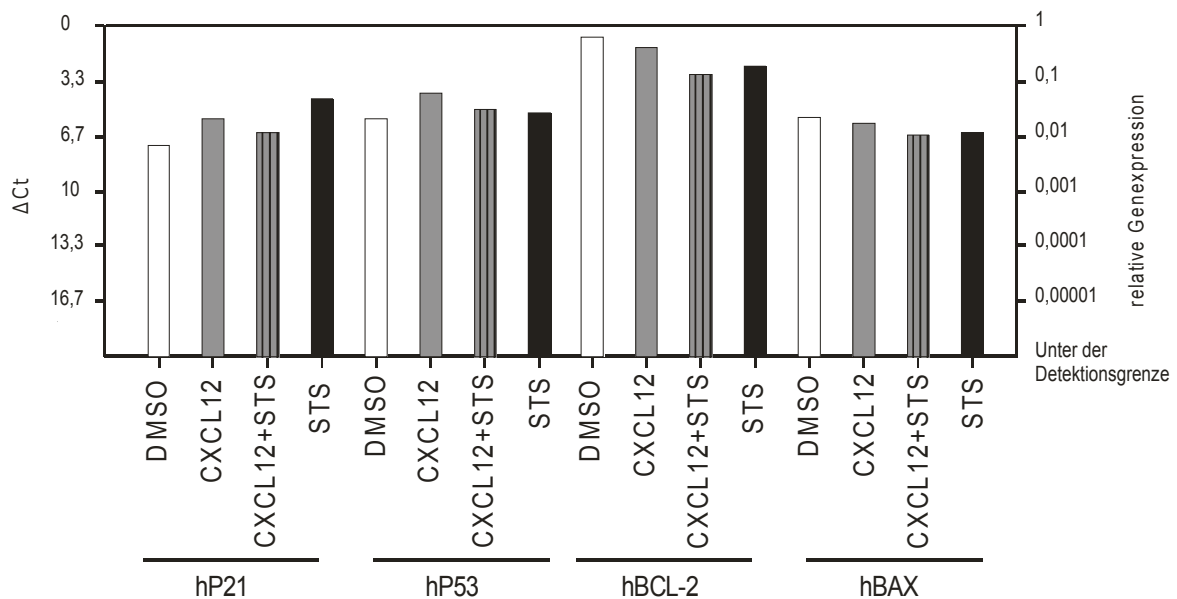


Abbildung 22: Nachweis von P21, P53, BAX und BCL-2 nach Staurosporinstimulation und 5 nM CXCL12

Nach 24-stündiger Stimulation mit Staurosporin und CXCL12 wurde mittels real-time-PCR die relative Genexpression ausgewertet.

P53 und P21 wurden in den MCF-7-Zellen exprimiert. Die relative Genexpression unterschied sich bei P53 allerdings zwischen stimulierten Zellen mit ΔCt -Werten von 3,9 für Staurosporin und 4,4 für Staurosporin und CXCL12 und der DMSO-Kontrolle mit 4,6 nicht. Bei P21 war die Genexpression in der Kontrolle mit einem ΔCt -Wert von 7,6 geringer als in den mit Staurosporin stimulierten Zellen, die einen ΔCt -Wert von 4,3 ergaben. Dieser Unterschied war im Vergleich zu Staurosporin und CXCL12 mit einem Wert von 6,6 allerdings nicht groß genug, um verlässliche Aussagen zu treffen.

Der Nachweis vom Apoptose-Suppressor-Gen BCL-2 in den Zellen ergab, dass am meisten in der Kontrolle mit DMSO exprimiert wurde. Allerdings sind die Unterschiede zu den stimulierten Zellen mit CXCL12 und Staurosporin marginal (siehe Abbildung 22). CXCL12 mit Staurosporin hat einen ΔCt -Wert von 2,8 und Staurosporin von 2,6. Ebenso verhält es sich mit BAX. BAX wird zwar insgesamt etwas geringer exprimiert (ΔCt -Wert von 5,5 bei DMSO), doch auch hier waren

keine Unterschiede zu den stimulierten Zellen mit Staurosporin (ΔCt -Wert = 6,7) und Staurosporin und CXCL12 (ΔCt -Wert = 6,8) zu ermitteln. Aus diesen Gründen wurde ein Apoptosenachweis mit diesen Genen nicht weiter verfolgt.

5. Diskussion

Der Rezeptor CXCR4 ist einer der am weitesten verbreiteten Chemokinrezeptoren mit einer Expression in einer Vielzahl von Tumorarten. Seine Rolle bei der Zellinvasion, der Metastasierung, dem Überleben und der Proliferation wurde mehrfach gezeigt [Müller et al., 2001; Zlotnik et al., 2011]. Beim 2006 entdeckten zweiten Rezeptor CXCR7 für den Liganden CXCL12 zeichnet sich die biologische Bedeutung und Ausprägung in Tumorzellen noch nicht gänzlich ab [Burns et al., 2006; Hattermann et al., 2010; Miao et al., 2007]. Es gibt relativ wenige und gelegentlich widersprüchlich publizierte Ergebnisse zur Interaktion von CXCR4 und CXCR7. Nach der Entdeckung der Co-Expression beider Rezeptoren auf einigen Tumorzellarten, zum Beispiel in bestimmten Brustkrebszellen, in Endothelzelltumoren und Makrophagen, ist das Interesse für diese Rezeptoren gestiegen [Hattermann et al., 2010; Heinrich et al., 2012]. Die Untersuchung von CXCR4 und CXCR7 am Modell der MCF-7-Zellen erschien aufgrund einer gleich starken Expression folgerichtig. Die biologischen Effekte wurden mit den Liganden CXCL12 und dem CXCR7-spezifischen Liganden CXCL11 untersucht, des Weiteren fanden die selektiven Antagonisten AMD3100 und CCX733 Verwendung. CCX733 ist ein sehr kleines Molekül und bindet an CXCR7. Es inhibiert den Einfluss von CXCL12 und CXCL11 auf diesen Rezeptor, beeinflusst allerdings nicht die Bindungsfähigkeit von CXCR4 [Hartmann et al., 2008].

AMD3100 gehört zur Arzneistoffgruppe der Bicyklamine und ist unter dem Markennamen Plerixafor[®] als CXCR4-Hemmer zugelassen (siehe Abbildung 23). Es wurde ursprünglich als Anti-HIV-Mittel entwickelt und wird in Kombination mit G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) zur Freisetzung von haematopoietischen Stammzellen aus dem Knochenmark eingesetzt [Flomenberg et al., 2005]. Dies geschieht vor allem bei Patienten mit Multiplem Myelom und Non-Hodgkin-Lymphom [Liles et al., 2003]. AMD3100 war der erste nicht-peptidale Inhibitor von CXCR4 [Bridger et al., 1995] und bindet an die Bindungstasche von CXCR4 zwischen den Transmembrandomänen IV, VI und VII [Gerlach et al., 2001; Wong et al., 2008]. Die Sensitivität von Multiplen Myelomen und Leukämie auf die cytotoxischen Effekte der Chemotherapie wird durch AMD3100 erhöht. [De Clercq, 2009]

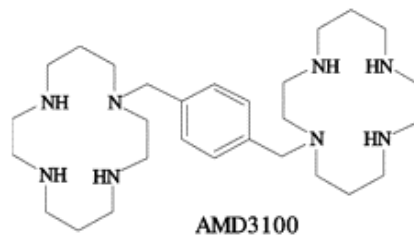


Abbildung 23: Chemische Struktur von AMD3100 [Wong et al., 2008]

5.1. CXCR4 und CXCR7 vermittelte Signaltransduktion und die Rolle von β -Arrestin

Chemokinrezeptoren bestehen aus 340-370 Aminosäuren, mit einem in den Extrazellulärraum gerichteten N-Terminus. Die sieben Helix-Transmembrandomänen weisen je drei hydrophile intra- und extrazelluläre Schleifen auf. Der C-Terminus befindet sich intrazellulär mit Serin- und Threoninresten. Diese dienen als Phosphorylierungsstellen während der Rezeptor-Regulation [Allen et al., 2007]. Die Rezeptor-Regulation läuft mittels einer Phosphorylierung des C-Terminus, welcher die Bindung von β -Arrestin und die Clathrin-/Caveolin-abhängige Internalisierung unterstützt [Canals et al., 2012]. Bei der Stimulation von CXCR4 mit CXCL12 kommt es zu einer Dissoziation der $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ - Untereinheit, welche dann weitere Effektoren aktiviert [Busillo and Benovic, 2007; Thelen and Thelen, 2008]. Das DRY-Motiv (DRYLAIV) in der zweiten intrazellulären Schleife scheint für die G-Proteinbedingte Signalübertragung von Bedeutung zu sein. Anders als bei CXCR4 fehlt diese Domäne bei CXCR7. CXCR7 arbeitet nicht über typische G-Proteinabhängige Signalwege [Sierro et al., 2007]. Deshalb nahm man fälschlicherweise an, dass CXCR7 ein DECOY-Rezeptor ist, der den CXCL12-Spiegel reguliert [Naumann et al., 2010]. Neuere Studien zeigen allerdings, dass CXCR7 über den alternativen β -Arrestin-Weg arbeitet.

β -Arrestin ist ebenfalls an der Internalisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beteiligt. β -Arrestin1/2 aus Arrestin 2 und 3 reguliert zum Beispiel den β 2-adrenergen Rezeptor [Lohse et al., 1990]. Arrestin 1 und 4 sorgen hingegen in den Zapfen und Stäbchen der Retina für die Regulation von Rhodopsin. β -Arrestin wurde als Adaptor der clathrinabhängigen Endozytose [Claing et al., 2002; Marchese et al., 2003] mit einer Vielzahl an Signalmolekülen beschrieben [Goodman et al., 1996].

β -Arrestin desensibilisiert 7-Transmembranrezeptoren durch eine räumliche Verdrängung der G-Proteine [Attramadal et al., 1992; Benovic et al., 1987]. In der

Endozytose ist β -Arrestin ein Verbinder zwischen den Endozytosemechanismen und dem Rezeptor. Unter anderem arbeitet es mit der G-Protein-gekoppelten-Rezeptorkinase im Falle von Clathrin [Goodman et al., 1996] zusammen. Es besteht die Möglichkeit der Interaktion mit der Proteinkinase C zur Clathrin-gekoppelten Endozytose.

β -Arrestine binden aber auch die Ligase MDM2 und regulieren somit den Tumor-Suppressor p53 [Shenoy and Lefkowitz, 2003; Shenoy et al., 2001]. Wie in der Arbeit von Marchese et al. gezeigt, ist β -Arrestin jedoch nicht für die Endozytose von CXCR4 zuständig [Marchese and Benovic, 2001].

Rezeptoren interagieren bei der Endozytose unterschiedlich [Oakley et al., 2000]. Man unterscheidet in zwei Gruppen. Gruppe A bindet eher β -Arrestin2 und ist zum Beispiel ein β_2 -Arrestin-Rezeptor. Er bindet β -Arrestin, geht zu den Coated-Pits und dissoziiert dann weg. Das bedeutet, der Rezeptor internalisiert ohne β -Arrestin. Zu Gruppe B gehören unter anderem der Angiotensin-II- und der V_2 -Vasopressin-Rezeptor. Diese binden β -Arrestin fester und internalisieren zusammen. Das bedeutet zum einen eine langsamere Wiederverwertung des Rezeptors, zum anderen eine Bindung von mehr β -Arrestin.

Molekülchimären transferieren hierbei häufiger zur Gruppe B als zur Gruppe A. Es stellt sich die Frage, was CXCR7 für ein Rezeptor ist, da bei einer Aktivierung des V_2 -Vasopressin-Rezeptors dieser die Internalisierung vom β_2 -Arrestin-Rezeptor verhindert und somit Gruppe-B-Rezeptoren einen Einfluss auf Gruppe-A-Rezeptoren haben [Shenoy and Lefkowitz, 2003].

Für β -Arrestin wurde auch der MAP-Kinase-Signalweg beschrieben. β -Arrestin2 ist hierbei ein Gerüst der Aktivierung von MAP-Kinasen wie Erk1/2 [Luttrell et al., 2001]. Dabei hält β -Arrestin2 die aktivierten MAP-Kinasen wahrscheinlich über die Phosphorylierung von zytosolischen Substraten im Zytoplasma. Koordinierend inhibiert β -Arrestin2 auch die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, durch eine Inhibition der Erk-abhängigen-Transkription [Tohgo et al., 2002]. Diese Funktion ist assoziiert mit der Anwesenheit von Leucin-reichen Export-Signalen am C-Terminus von β -Arrestin2, nicht aber an β -Arrestin1. Die oben genannten Gruppe-B-Rezeptoren sind effektivere Aktivatoren des β -Arrestin-gestützten MAP-Kinase-Signalwegs als Gruppe-A-Rezeptoren [Tohgo et al., 2003]. Das bedeutet, dass eine Veränderung im C-Terminus bei Chimären eine Veränderung in den Bindungs- und Transiteigenschaften [Oakley et al., 2001] sowie in der MAP-Kinase-Aktivierung nach sich zieht.

Es wurden aber keine aufeinanderfolgende Aktivierungen des „normalen“ Gi-Protein-Signalweges und des β -Arrestin-Weges beschrieben [Lefkowitz and Whalen, 2004]. Viele aktive Rezeptorkonformationen können allerdings zu einer unterschiedlichen Aktivierung von G-Proteinen und β -Arrestin führen [Kenakin, 2003].

Wie in dieser Arbeit gezeigt, funktioniert der Signalweg über CXCR4 und CXCR7 auch, wenn man ihn durch PTX inhibiert. Das Toxin von *Bordatella pertussis* ist mit einer Größe von 105 kDa sehr groß und mit fünf Untereinheiten (S1-S5) sehr komplex. Es ist Mitglied der Familie der ADP-Ribosyltransferase-Toxine [Katada and Ui, 1982]. In seinem Aufbau ist PTX ein AB₅-Toxin. Der A-Teil besteht nur aus der S1-Untereinheit. Dieser größte Teil ist enzymatisch aktiv und hat in regionalen Sequenzen eine Ähnlichkeit mit dem Cholera Toxin [Locht and Keith, 1986]. Der B-Teil ist ein Pentamer, bestehend aus den Untereinheiten S2 bis S5. Er ist zuständig für die Bindung von PTX an die oberflächlichen Rezeptoren der Zielzellen [Tamura et al., 1982]. Als erstes Substrat dieses Toxins wurde die α -Untereinheit von Gi-Proteinen beschrieben [Bokoch et al., 1983]. Nach und nach wurden auch andere G-Proteine als Ziele von PTX erkannt. Die α -Untereinheit ist der GTP-bindende Regulator der Adenylatcyclase. Das bedeutet, dass sich bei verringerter Adenylatcyclase-Aktivität der cAMP-Spiegel erhöht und zelluläre Prozesse behindert. Dieser PTX-induzierte Anstieg ist der Ursprung der meisten Pathologien bei einer Infektion mit *Bordatella pertussis*. Im Falle von CXCR4 blockieren ebenso die B-Untereinheiten, da sie für Chemokine von Bedeutung sind. CXCL12 kann nach einer Inkubation mit PTX keinen Effekt mehr ausüben [Schneider et al., 2009].

Wie in anderen Studien gezeigt, hat CXCR7 die Fähigkeit, den CXCR4-Signalweg durch die Bildung von CXCR4-CXCR7-Komplexen zu verändern, kann dabei aber keinen Einfluss auf die Aktivität von CXCL12 auf CXCR4 ausüben [Levoye et al., 2009]. Als weiteres Beispiel kann man die aktivierenden Effekte auf die Proliferation bei Pankreaskrebszellen anführen, die ebenfalls CXCR4 und CXCR7 co-exprimieren [Heinrich et al., 2012].

5.2. Einfluss von CXCL11 und CXCL12 auf die Internalisierung

Durch die native immunzytochemische Markierung der Zellen konnten wir sowohl in der Fluoreszenz-, als auch in der Elektronenmikroskopie den Nachweis erbringen, dass die Rezeptoren an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Dies

widerspricht Publikationen, welche eine Immunzytochemie an fixierten Zellen durchführten [Luker et al., 2010; Ray et al., 2012]. Bei diesen war CXCR7 intrazellulär lokalisiert, was bei der Publikation von Luker et al., 2010 unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass die Zellen vor der Fixierung mit Formaldehyd für 30-60 Minuten inkubiert wurden. In dieser Zeit haben die Rezeptoren demnach eine Internalisierung vorgenommen. Eine Färbung von CXCR7 ohne Inkubation wurde nicht vorgenommen. Andere Publikationen bestätigen aber die oberflächliche Lokalisation von CXCR7 [Hattermann et al., 2012; Kumar et al., 2012]. Es lässt sich noch anmerken, dass die Elektronenmikroskopie durch die höhere Vergrößerung eine bessere Detailbeurteilung als die Immunzytochemie erlaubt. Die Markierung von ruhenden Zellen bei 4°C, ohne Internalisierung, mit Antikörpern zeigte in beiden Verfahren eine Oberflächenlokalisierung der Chemokinrezeptoren. Des Weiteren konnten wir sowohl mit der Immun- als auch mit der Elektronenmikroskopie nachweisen, dass beide Rezeptoren nach einer Stimulation zügig und in engem Kontakt internalisieren. Unsere Ergebnisse passen damit zu denen mittels Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) an HEK-293-Zellen zusammen. Diese Experimente machten eine Heterodimerisierung von CXCR4 und CXCR7 deutlich [Levoye et al., 2009]. Die Stimulationen mit den rezeptorspezifischen Antagonisten AMD3100 und CCX733 endeten ebenfalls in einer Co-Internalisierung des Rezeptors.

5.3. Steuerung der Migration mittels CXCL11 und CXCL12

Die Untersuchung der Migration erscheint bei der Betrachtung von Chemokinen als obligat, da Sie aufgrund ihres Namens schon mit chemotaktischen Eigenschaften vergesellschaftet sind. Der Chemotaxisversuch mittels Wundheilungstest (Scratchtest) wird normalerweise für die ungerichtete Zellwanderung in einem Spalt genutzt. Bedingung dafür ist allerdings das Wachsen in einem konfluenten Zellrasen.

Die gerichtete Zellwanderung wurde in einer Boyden-Kammer untersucht. Hierbei wurde ein Porendurchmesser von 5 µM verwendet, was bei einer Zellgröße von 10-15 µM klein ist, aber auch sicherstellt, dass keine ungerichtete Zellwanderung stattfindet. Das wenig invasive Verhalten der MCF-7-Zellen war dafür ebenfalls von Vorteil [Kousidou et al., 2005].

Das Versuchsprotokoll sollte sich auch in soweit im Porendurchmesser

unterscheiden, als dass andere Publikationen einen Durchmesser von 12 μM verwendeten [Altenburg et al., 2007]. Dies erhöht aber die Wahrscheinlichkeit einer ungerichteten Zellwanderung.

Bisher ging man davon aus, dass eine Chemotaxissteuerung nur über CXCR4 funktioniert. Ein migrationsfördernder Effekt bei der Ausbildung von Lungenmetastasen wurde allerdings für CXCR7 mit CXCL12 im Tiermodell an immunkompetenten Mäusen nachgewiesen [Miao et al., 2007]. Auch die Invasivität von Prostatakarzinomen ist durch CXCR7 erhöht [Wang et al., 2008].

Die direkte Aktivierung von CXCR7 durch CXCL11 induziert einen Migrationseffekt. Dieser ist allerdings nicht so stark wie die Ansteuerung beider Rezeptoren durch CXCL12. Sowohl AMD3100 als auch CCX733 senkten die migrationsfördernde Eigenschaft von CXCL12.

CXCR4 und CXCR7 sind als Heterodimere also funktionell bedeutender, als als eigenständige Rezeptoren.

5.4. Antiapoptotische Effekte durch CXCR4 und CXCR7?

Die Effekte von CXCR7 auf die Apoptose wurden bisher an Glioblastomzelllinien untersucht und der Rezeptor als Mitverursacher für antiapoptotische Eigenschaften identifiziert [Hattermann et al., 2010]. Da diese Zellen allerdings kein CXCR4 exprimieren, lag die Untersuchung der Interaktion beider Rezeptoren in dieser, für das Überleben des Tumors wichtigen Eigenschaft nah.

Die Apoptoseversuche wurden mit dem Mittel Staurosporin ausgeführt, welches sich für Brustkrebszellen zur Induktion einer Apoptose bewährt hat [Mooney et al., 2002]. Staurosporin inhibiert Proteinkinase A, C und G sowie CaM-Kinase und die Myosin-Leichtkettenkinase. Durch die Hemmung der Proteinkinase A können die Transkriptionsfaktoren CREB nicht aktiviert werden und die Zelle beugt eine intern induzierte Apoptose.

Die Apoptose kann durch mindestens zwei Wege ausgelöst werden. Zum Einen durch Rezeptoren mit Todesdomänen (TNF-R, Fas-R), zum Anderen durch die Schädigung von Mitochondrien, Radikalen, DNA-Schäden und Hypoxie. Bei beiden Prozessen spielen Caspasen eine entscheidende Rolle. Caspasen sind **Cystein-Proteasen**, die hinter **Aspartat** schneiden und in der gesunden Zelle als Procaspase vorliegen, so dass sie nur noch durch Proteolyse aktiviert werden müssen. Hauptregulator bei DNA-Schäden ist P53 [Bohlig and Rother, 2011] mit P21 [Pang et al., 2011]. P53 induziert P21 als Transkriptionsfaktor [El-Deiry et al.,

1993]. P21 ist ein Cyclin-abhängiger-Kinase (CDK)-Inhibitor [Löhr et al., 2003]. Cyclin-abhängige-Kinasen wie CDK2, CDK4 und 6 phosphorylieren das Retinoblastom-Protein pRb in der G1/S-Phase und führen dadurch zur Bindung des Transkriptionsfaktors E2F. Dieser wird zum Fortführen des Zellzyklus benötigt [Bohlig and Rother, 2011].

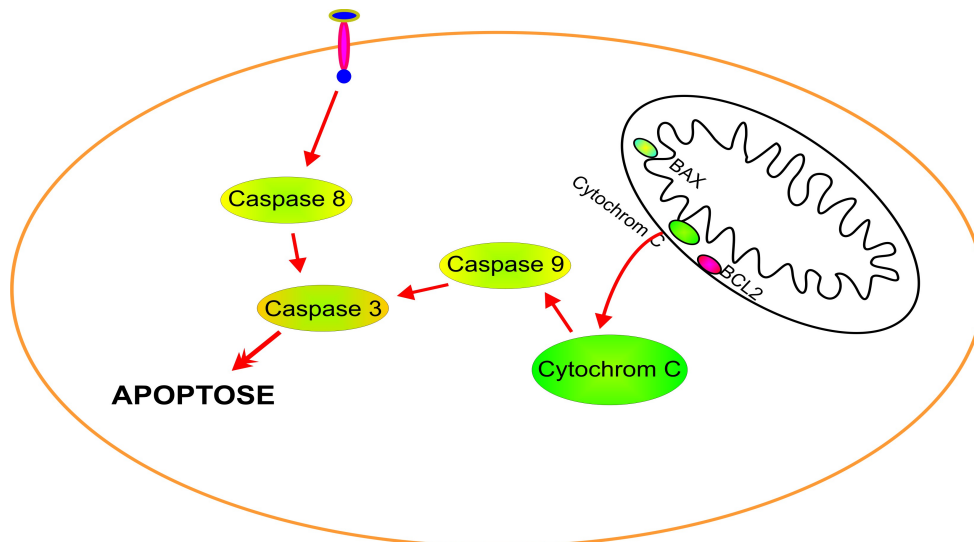


Abbildung 24: Beeinflussung der Apoptose durch Caspasen und Cytochrom C

Bei der externen Induktion aktiviert der Rezeptor Caspase 8 und diese dann Caspase 3. Durch Cytochrom C aus dem Mitochondrium wird Caspase 9 aktiviert und dann Caspase 3. Caspase 3 übernimmt letztlich die Zerstörung der Zelle.

Es gibt Effektorcaspasen wie Caspase 3/7, die die geordnete Zerstörung der Zelle durch Zerlegung der Kernstruktur, des Zytoskeletts und der Zellzykluskontrolle übernehmen (siehe Abbildung 24). Die Adaptorcaspasen aktivieren die Effektorcaspasen. Wichtigste Vertreter sind hier die Caspasen 8 und 9.

Auf mitochondrialer Ebene spielt das Cytochrom C eine bedeutende Rolle. In der gesunden Zelle hat Cytochrom C die Rolle eines Elektronentransporters zwischen Komplex III und IV der Atmungskette. Es sitzt an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran und wird nach der Apoptose ins Zytosol abgegeben. Dort aktiviert es die Caspase 9 und diese als Adaptorcaspase dann Caspase 3. P53 sorgt hierbei für eine frühe Freisetzung von Cytochrom C über die Proteine BAX und BCL-2. BAX wird direkt transkriptional durch P53 aktiviert [Miyashita and Reed, 1995] und hat pro-apoptotische Eigenschaften, da es die Freisetzung von Cytochrom C fördert. Des Weiteren reduziert BAX die Aktivität vom Apoptose-Suppressor-Gen BCL-2 [Miyashita et al., 1994]. Dieses sitzt an

der äußeren Mitochondrienmembran, verhindert die Freisetzung von Cytochrom C und ist deshalb in Tumorzellen in großer Zahl vorhanden. Das bedeutet, Bax und BCL-2 sind Gegenspieler in der Regulation von Leben und Tod der Zelle, wobei BCL-2 die Apoptose verhindert und BAX den Vorgang beschleunigt [Reed, 1994]. P53 ist in über der Hälfte aller humanen Tumoren inaktiviert und spielt damit eine besondere Rolle in der Tumorphagenese [Hollstein et al., 1991]. Aufgrund der Funktionsweise wurde im Rahmen dieser Arbeit die Apoptose mithilfe von P53, P21, BAX, BCL-2, Cytochrom C, Caspase 3/7 und morphologisch untersucht. Als ausreichend beurteilbar wurden hierbei aber nur die morphologische Methode nach Nicolletti und die Messung von Caspase 3/7 für die Ergebnisse herangezogen. Es zeigte sich, dass CXCR4 und CXCR7 die chemisch induzierte Apoptose inhibieren. Die CXCL12 induzierte Apoptosereduktion kann durch AMD3100 nicht inhibiert werden. Der CXCR7-Antagonist CCX733 inhibiert aber CXCR7 und führt zu einer erhöhten Apoptoserate.

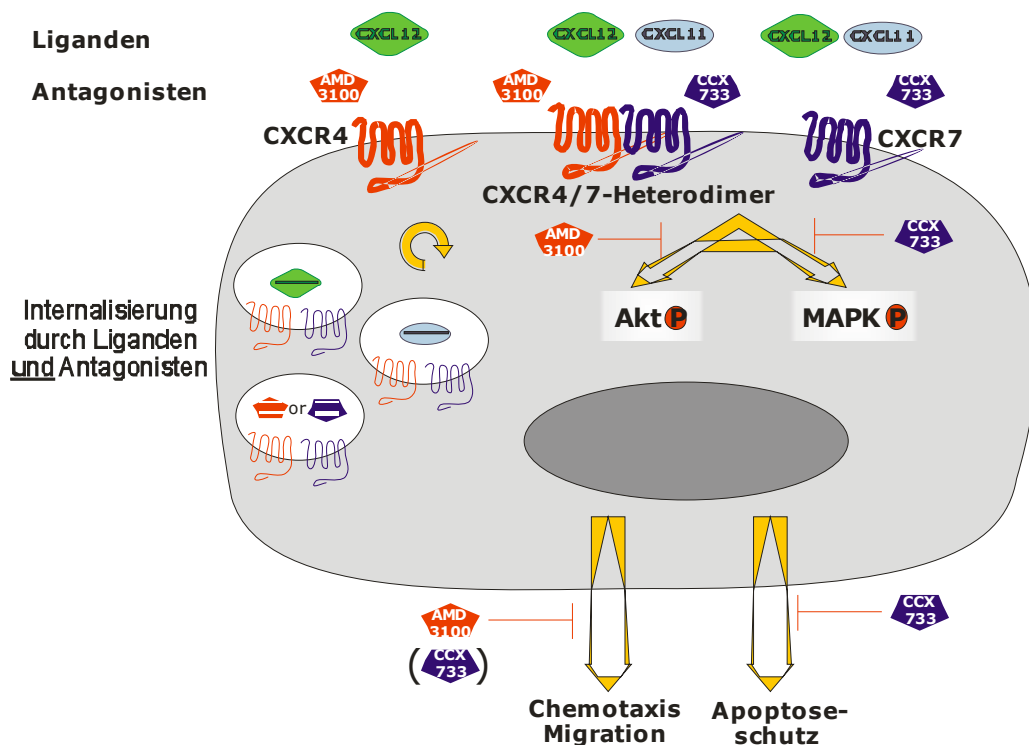


Abbildung 25: Zusammenfassung der Interaktion von Rezeptoren, Liganden und Antagonisten. (Grafik: Kirsten Hattermann)

Die durch CXCL11 und CXCL12 vermittelten antiapoptotischen Effekte werden fast ausschließlich vom selektiven CXCR7-Antagonisten CCX733 aufgehoben. AMD3100 hingegen hat durch seine reine Beziehung zu CXCR4 keinen Einfluss.

Das bedeutet, dass beide Rezeptoren sich zwar beeinflussen, der Effekt von CXCR7 in der Apoptose aber deutlich stärker ist.

Die Heterodimerisierung von CXCR4 und CXCR7 hat Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung, Signaltransduktion und Chemotaxis (siehe Abbildung 25). Die Apoptose ist in Teilen abhängig vom Zusammenspiel beider Rezeptoren, doch die antiapoptotischen Effekte von CXCR7 überwiegen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, findet auch eine Beeinflussung der pharmakologischen Eigenschaften der spezifischen Inhibitoren AMD3100 und CCX733 statt.

5.5. Ausblick

Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 haben einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum von Tumoren. Für CXCR4 sind diese Effekte zumindest im Tiermodell erwiesen. Der nächste Schritt wären Untersuchungen beider Rezeptoren, die über *in vitro* Versuche hinausgehen.

Durch die Arbeit mit wenigen Liganden liegt in der Forschung zwingenderweise immer nur ein bestimmter Aspekt im Blick. In allen Bereichen der Chemokineffekte ist aber eine Vielzahl an Mechanismen beteiligt und die daraus resultierenden Abläufe sind meist zu komplex, um sie auf vereinfachte Modelle zu übertragen.

Die Entwicklung neuer Liganden für Chemokinrezeptoren, durch die Arbeitsgruppe der Nuklearmedizin der Technischen Universität München um Prof. Wester, mit der Detektionsfähigkeit durch molekularmedizinische Verfahren, ist ein wichtiger Schritt, um die Forschung auch klinisch relevant zu machen. Diese Liganden wurden als Gallium-Verbindungen teilweise schon klinisch verwendet und sollten nun *in vitro* auf ihre Bindungsfähigkeit an verschiedene Tumorlinien und die daraus resultierenden Effekte untersucht werden. Die generelle Übertragung von Ergebnissen einer Tumorform auf andere sollte jedoch vermieden werden, da es, wie in dieser Arbeit gezeigt, durch die Bildung von Rezeptor-Heterodimeren zu einem unterschiedlichen Verhalten kommen kann. Eine spezifische Markierung von Tumoren *in vivo* wäre jedoch sowohl für die Diagnostik von Tumoren und Metastasen als auch für die Krebstherapie ein Fortschritt um nebenwirkungsärmer behandeln zu können.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 auf verschiedene Eigenschaften wie Expression, Signaltransduktion, Migration, Rezeptorinternalisierung und das Apoptoseverhalten untersucht. Als Modell diente die Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die aufgrund einer gleich starken mRNA-Transkription sowohl von CXCR4 als auch von CXCR7 geeignet war.

CXCR4 übt als klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit seinem Liganden CXCL12 schon seit längerem nachweislich einen Einfluss auf die Metastasierung, das Wachstum und die Invasion von Tumoren aus. Da CXCL12 auch CXCR7 als Rezeptor ansteuert und dieser erst 2006 beschrieben wurde, ist die Interaktion beider Rezeptoren in diesen Prozessen nicht sicher verstanden. Bisher nahm man an, dass CXCR4 hauptsächlich für die Metastasierung von Tumoren verantwortlich ist. Für CXCR7 hingegen wurden hauptsächlich antiapoptotische und Vaskularisation-anregende Eigenschaften beschrieben. CXCR7 ist kein klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor, sondern arbeitet über β -Arrestin.

Durch sowohl licht- als auch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnte dargestellt werden, dass beide Rezeptoren kolokalisiert sind und CXCR4 auch unter Einfluss von CXCL11 internalisiert. Im weiteren Verlauf wurde gezeigt, dass über beide Rezeptoren ERK phosphoryliert wird und dieser Effekt aufgrund einer fehlenden Inhibition von PTX auch G-Protein-unabhängig über CXCR7 abläuft. Die Migration der Tumorzellen kann sowohl durch CXCL11 als auch durch CXCL12 moduliert werden. Die selektiven Rezeptor-Antagonisten für CXCR4 (AMD3100) und CXCR7 (CCX733) haben auch hier einen modulierenden Einfluss.

Die Untersuchung der Apoptoseregulation durch die Methode nach Nicolletti und die Messung der Caspase 3/7-Aktivität zeigte, dass das Modell der Apoptoseinhibition durch CXCR7 auch bei Anwesenheit von CXCR4 gilt. Die CXCL12 induzierte Apoptosereduktion kann durch den selektiven CXCR4-Antagonisten AMD3100 nicht inhibiert werden, wohingegen CCX733 CXCR7 deutlich inhibiert und zu einer erhöhten Apoptoserate führt.

Beide Chemokinrezeptoren sind also sowohl signalleitend als auch leicht migrationsmodulierend wirksam, was auf die Bildung von membranständigen Heterodimeren zurückzuführen ist. Es zeigt sich auch, dass das Zusammenspiel beider Rezeptoren sehr komplex ist.

7. Literaturverzeichnis:

- Allen, S.J., Crown, S.E., Handel, T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.(2007)
- Altenburg, J.D., Broxmeyer, H.E., Jin, Q., Cooper, S., Basu, S., Alkhatib, G. A naturally occurring splice variant of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 is a potent human immunodeficiency virus type 1 inhibitor with weak chemotaxis and cell survival activities. *J Virol* 81, 8140-8148.(2007)
- Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., Dawson, T.M., Codina, J., Kwatra, M.M., Snyder, S.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *J Biol Chem* 267, 17882-17890.(1992)
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K.Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., Bachelier, F. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 35760-35766.(2005)
- Benovic, J.L., Kuhn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8879-8882.(1987)
- Bohlig, L., Rother, K. One function--multiple mechanisms: the manifold activities of p53 as a transcriptional repressor. *J Biomed Biotechnol* 2011, 464916.(2011)
- Bokoch, G.M., Katada, T., Northup, J.K., Hewlett, E.L., Gilman, A.G. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem* 258, 2072-2075.(1983)
- Borrell, V., Marin, O. Meninges control tangential migration of hem-derived Cajal-Retzius cells via CXCL12/CXCR4 signaling. *Nat Neurosci* 9, 1284-1293.(2006)
- Boyden, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115, 453-466.(1962)
- Bridger, G.J., Skerlj, R.T., Thornton, D., Padmanabhan, S., Martellucci, S.A., Henson, G.W., Abrams, M.J., Yamamoto, N., De Vreese, K., Pauwels, R., et al. Synthesis and structure-activity relationships of phenylenebis(methylene)-linked bis-tetraazamacrocycles that inhibit HIV replication. Effects of macrocyclic ring size and substituents on the aromatic linker. *J Med Chem* 38, 366-378.(1995)
- Burns, J.M., Summers, B.C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M.E., Sunshine, M.J., Littman, D.R., Kuo, C.J., Wei, K., McMaster, B.E., Wright, K., Howard, M.C., Schall, T.J. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 203, 2201-2213.(2006)
- Busillo, J.M., Benovic, J.L. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768, 952-963.(2007)

- Canals, M., Scholten, D.J., de Munnik, S., Han, M.K., Smit, M.J., Leurs, R. Ubiquitination of CXCR7 controls receptor trafficking. *PLoS One* 7, e34192. (2012)
- Claing, A., Laporte, S.A., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol* 66, 61-79.(2002)
- Compton, S.J., Jones, C.G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151, 369-374.(1985)
- Darash-Yahana, M., Gillespie, J.W., Hewitt, S.M., Chen, Y.Y., Maeda, S., Stein, I., Singh, S.P., Bedolla, R.B., Peled, A., Troyer, D.A., Pikarsky, E., Karin, M., Farber, J.M. The chemokine CXCL16 and its receptor, CXCR6, as markers and promoters of inflammation-associated cancers. *PLoS One* 4, e6695.(2009)
- De Clercq, E. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol* 77, 1655-1664.(2009)
- Duda, D.G., Kozin, S.V., Kirkpatrick, N.D., Xu, L., Fukumura, D., Jain, R.K. CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin Cancer Res* 17, 2074-2080.(2011)
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.(1993)
- Flomenberg, N., Devine, S.M., Dipersio, J.F., Liesveld, J.L., McCarty, J.M., Rowley, S.D., Vesole, D.H., Badel, K., Calandra, G. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 106, 1867-1874.(2005)
- Forstreuter, F., Lucius, R., Mentlein, R. Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J Neuroimmunol* 132, 93-98.(2002)
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272. (2003)
- Gerlach, L.O., Skerlj, R.T., Bridger, G.J., Schwartz, T.W. Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem* 276, 14153-14160.(2001)
- Goodman, O.B., Jr., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V.V., Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., Benovic, J.L. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383, 447-450.(1996)
- Hartmann, T.N., Grabovsky, V., Pasvolsky, R., Shulman, Z., Buss, E.C., Spiegel, A., Nagler, A., Lapidot, T., Thelen, M., Alon, R. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol* 84, 1130-1140.(2008)

- Hattermann, K., Held-Feindt, J., Lucius, R., Muerkoster, S.S., Penfold, M.E., Schall, T.J., Mentlein, R. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* 70, 3299-3308.(2010)
- Hattermann, K., Mentlein, R., Held-Feindt, J. CXCL12 mediates apoptosis resistance in rat C6 glioma cells. *Oncol Rep* 27, 1348-1352.(2012)
- Heesen, M., Berman, M.A., Charest, A., Housman, D., Gerard, C., Dorf, M.E. Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1. *Immunogenetics* 47, 364-370.(1998)
- Heinrich, E.L., Lee, W., Lu, J., Lowy, A.M., Kim, J. Chemokine CXCL12 activates dual CXCR4 and CXCR7-mediated signaling pathways in pancreatic cancer cells. *J Transl Med* 10, 68.(2012)
- Held-Feindt, J., Hattermann, K., Muerkoster, S.S., Wedderkopp, H., Knerlich-Lukoschus, F., Ungefroren, H., Mehdorn, H.M., Mentlein, R. CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *Exp Cell Res* 316, 1553-1566.(2010)
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C.C. p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.(1991)
- Huising, M.O., Stet, R.J., Kruiswijk, C.P., Savelkoul, H.F., Lidy Verburg-van Kemenade, B.M. Molecular evolution of CXC chemokines: extant CXC chemokines originate from the CNS. *Trends Immunol* 24, 307-313.(2003)
- Kaifi, J.T., Yekebas, E.F., Schurr, P., Obonyo, D., Wachowiak, R., Busch, P., Heinecke, A., Pantel, K., Izbicki, J.R. Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. *J Natl Cancer Inst* 97, 1840-1847.(2005)
- Katada, T., Ui, M. ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem* 257, 7210-7216.(1982)
- Kawada, K., Hosogi, H., Sonoshita, M., Sakashita, H., Manabe, T., Shimahara, Y., Sakai, Y., Takabayashi, A., Oshima, M., Taketo, M.M. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene* 26, 4679-4688.(2007)
- Keeley, E.C., Mehrad, B., Strieter, R.M. Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. *Exp Cell Res* 317, 685-690.(2010)
- Kenakin, T. Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* 24, 346-354.(2003)
- Kim, J., Takeuchi, H., Lam, S.T., Turner, R.R., Wang, H.J., Kuo, C., Foshag, L., Bilchik, A.J., Hoon, D.S. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol* 23, 2744-2753.(2005)

- Kousidou, O.C., Mitropoulou, T.N., Roussidis, A.E., Kletsas, D., Theocharis, A.D., Karamanos, N.K. Genistein suppresses the invasive potential of human breast cancer cells through transcriptional regulation of metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Int J Oncol* 26, 1101-1109.(2005)
- Krishan, A., Dandekar, P.D. DAPI fluorescence in nuclei isolated from tumors. *J Histochem Cytochem* 53, 1033-1036.(2005)
- Kumar, R., Tripathi, V., Ahmad, M., Nath, N., Mir, R.A., Chauhan, S.S., Luthra, K. CXCR7 mediated Gialpha independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells. *Cell Immunol* 272, 230-241.(2012)
- Lefkowitz, R.J., Whalen, E.J. beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 16, 162-168.(2004)
- Letsch, A., Keilholz, U., Schadendorf, D., Assfalg, G., Asemissen, A.M., Thiel, E., Scheibenbogen, C. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol* 122, 685-690.(2004)
- Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelerie, F., Lagane, B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 113, 6085-6093.(2009)
- Li, J., Sun, R., Tao, K., Wang, G. The CCL21/CCR7 pathway plays a key role in human colon cancer metastasis through regulation of matrix metalloproteinase-9. *Dig Liver Dis* 43, 40-47.(2011)
- Li, Y.M., Pan, Y., Wei, Y., Cheng, X., Zhou, B.P., Tan, M., Zhou, X., Xia, W., Hortobagyi, G.N., Yu, D., Hung, M.C. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell* 6, 459-469.(2004)
- Liles, W.C., Broxmeyer, H.E., Rodger, E., Wood, B., Hubel, K., Cooper, S., Hangoc, G., Bridger, G.J., Henson, G.W., Calandra, G., Dale, D.C. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 102, 2728-2730.(2003)
- Locht, C., Coutte, L., Mielcarek, N. The ins and outs of pertussis toxin. *Febs J* 278, 4668-4682.(2011)
- Locht, C., Keith, J.M. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* 232, 1258-1264.(1986)
- Löhr, K., Moritz, C., Contente, A., Dobbstein, M. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem* 278, 32507-32516. (2003)
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* 248, 1547-1550.(1990)
- Luker, K.E., Steele, J.M., Mihalko, L.A., Ray, P., Luker, G.D. Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene* 29, 4599-4610.(2010)

Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., Lefkowitz, R.J. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2449-2454.(2001)

Luttrell, M.L., Gesty-Palmer, D. Beyond Desensitization: Physiological Relevance of Arrestin-Dependent Signaling. *PharmRev* 62, 305-330.(2010)

Marchese, A., Benovic, J.L. Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting. *J Biol Chem* 276, 45509-45512.(2001)

Marchese, A., Chen, C., Kim, Y.M., Benovic, J.L. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* 28, 369-376.(2003)

Marchesi, F., Piemonti, L., Fedele, G., Destro, A., Roncalli, M., Albarello, L., Doglioni, C., Anselmo, A., Doni, A., Bianchi, P., Laghi, L., Malesci, A., Cervo, L., Malosio, M., Reni, M., Zerbi, A., Di Carlo, V., Mantovani, A., Allavena, P. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res* 68, 9060-9069. (2008)

Mashino, K., Sadanaga, N., Yamaguchi, H., Tanaka, F., Ohta, M., Shibuta, K., Inoue, H., Mori, M. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res* 62, 2937-2941.(2002)

Mentlein, R., Hattermann, K., Held-Feindt, J. Migration, Metastasis and More: The Role of Chemokines in the Proliferation, Spreading and Metastasis of Tumors. In *Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research*, U. Resende, H. Ulrich, eds. (Springer Science+Business Media Dordrecht).(2013)

Miao, Z., Luker, K.E., Summers, B.C., Berahovich, R., Bhojani, M.S., Rehemtulla, A., Kleer, C.G., Essner, J.J., Nasevicius, A., Luker, G.D., Howard, M.C., Schall, T.J. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15735-15740.(2007)

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.(1994)

Miyashita, T., Reed, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.(1995)

Mooney, L.M., Al-Sakkaf, K.A., Brown, B.L., Dobson, P.R. Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Cancer* 87, 909-917.(2002)

Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., Barrera, J.L., Mohar, A., Verastegui, E., Zlotnik, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.(2001)

Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleswar, H., Raz, E., Zerwes, H.G., Rot, A., Thelen, M. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* 5, e9175.(2010)

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., Caron, M.G. Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *J Biol Chem* 276, 19452-19460.(2001)

Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Caron, M.G., Barak, L.S. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem* 275, 17201-17210.(2000)

Ödemis, V., Lipfert, J., Kraft, R., Hajek, P., Abraham, G., Hattermann, K., Mentlein, R., Engele, J. The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia* 60, 372-381.(2012)

Pang, L.Y., Scott, M., Hayward, R.L., Mohammed, H., Whitelaw, C.B., Smith, G.C., Hupp, T.R. p21(WAF1) is component of a positive feedback loop that maintains the p53 transcriptional program. *Cell Cycle* 10, 932-950.(2011)

Phillips, R.J., Burdick, M.D., Lutz, M., Belperio, J.A., Keane, M.P., Strieter, R.M. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1676-1686.(2003)

Rajagopal, S., Kim, J., Ahn, S., Craig, S., Lam, C.M., Gerard, N.P., Gerard, C., Lefkowitz, R.J. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 628-632.(2010)

Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., Richmond, A. Chemokines in health and disease. *Exp Cell Res* 317, 575-589.(2011)

Ransohoff, R.M. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity* 31, 711-721.(2009)

Ray, P., Mihalko, L.A., Coggins, N.L., Moudgil, P., Ehrlich, A., Luker, K.E., Luker, G.D. Carboxy-terminus of CXCR7 regulates receptor localization and function. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 669-678.(2012)

Reed, J.C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124, 1-6.(1994)

Reiss, K., Mentlein, R., Sievers, J., Hartmann, D. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* 115, 295-305.(2002)

Russell, H.V., Hicks, J., Okcu, M.F., Nuchtern, J.G. CXCR4 expression in neuroblastoma primary tumors is associated with clinical presentation of bone and bone marrow metastases. *J Pediatr Surg* 39, 1506-1511.(2004)

Schioppa, T., Uranchimeg, B., Sacconi, A., Biswas, S.K., Doni, A., Rapisarda, A., Bernasconi, S., Sacconi, S., Nebuloni, M., Vago, L., Mantovani, A., Melillo, G., Sica, A. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 198, 1391-1402.(2003)

- Schneider, O.D., Weiss, A.A., Miller, W.E. Pertussis toxin signals through the TCR to initiate cross-desensitization of the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol* 182, 5730-5739.(2009)
- Scotton, C.J., Wilson, J.L., Milliken, D., Stamp, G., Balkwill, F.R. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 61, 4961-4965.(2001)
- Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem* 278, 14498-14506.(2003)
- Shenoy, S.K., McDonald, P.H., Kohout, T.A., Lefkowitz, R.J. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science* 294, 1307-1313.(2001)
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., Honjo, T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.(1995)
- Sierro, F., Biben, C., Martinez-Munoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R.M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., Harvey, R.P., Martinez, A.C., Mackay, C.R., Mackay, F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14759-14764.(2007)
- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., Ishii, S. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21, 5516-5522.(1982)
- Tanious, F.A., Veal, J.M., Buczak, H., Ratmeyer, L.S., Wilson, W.D. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31, 3103-3112. (1992)
- Thelen, M., Thelen, S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* 198, 9-13.(2008)
- Tohgo, A., Choy, E.W., Gesty-Palmer, D., Pierce, K.L., Laporte, S., Oakley, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Luttrell, L.M. The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 278, 6258-6267.(2003)
- Tohgo, A., Pierce, K.L., Choy, E.W., Lefkowitz, R.J., Luttrell, L.M. beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* 277, 9429-9436.(2002)
- Wang, J., Shiozawa, Y., Wang, J., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K.J., Mehra, R., Loberg, R., Taichman, R.S. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* 283, 4283-4294.(2008)

Wong, R.S., Bodart, V., Metz, M., Labrecque, J., Bridger, G., Fricker, S.P. Comparison of the potential multiple binding modes of bicyclam, monocylam, and noncyclam small-molecule CXC chemokine receptor 4 inhibitors. *Mol Pharmacol* 74, 1485-1495.(2008)

Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E.A., Appella, E., Oppenheim, J.J., Leonard, E.J. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 9233-9237.(1987)

Zlotnik, A., Burkhardt, A.M., Homey, B. Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nat Rev Immunol* 11, 597-606.(2011)

Zlotnik, A., Yoshie, O., Nomiyama, H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 7, 243.(2006)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei verschiedenen Personen bedanken, die zum Gelingen dieses Projektes maßgeblich beitrugen.

Bei Prof. Dr. Rolf Mentlein bedanke ich mich herzlich für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung und die interessanten Gespräche rund ums Thema Wissenschaft und wissenschaftliches Arbeiten. Vielen Dank, dass du immer ein offenes Ohr hattest.

Dr. Kirsten Hattermann danke ich für die geduldige Einführung in die Laborarbeit, und die Betreuung der Dissertation auch während den intensiveren Klinikphasen. Danke für deine Unterstützung.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Miriam Lemmer, Martina Burmester und Sonja Dahle für die tolle Zeit im Labor, die technische Unterstützung und die vielen hilfreichen Tipps und Kniffe. Mir hat die Zeit mit euch viel Spaß bereitet.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts, insbesondere bei Marion Kölln und Katrin Masuhr für die Hilfe bei der Elektronenmikroskopie.

Bei Dr. Stefanie Duchow möchte ich mich für die Korrektur des Manuskripts und den Gedankenaustausch rund ums Thema Doktorarbeit bedanken.

Alina, dir danke ich für deine starken Nerven und die beruhigenden Worte, wenn mal wieder alles schief lief. Danke, dass du immer für mich da warst.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Vielen Dank für eure Unterstützung, euer Vertrauen und eure Hilfe. Ihr wart mir die besten Lehrer, die man sich als Kind wünschen kann.

Lebenslauf:

Name: Eric Holzenburg
Nationalität: deutsch
Geburtsdatum/-ort: 1989 in Schwedt/Oder

Schulbildung

1995-2001 Grundschohle 6 in Schwedt/Oder
2001-06/2008 Carl-Friedrich-Gauß Gymnasium Schwedt/Oder

Studium

10/2008-12/2013 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/ 2009 Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Vorphysikum)
06/2010 Beginn der Promotionsarbeit bei Prof. Dr. R. Mentlein
03/2011 Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)
12/2013 Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)

Auszeichnungen

„Goldene Hedström-Feile“ der Fachzeitschrift Endodontie (2012)

Veröffentlichungen

Publikation:

Hattermann K , Holzenburg E, Hans F, Lucius R, Held-Feindt J, Mentlein R. Effects of the chemokine CXCL12 and combined internalization of its receptors CXCR4 and CXCR7 in human MCF-7 breast cancer cells. Cell Tiss Res (2014)

Holzenburg E, Christofzik D. Einsatz des Operationsmikroskops in der zahnärztlichen Ausbildung. Wehrmedizin u Wehrpharmazie 2 (2013)

Vortrag:

Hattermann K, Holzenburg E, Hans F, Held-Feindt J, Mentlein R. Interplay of the CXCL12 / SDF-1 – binding chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 in human breast cancer cells. Anatomische Gesellschaft 28. Arbeitstagung, Würzburg, 28. – 30. September 2011. Abstract-Band p.8, Abstract V15. (2011)