

Inverse Signaltransduktion

-

ein neues Konzept zur Wirkung von transmembranen
Chemokinen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Henrike Gebhardt

Kiel 2015

Referent/in: Herr Prof. Dr. Rolf Mentlein

Korreferent/in: Frau Prof. Dr. Manuela Dittmar

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2015

Zum Druck genehmigt: 27.10.2015

Herr Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl

Dekan

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1 CHEMOKINE	1
1.1.1 <i>Transmembrane Chemokine</i>	5
1.2 INTERZELLULÄRE KOMMUNIKATION - SIGNALTRANSDUKTION	10
1.3 ARBEITSHYPOTHESE	13
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 MATERIAL	15
2.1.1 <i>Geräte</i>	15
2.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	16
2.1.3 <i>Chemikalien</i>	17
2.1.4 <i>Puffer</i>	18
2.1.5 <i>Verwendete Kits</i>	20
2.1.6 <i>Proteine und Enzyme</i>	20
2.1.7 <i>Antikörper</i>	21
2.1.8 <i>Plasmide</i>	21
2.1.9 <i>Mutagenese-Primer</i>	22
2.1.10 <i>Small interfering RNA (siRNA)</i>	22
2.1.11 <i>TaqMan® Gene Expression-Primer für die Real-Time-RT-PCR</i>	22
2.1.12 <i>Inhibitoren</i>	23
2.1.13 <i>Zellkulturmedien</i>	23
2.1.14 <i>Zelllinien</i>	24
2.1.15 <i>Primäre Zellen</i>	25
2.1.16 <i>Bakterien</i>	25
2.2 METHODEN	25
2.2.1 <i>Zellbiologische Methoden</i>	25
2.2.1.1 <i>Kultivierung etablierter Zelllinien</i>	25
2.2.1.2 <i>Kultivierung von Primärzellen</i>	26
2.2.1.3 <i>Subkultivierung von Zellen</i>	26
2.2.1.4 <i>Kryokonservierung von Zellen</i>	26
2.2.1.5 <i>Inkulturnahme von Zellen</i>	26
2.2.1.6 <i>Transiente Transfektion von Zellen</i>	27
2.2.1.7 <i>Stabile Transfektion von Zellen</i>	27

2.2.1.8 Transfektion von Zellen mit siRNA	27
2.2.1.9 Stimulation von Zellen	27
2.2.1.10 Zellmigrationsversuch mittels Scratch-Test	28
2.2.1.11 Proliferationsassay mit WST-1	28
2.2.1.12 Herstellung von konditioniertem Medium	28
2.2.1.13 Apoptosenachweis durch Aktivitätsbestimmung der Caspasen 3 und 7	29
2.2.1.14 Apoptosenachweis durch Spaltungsnachweis von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase.....	29
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden	30
2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten.....	30
2.2.2.2 Membranisolation	30
2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	30
2.2.2.4 Vorbereitung der Proteinproben auf den Western Blot	31
2.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
2.2.2.6 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran	31
2.2.2.7 Immunologische Detektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz	31
2.2.2.8 Strippen von PVDF-Membranen	32
2.2.2.9 Chemische Quervernetzung von Membranisolaten mit Paraformaldehyd	32
2.2.2.10 Fluoreszenzmarkierung zum Bindungsnachweis	32
2.2.2.11 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie.....	33
2.2.2.12 Herstellung von F(ab)-Fragmenten aus Antikörpern	34
2.2.2.13 Immunogold-Elektronenmikroskopie zum Bindungsnachweis.....	35
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.3.1 RNA-Isolierung mittels Trizol.....	36
2.2.3.2 Herstellung von cDNA mittels Random-Hexamer-Primer	36
2.2.3.3 Quantitative <i>Real-Time</i> -RT-Polymerase-Kettenreaktion (<i>Real-time</i> -RT-PCR)	37
2.2.3.4 Transformation von Bakterien und Plasmidamplifikation	38
2.2.3.5 Plasmid-Isolation (Midi-Präp)	39
2.2.3.6 Zielgerichtete Mutation des Plasmids.....	39
2.2.3.7 Plasmid-Isolation (Mini-Präp)	40
2.2.4 Immunologische Methoden.....	41
2.2.4.1 Fluoreszenz-Immunzytochemie mittels Aceton/Methanol-Fixierung.....	41
2.2.4.2 Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA))	41
3. ERGEBNISSE.....	42
3.1 VORKOMMEN DER CHEMOKINE CX3CL1 UND CXCL16 SOWIE DER CHEMOKINREZEPTOREN CX3CR1 UND CXCR6 IN HUMANEN ZELLINIEN	42
3.1.1 <i>Transkriptionsanalyse der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 sowie der entsprechenden Chemokinrezeptoren CX3CR1 und CXCR6 in humanen Zelllinien.....</i>	42
3.1.2 <i>Expressionsnachweis der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 in humanen Zelllinien.....</i>	43
3.2 STIMULATION VON HUMANEN ZELLEN DURCH DIE CHEMOKINE CX3CL1 UND CXCL16	44
3.2.1 <i>Stimulation von humanen Glioblastomzelllinien mit CX3CL1 und CXCL16</i>	44
3.2.2 <i>Stimulation von primären, humanen Glioblastomzellen mit CX3CL1 und CXCL16</i>	46

3.2.3 Stimulation der humanen Melanomzelllinie LOX mit CX3CL1 und CXCL16.....	46
3.3 BIOLOGISCHE EFFEKTE DER STIMULATION MIT DEN CHEMOKINEN CX3CL1 UND CXCL16 IN HUMANEN ZELLINIEN.....	47
3.3.1 Einfluss auf die Migration durch Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 in humanen Glioblastomzelllinien	47
3.3.2 Einfluss auf die Proliferation durch Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 in humanen Zelllinien	48
3.3.2 Einfluss auf die Apoptose durch Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 in der humanen Glioblastomzelllinien A764	49
3.4 UNTERSUCHUNGEN ZU MÖGLICHEN REZEPTOREN, DIE DIE EFFEKTE DER STIMULATION VON CX3CL1 UND CXCL16 IN HUMANEN ZELLINIEN VERMITTELN	50
3.4.1 Inhibition von G-Protein-vermittelter Signaltransduktion in humanen Zellen.....	50
3.4.2 Expressionsnachweis von Chemokin- und Decoy-Rezeptoren in humanen Zelllinien	52
3.4.3 Inhibition des Chemokinrezeptors CXCR7 in der Glioblastomzelllinie U343	54
3.5 BINDUNGSEXPERIMENTE MIT LÖSLICHEM, REKOMBINANTEN CX3CL1 UND CXCL16 IN HUMANEN ZELLINIEN.....	54
3.5.1 Bindungsexperimente mit Fluoreszenz- und Biotin-markierten löslichen Chemokinen in humanen Zelllinien	54
3.5.2 Bindungsexperimente mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie in humanen Zelllinien	56
3.5.3 Bindungsexperimente mittels chemischer Quervernetzung der Chemokine in transfizierten LOX- Melanomzellen	57
3.6 TRANSFEKTION DER NICHT-RESPONSIVEN MELANOMZELLINIE LOX MIT TRANSMEMBRANEN CHEMOKINEN.....	58
3.6.1 Nachweis der Transfektion von tm-Chemokinen in die Melanomzelllinie LOX.....	58
3.6.2 Stimulation und biologische Effekte durch CX3CL1 und CXCL16 in transfizierten LOX-Zellen	58
3.6.3 Trunkierung der intrazellulären Domäne der transmembranen Chemokine zum Nachweis der Signaltransduktion	61
3.6.4 Zielgerichtete Mutagenese von Phosphorylierungsmotiven in der intrazellulären Domäne des transmembranen CXCL16	63
3.7 TRANSFEKTION MIT siRNA ZUR EXPRESSIONSMINIMIERUNG DER TRANSMEMBRANEN CHEMOKINE	64
3.7.1 Transfektion der responsiven Glioblastomzelllinie T98G mit siRNA zur Expressionsminimierung von CXCL16 und CX3CL1	64
3.7.2 Transfektion von responsiven Glioblastom-Primärkulturen mit siRNA zur Expressionsminimierung von CXCL16 und CX3CL1	65
3.8 STIMULATION VON TRANSFIZIERTEN LOX-MELANOMZELLEN MIT KONDITIONIERTEM MEDIUM.....	67
3.9 STIMULATION VON TRANSFIZIERTEN LOX-MELANOMZELLEN MIT SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN GEGEN CX3CL1 UND CXCL16	69
3.9.1 Stimulation von transfizierten LOX-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen die Chemokindomäne von CX3CL1 und CXCL16	69
4. DISKUSSION.....	72
4.1 VORKOMMEN DER CHEMOKINE CX3CL1 UND CXCL16 SOWIE DER CHEMOKINREZEPTOREN CX3CR1 UND CXCR6 IN HUMANEN ZELLEN	72

4.2 STIMULATION UND BIOLOGISCHE EFFEKTE DER CHEMOKINE CX3CL1 UND CXCL16 IN HUMANEN ZELLINIEN.....	74
4.3 REZEPTORNACHWEIS IN DEN VERWENDETEN GLIOBLASTOM- UND MELANOMZELLINIEN	75
4.4 DIE HYPOTHESE DER INVERSEN SIGNALTRANSDUKTION – „ <i>PROOF OF PRINCIPLE</i> “	76
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	86
6. SUMMARY.....	87
7. LITERATURVERZEICHNIS	88
8. DANKSAGUNG.....	99
9. LEBENSLAUF	100
10. ERKLÄRUNG.....	102

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Chemokinfamilien.....	2
Abb. 1.2: Schematischer Aufbau eines transmembranen Chekomins	5
Abb. 1.3: Signaltransduktionswege.....	11
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der reversen Signaltransduktion	12
Abb. 2.1: Schematische Darstellung des enzymatischen Verdaus eines Antikörpers durch Papain und Pepsin ..	34
Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Herstellung der F(ab)-Fragmente	34
Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Immunogold-Elektronenmikroskopie.....	35
Abb. 3.1: Transkriptionsanalyse der transmembranen Chemokine CX3CL1, CXCL16 und ihrer Rezeptoren CX3CR1 und CXCR6 in humanen Zelllinien.....	42
Abb. 3.2: Expressionsnachweis von CXCL16 und CX3CL1 in humanen Zelllinien.....	43
Abb. 3.3: Zeitabhängige Stimulation von humanen Glioblastomzelllinien mit CXCL16 und CX3CL1.....	44
Abb. 3.4: Immunfluoreszenz-Färbung der Stimulation von Glioblastomzellen mit CXCL16 und CX3CL1.....	45
Abb. 3.5: Dosisabhängige Stimulation von T98G-Zellen mit CXCL16 und CX3CL1.....	45
Abb. 3.6: Zeitabhängige Stimulation von primären, humanen Glioblastomzellen mit CXCL16 und CX3CL1.....	46
Abb. 3.7: Zeitabhängige Stimulation der humanen Melanomzelllinie LOX mit CXCL16 und CX3CL1.....	47
Abb. 3.8: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Migration von humanen Glioblastomzelllinien	48
Abb. 3.9: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Proliferation von humanen Zelllinien.....	49
Abb. 3.10: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Apoptose von humanen A764- Glioblastomzellen.....	50
Abb. 3.11: Stimulation humaner Glioblastomzelllinien mit CXCL16 und CX3CL1 in Gegenwart von Pertussistoxin.....	51
Abb. 3.12: Stimulation der monozytären Zelllinie THP-1 mit CX3CL1 in Gegenwart von Pertussistoxin.....	52
Abb. 3.13: Stimulation der Glioblastomprimärkultur 76/12 mit einer manipulierten CX3CL1-Variante.....	52
Abb. 3.14: Expressionsnachweis von Chemokin- und <i>Decoy</i> -Rezeptoren in humanen Zelllinien.....	53
Abb. 3.15: Stimulation der Glioblastomzelllinie U343 mit CX3CL1 und CXCL16 in Gegenwart des CXCR7- Antagonisten CCX733.....	54
Abb. 3.16: Bindungsnachweis durch Fluoreszenz-markierte Chemokine in transfizierten und untransfizierten LOX-Zellen mittels Lichtmikroskopie.....	55
Abb. 3.17: Bindungsnachweis durch Fluoreszenz-markierte Chemokine in transfizierten LOX-Zellen mittels FACS-Analyse.....	56
Abb. 3.18: Bindungsnachweis der Chemokine durch Immunogold-Elektronenmikroskopie.....	56
Abb. 3.19: Bindungsnachweis durch chemische Quervernetzung der Chemokine mit Membranisolaten transfizierter LOX-Zellen.....	57
Abb. 3.20: Transfektionsnachweis von CXCL16 und CX3CL1 in humanen LOX-Melanomzellen.....	58
Abb. 3.21: Zeitabhängige Stimulation von humanen transfizierten LOX-Zellen mit CXCL16 oder CX3CL1.....	59
Abb. 3.22: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Apoptose von transfizierten LOX-Zellen.....	60
Abb. 3.23: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Spaltung von PARP in transfizierten LOX-Zellen.....	61

Abb. 3.24: Schematische Darstellung der Trunkierung der intrazellulären Domäne der transmembranen Chemokine.....	62
Abb. 3.25: Nachweis der C-terminalen Trunkierung der transmembranen Chemokine und Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 in transfizierten LOX-Zellen.....	63
Abb. 3.26: Stimulation von mutierten <i>tm</i> -CXCL16-transfizierten LOX-Zellen mit löslichem CXCL16.....	64
Abb. 3.27: Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 nach siRNA-Transfektion in humanen T98G-Zellen.....	65
Abb. 3.28: Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 nach siRNA-Transfektion in primären, humanen Glioblastomzellen.....	66
Abb. 3.29: Nachweis der löslichen Chemokine CX3CL1 und CXCL16 in konditionierten Medien.....	67
Abb. 3.30: Stimulation von humanen (transfizierten) LOX-Zellen mit konditionierten Medien.....	68
Abb. 3.31: Stimulation von transfizierten LOX-Zellen mit spezifischen Antikörpern.....	69
Abb. 3.32: Stimulation von transfizierten LOX-Zellen mit monovalenten F(ab)-Fragmenten.....	70
Abb. 3.33: Nachweis der Stimulation von transfizierten LOX-Zellen mit spezifischen Antikörpern und monovalten F(ab)-Fragmenten mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	71
Abb. 4.1: Schematische Darstellung der inversen Signaltransduktionshypothese.....	77
Abb. 4.2: Schematische Zusammenfassung der inversen und reversen Signaltransduktion.....	85

Abkürzungsverzeichnis

α	anti, griechischer Buchstabe alpha
A	Absorption
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AG	Arbeitsgruppe
Ala	Alanin
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
AP-1	<i>Activating Protein-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
biot.	biotinyliert
BRET	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
Campto	Camptothecin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CKI	Caseinkinase I
CKIP-1	<i>Casein kinase 2-interacting protein-1</i>
C _T	Cycle Threshold (Schwellenwert-Zyklus)
C-terminal	Carboxy-terminal
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4'-6-Diamidin-2-phenylindol
DARC	<i>Duffy antigen receptor for chemokines</i>
dest.	Destilliert
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EIMi	Elektronenmikroskopie

EphA	Ephrin A
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	<i>extracellular-signal regulated kinase 1 und 2</i>
et al.	und weitere
etc.	et cetera
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	<i>fetale calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Zentrifugalbeschleunigung
G418	Gentamycin-418
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GIM	Gliom-infiltrierende Mikroglia
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>hour</i> , Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HTRF	<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen (<i>human umbilical vein endothel cells</i>)
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICC	Immunzytochemie
IFN γ	Interferon γ
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IZD	Intrazelluläre Domäne
JNK	cJun N-terminale Kinase
k	Kilo
Kat.-Nr.	Katalognummer
kDa	Kilodalton (Masseneinheit von Proteinen)
Kontr	Kontrolle
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>

Lsg-	Lösung
LPS	Lipopolysaccharid
μ	Mikro
m	milli
M	molar, Mol/Liter
MAP2K	MAP-Kinase Kinase
MAP3K	MAP-Kinase Kinase Kinase
MAP-Kinasen	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
n	nano
NaOH	Natronlauge
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
N-terminal	Amino-terminal
O	Sauerstoff
o.ä.	oder ähnliche/s
oxLDL	oxidiertes <i>low density lipoprotein</i>
p	piko
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
(c)PARP	<i>(cleaved) Poly(ADP-Ribose)-Polymerase</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pAkt	phosphorylierte Proteinkinase B/Akt
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pERK	phosphoryliertes ERK
PFA	Paraformaldehyd
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB/Akt	Proteinkinase B/Akt
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussistoxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
®	<i>registered trade mark</i>
rh	Rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
s.	siehe
s	löslich (<i>soluble</i>)
sek. AK	Sekundärantikörper
S.D.	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
Ser	Serin
SH	<i>Scr homology</i>
siRNA	<i>small interfering/silencing RNA</i>
Streptav	Streptavidin
Tab.	Tabelle
TACE	<i>TNFα-converting enzyme</i>
TBST	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TM	<i>unregistered trade mark</i>
<i>tm</i>	transmembran
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tyr	Tyrosin
V	Volt
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin	G	Glycin	M	Methionin	S	Serin
C	Cystein	H	Histidin	N	Asparagin	T	Threonin
D	Asparaginsäure	I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin
E	Glutaminsäure	K	Lysin	Q	Glutamin	W	Tryptophan
F	Phenylalanin	L	Leucin	R	Arginin	Y	Tyrosin

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Verwendete Primärantikörper.....	21
Tab. 2.2: Verwendete Sekundärantikörper.....	21
Tab. 2.3: Verwendete Expressionsvektoren.....	21
Tab. 2.4: Verwendete Mutagenese-Primer.....	22
Tab. 2.5: Verwendete siRNA.....	22
Tab. 2.6: Verwendete Primer.....	22
Tab. 2.7: Custom TaqMan® Gen Expression Assay für US28.....	23
Tab. 2.8: Herkunft der Tumorzelllinien für die Transkriptionsanalyse.....	24
Tab. 2.9: Pipettierschema der Proteinbestimmung nach Bradford.....	30
Tab. 2.10: Zusammensetzung des Mastermixes für die <i>Real-Time</i> -RT-PCR.....	37
Tab. 2.11: Programm der <i>Real-Time</i> -RT-PCR.....	38
Tab. 2.12: Programm der Mutagenese-PCR.....	40
Tab. 4.1: Aminosäuresequenzen der intrazellulären Domäne der transmembranen Chemokine in verschiedenen Spezies.....	80

1. Einleitung

1.1 Chemokine

Ende der 1980iger Jahre wurden Chemokine als Lockstoffe für Leukozyten entdeckt (CXCL8 für Neutrophile Granulozyten, CCL2 für Monozyten)(Zlotnik and Yoshie 2012). Hierdurch entstand der Name Chemokine, also **chemotaktische Zytokine**. Sie dirigieren allgemein die gerichtete Migration von Leukozyten, Endothel- sowie Epithelzellen. Mittlerweile ist bekannt, dass sie zudem viele weitere Funktionen besitzen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Embryogenese und der Entstehung und Aufrechterhaltung des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Weiterhin haben sie einen Einfluss auf die Wundheilung und die Angiogenese (Raman et al. 2011). Durch diese Eigenschaften spielen Chemokine insbesondere bei entzündlichen Prozessen, aber auch bei der Tumorgenese und Progression sowie bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle (Zlotnik 2006; Raman et al. 2011). Zudem sind Chemokine und ihre Rezeptoren weithin im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert. Sie regulieren dort nicht nur die Migration von Zellen, sondern spielen zusätzlich eine Rolle bei der Regulation des neuronalen Überlebens, von Zell-Zell-Kontakten und der Neurotransmission (Ambrosini and Aloisi 2004). Adler und Rogers bezeichneten Chemokine daher als drittes großes Transmittersystem im Gehirn (Adler and Rogers 2005).

Chemokine sind fast ausschließlich kleine lösliche Proteine (8-17 kDa), die von verschiedensten Zellen sezerniert werden. Die Ausnahme bilden die zwei transmembranen Chemokine CXCL16 und CX3CL1, welche erst durch proteolytische Spaltung in die lösliche Form überführt werden können (Bazan et al. 1997; Wilbanks et al. 2001). Derzeit sind mehr als 50 Chemokine bekannt. Diese werden aufgrund von konservierten Cysteinresten und der Anzahl der dazwischen liegenden Aminosäuren am N-terminalen Ende der Chemokindomäne in 4 Familien unterteilt (Lazennec and Richmond 2010). Die CXC-Familie besteht aus 17 Chemokinen. Eine weitere Unterteilung innerhalb dieser Familie erfolgt über das Glutaminsäure-Leucin-Arginin (ELR)-Sequenzmotiv. ELR⁺-CXC-Chemokine (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 und CXCL8) wirken Angiogenese fördernd. CXC-Chemokine die kein ELR-Motiv besitzen (CXCL4, CXCL4L1, CXCL9, CXCL10, CXCL11 und CXCL14), zeigen eine angiostatische Wirkung (Raman et al. 2011). Die CC-Familie weist mit 28 Mitgliedern die meisten Chemokine auf. Die XC-Familie besteht aus dem Lymphotactin (XCL1) und dem SCM-1 β (XCL2) und CX3CL1 stellt das einzige Mitglied der CX3C-Familie dar (Sokol and Luster 2015). Zudem können Chemokine auch aufgrund ihrer Expression als inflammatorisch, homöostatisch oder bifunktionell unterteilt werden. Während homöostatische Chemokine konstitutiv exprimiert werden und beispielsweise den Aufbau von lymphoiden Geweben organisieren (Zlotnik et al. 2011), wird die Expression von inflammatorischen Chemokinen durch Entzündungsmediatoren reguliert, wodurch es zur

Rekrutierung von Leukozyten zum Entzündungsherd kommt (Viola and Luster 2008; Zlotnik and Yoshie 2012). Bei CX3CL1 handelt es sich beispielsweise um ein bifunktionelles Chemokin. Es wird konstitutiv im Gehirn exprimiert, kann auf Endothelzellen aber durch inflammatorische Stimuli hochreguliert werden (Sciune et al. 2010).

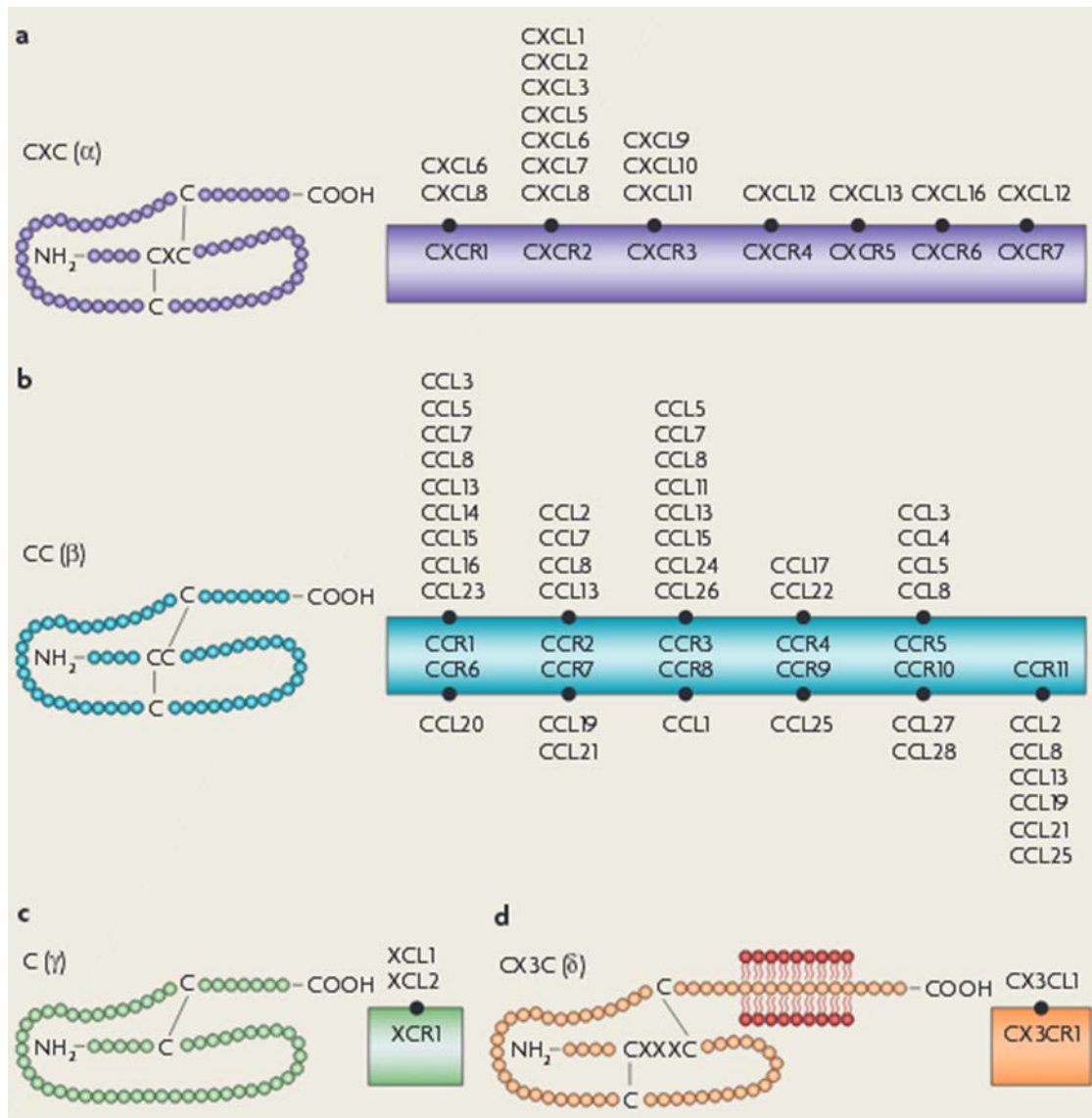


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Chemokinfamilien. Die Liganden der 4 Chemokinfamilien sind schematisch anhand ihres Cysteinmotivs dargestellt. Anbei findet sich jeweils eine Auflistung der entsprechenden Rezeptoren und der an sie bindenden Liganden (Rostene et al. 2007).

Die Chemokine vermitteln ihre Wirkung über Rhodopsin-ähnliche G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren (Sokol and Luster 2015). Es sind ca. 20 Chemokinrezeptoren bekannt, wobei diese entsprechend der Liganden in 4 Rezeptorfamilien eingeteilt sind. Die CXCR-Familie besteht aus 7, die CCR-Familie aus 11 Mitgliedern. Die XCR- und CX3CR-Familien enthalten jeweils nur einen Rezeptor (Rostene et al. 2007). Zudem sind mehrere *Decoy*-Rezeptoren (auch *Scavenger*-Rezeptoren genannt) bekannt, die zwar die

Chemokinliganden mit hoher Affinität binden, aber keine Signaltransduktion vermitteln. Sie dienen wahrscheinlich der Konzentrationsregulation der sezernierten Chemokine in ihrer Umgebung (Graham et al. 2012). Wie aus der Zahl der Liganden und Rezeptoren ersichtlich wird, müssen einige Rezeptoren mehrere Liganden binden. Außerdem sind einige Chemokine in der Lage an verschiedene Rezeptoren zu binden (vgl. Abb. 1.1). Diese Bindungen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität. Zudem binden Chemokinrezeptoren nur Liganden einer Chemokinfamilie, worauf auch ihre Nomenklatur beruht (Sokol and Luster 2015).

Bindet der Ligand an den 7-Transmembranrezeptor, wird die heterotrimere Untereinheit ($G\alpha\beta\gamma$) aktiviert. Durch den Austausch von GDP zu GTP erfolgt die Spaltung in die $G\alpha_i$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheit (Neptune and Bourne 1997), wodurch es zur Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden (u.a. *Mitogen-activated-protein* (MAP)-Kinasen, Phospholipase C β , Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) sowie Ras und Rho GTPasen) kommt (Thelen and Stein 2008).

Chemokine sind nicht nur in physiologischen Prozessen (Entwicklung etc.) eingebunden, sondern spielen auch in Tumoren eine wichtige Rolle. Tumoren entstehen häufig aus chronischen Entzündungen und weisen selbst Entzündungsmerkmale, wie die Expression von Entzündungsmediatoren und die Einwanderung von Immunzellen, auf (Balkwill and Mantovani 2001). Hanahan und Weinberg beschrieben zudem, dass Tumorzellen mehrere Eigenschaften erwerben müssen, um zu einem makroskopischen Tumor heranwachsen zu können (Hanahan and Weinberg 2011). Hierunter fallen unter anderem, neben der Versorgung mit Wachstumssignalen und der Angiogenese von Blutgefäßen, die Bildung eines Tumorstromas und die Entwicklung einer Apoptoseresistenz. Chemokine sind in all diese Prozesse involviert. So fördert die CXCR4/CXCL12-Achse beispielsweise das Wachstum von Tumoren (Chatterjee et al. 2014). Die Angiogenese von Blutgefäßen gewährleistet die Versorgung mit Nährstoffen und wird durch CXC-Chemokine mit einem ELR-Motiv gefördert (Raman et al. 2011). Für die Vaskularisierung werden zudem Endothelzellen benötigt, die wiederum von Chemokinen rekrutiert werden. So wirkt beispielsweise CXCL8 chemotaktisch auf Endothelzellen in Bronchialkarzinomen (Smith et al. 1994). Da der Aufbau und die Barrierefunktion von Tumorblutgefäßen in der Regel nicht so geordnet und stabil ist wie in gesunden Blutgefäßen (Baluk et al. 2005), wird hierdurch weiterhin die Metastasierung erleichtert, da die metastasierenden Zellen leichter in die Blutgefäße einwandern können. Chemokine vermitteln zudem durch ihre chemotaktische Wirkung eine Spezifität der metastasierenden Zellen für bestimmte Organe. Beispielsweise bilden CXCR4-positive Brustkrebszellen bevorzugt in CXCL12 exprimierenden Organen Metastasen (Muller et al. 2001) und der Rezeptor CCR7 veranlasst eine bevorzugte Migration in Lymphknoten (Sarvaiya et al. 2013). Ein weiterer wichtiger Punkt in der

Tumorentstehung ist die Bildung eines Tumorstromas. Dieses steht im engen Kontakt zum Tumor und versorgt die eigentlichen Tumorzellen mit Wachstumsfaktoren, Angiogenesefaktoren, aber auch Matrixmetalloproteinasen zur Veränderung der extrazellulären Matrix (EZM) insbesondere in invasiven Prozessen (Catalano et al. 2013). Neben Fibroblasten und vaskulären Zellen (Endothelzellen, Perizyten und glatte Muskelzellen) enthält das Tumorstroma unter anderem viele Immunzellen (Ariztia et al. 2006). So können Gliomen aus bis zu 35% Mikroglia-Zellen bestehen (Badie and Schartner 2000). Dieses auf den ersten Blick paradox erscheinende Phänomen wird durch den Tumor aktiv durch die Freisetzung von Botenstoffen (Chemokine, Zytokine und andere) erzeugt. Das so entstandene inflammatorische Milieu wirkt tumorfördernd (Dvorak 1986). Beispielsweise werden Mikroglia-Zellen über die CX3CR1/CX3CL1-Achse vom Tumor rekrutiert (Held-Feindt et al. 2010). Insbesondere Immunzellen, die normalerweise bei der Wundheilung eine Rolle spielen, werden aktiv vom Tumor angelockt (Ben-Baruch 2006; Schafer and Werner 2008). Durch Abgabe von Wachstumsfaktoren, pro-angiogenetischen und anti-apoptischen Faktoren sowie von EZM-verändernden Enzymen unterstützen die Immunzellen den Tumor. Zudem werden weitere Zytokine und Chemokine freigesetzt, um die Entzündungsreaktion zu verstärken (Sethi et al. 2012). Zusätzlich entstehen durch die Entzündung reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die wiederum mutationsfördernd wirken und somit eine Tumorentstehung zum Teil erst ermöglichen (Grivennikov et al. 2010; Qian and Pollard 2010).

Chemokine können aber auch der Tumorprogression entgegen wirken. Beispielsweise inhibieren die ELR-Motiv-negative CXC-Chemokine CXCL4 und CXCL4L1 über den Rezeptor CXCR3 die Angiogenese von Tumorzellen, wodurch im Mausmodell eine Reduktion des Tumors erreicht werden konnte (Yamaguchi et al. 2005; Struyf et al. 2011). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Expression von *Decoy*-Rezeptoren ebenfalls tumorinhibierend wirken kann. Diese nicht signalleitenden Rezeptoren binden tumorfördernde CC- und CXC-Chemokine und entziehen diese der Tumormikroumgebung durch Internalisierung ohne weitere biologische Effekte auszulösen (Neel et al. 2005). So wurde beispielsweise in Tierexperimenten gezeigt, dass eine höhere Expression von *Duffy antigen receptor for chemokines* (DARC) zu einer geringeren Angiogenese und Metastasierung sowie zu einem geringeren Tumorwachstum in verschiedenen Tumorentitäten führt (Addison et al. 2004; Shen et al. 2006; Wang et al. 2006).

Aufgrund dieser vielfältigen Wirkungen in Tumoren existiert ein großes Interesse an der Entwicklung von Therapeutika, die auf verschiedene Weise diese Wirkungen beeinflussen könnten. Mittlerweile ist der CXCR4-Antagonist Plerixafor für die Behandlung von Patienten mit Non-Hodgkin's Lymphomen oder Multiplen Myelomen zugelassen. In Kombination mit dem *Granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) bewirkt er die

Freisetzung von Stammzellen aus dem Knochenmark in die Blutbahn zum Zweck der Stammzellisolierung für Stammzelltransplantationen (Keating 2011). Weitere Chemokin-Inhibitoren befinden sich in klinischen Studien (Debnath et al. 2013; Vela et al. 2015).

1.1.1 Transmembrane Chemokine

Im Gegensatz zu der großen Mehrheit der Chemokine werden CX3CL1 und CXCL16 als Typ I-Membranproteine exprimiert. An die extrazelluläre N-terminale Chemokindomäne schließt sich ein glykosylierter Mucin-ähnlicher Stiel an, auf den eine Transmembrandomäne folgt. C-terminal befindet sich die intrazelluläre Domäne (Abb. 1.2) (Bazan et al. 1997; Matlobian et al. 2000). Durch Proteasen wie ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*) 10 und ADAM17 können die transmembranen Chemokine in eine lösliche Form umgewandelt werden (Ludwig et al. 2005a). Aufgrund dieser Besonderheiten werden die transmembranen Chemokine im Rahmen dieser Arbeit genauer betrachtet.

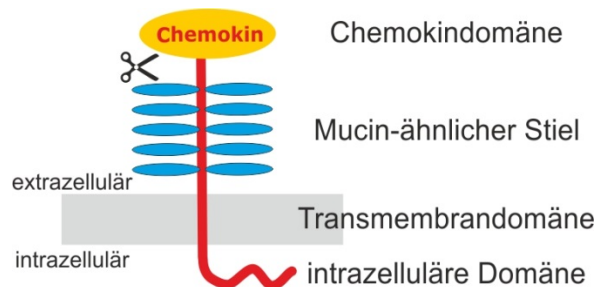


Abb. 1.2: Schematischer Aufbau eines transmembranen Chemokins. Im Cytosol befindet sich C-terminal die intrazelluläre Domäne, auf die die Transmembrandomäne folgt. Auf der Zellmembran befindet sich anschließend ein Mucin-ähnlicher Stiel und N-terminal die Chemokindomäne.

CX3CL1

1997 wurde CX3CL1 als erstes transmembranes Chemokin von zwei unabhängigen Forschungsgruppen entdeckt (Bazan et al. 1997; Pan et al. 1997). CX3CL1 ist auch unter den Namen Fractalkine (Bazan et al. 1997) und Neurotactin (Pan et al. 1997) bekannt, wobei sich ersteres für die humane und letzteres für die murine Variante durchgesetzt hat.

Das reife Protein hat eine Länge von 373 Aminosäuren. Diese verteilen sich auf eine extrazelluläre Chemokindomäne (76 Aminosäuren), die auf einem Mucin-ähnlichen Stiel (241 Aminosäuren) sitzt. Dieser weist eine starke O-Glykosylierung an Serin- und Threoninresten auf und dient als Abstandshalter zwischen der Chemokindomäne und der Zellmembran. Auf den Mucin-ähnlichen Stiel folgt eine aus 21 Aminosäuren bestehende Transmembrandomäne. C-Terminal schließt das Typ-I-Membranprotein mit einer intrazellulären Domäne (35 Aminosäuren) ab (Bazan et al. 1997). Die intrazelluläre Domäne enthält ein SH2 (*Src homology 2*)-Bindungsmotiv (YIPR) sowie ein Phosphorylierungsmotiv der Caseinkinase I (SCGS; S/T-XX-S/T (Watts et al. 1999)).

Die Proform von CX3CL1 enthält zusätzlich eine N-terminale Signalsequenz (24 Aminosäuren). Diese führt zur Translokation in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Von

dort wird CX3CL1 mittels vesikulären Transports über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Die mature Form hat ohne Glykosylierung ein Molekulargewicht von 40 kDa. Das beobachtete Gewicht des reifen Proteins liegt aufgrund der starken Glykosylierung der Mucin-ähnlichen Domäne deutlich höher (ca. 95 kDa).

Neben der transmembranen Form von CX3CL1 existiert zudem eine lösliche Variante. Diese entsteht durch Spaltung durch die Proteasen ADAM10 und ADAM17 (Garton et al. 2001; Hundhausen et al. 2003) sowie durch Spaltung mit Cathepsin S, einer lysosomalen Cystein-Protease (Clark et al. 2007). Während ADAM10 vornehmlich bei der konstitutiven Freisetzung von CX3CL1 eine Rolle spielt (Hundhausen et al. 2003), ist ADAM17 insbesondere für die inflammatorisch induzierte Spaltung verantwortlich (Tsou et al. 2001). Daraus resultiert eine ca. 80 kDa große lösliche CX3CL1 Variante (Ludwig et al. 2002), dass in der Membran verbleibende Fragment wird durch γ -Sekretasen degradiert (Schulte et al. 2007). Durch die Spaltung mit Cathepsin S entsteht hingegen ein 55 kDa großes lösliches CX3CL1-Fragment (Fonovic et al. 2013). Hoover und Kollegen zeigten mittels Röntgenstrukturanalyse weiterhin, dass lösliches CX3CL1 dimerisieren und so an Heparin binden kann (Hoover et al. 2000).

CX3CL1 wird von vielen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert (Ferretti et al. 2014). Die Expression erfolgt dabei sowohl konstitutiv als auch Zytokin-induziert, somit zählt CX3CL1 zu den bifunktionellen Chemokinen. Eine konstitutive Expression wurde unter anderem in Geweben wie Herz, Lunge, Niere, Prostata und Darm nachgewiesen (Bazan et al. 1997). Ebenso in Kardiomyozyten und den glatten Muskelzellen der Blutgefäße (Ludwig and Weber 2007). Weiterhin zeigten Lymphozyten, Dendritische Zellen der Epidermis und lymphoide Organe eine CX3CL1-Expression (Papadopoulos et al. 1999; Foussat et al. 2000; Corcione et al. 2012). Zudem ist CX3CL1 das Chemokin mit der größten Bedeutung im zentralen Nervensystem. So wird es konstitutiv von Neuronen und Astrozyten, aber nur schwach von Mikrogliazellen exprimiert (Harrison et al. 1998; Nishiyori et al. 1998; Hatori et al. 2002; Hulshof et al. 2003). Neben der konstitutiven Expression kann die Expression von CX3CL1 auch durch inflammatorische Stimuli kontrolliert werden. So wird in primären Endothelzellen die Expression durch die pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interferon γ (IFN γ) und Interleukin-1 (IL-1) sowie durch Lipopolysaccharid (LPS) hochreguliert. Eine Inhibition der Expression entsteht durch die lösliche Form des IL-6-Rezeptor- α , das 15-Desoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ sowie Hypoxie (Imaizumi et al. 2004). Ein expressionssteigernder Effekt durch TNF α und IFN γ konnte ebenfalls in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Ludwig et al. 2002). Zudem wurde in Makrophagen eine Induktion der CX3CL1-Expression durch Stimulation mit Interleukin-4 und Interleukin-13 beschrieben (Greaves et al. 2001). Weiterhin induziert p53 die Transkription von CX3CL1 *in vitro* (Shiraishi et al. 2000).

Über die spezifischen Reste Lysin-7 und Arginin-47 der Chemokindomäne des CX3CL1 wird die Bindung des Liganden an den Rezeptor CX3CR1 vermittelt, dies wiesen Harrison und Kollegen mittels Mutationsanalysen nach (Harrison et al. 2001). CX3CR1 ist ein klassischer G-Protein gekoppelter Rezeptor mit 7 Transmembrandomänen (Imai et al. 1997). Er wird auf Monozyten, Dendritischen Zellen, T-Zellsubpopulationen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und B-Zellen exprimiert (Imai et al. 1997; Corcione et al. 2009). Im ZNS wurde CX3CR1 auf Mikrogliazellen und im geringeren Ausmaß auf Neuronen nachgewiesen, Astrozyten exprimieren den Rezeptor nicht (Hatori et al. 2002). In Mikrogliazellen wird die CX3CR1-Expression durch die anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β induziert (Chen et al. 2002). Neben dem spezifischen Chemokinrezeptor CX3CR1 bindet CX3CL1 zusätzlich an das vom Cytomegalo-Virus codierte Chemokinrezeptor-ähnliche Molekül US28, das einen funktionalen Chemokin-bindenden Rezeptor darstellt (Vomaske et al. 2009).

Sowohl die lösliche als auch die transmembrane Variante von CX3CL1 können an den Rezeptor binden und vermitteln dabei unterschiedliche Effekte. Lösliches CX3CL1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten, NK-Zellen, Mikroglia, T- und B-Lymphozyten (Bazan et al. 1997; Imai et al. 1997; Harrison et al. 1998; Corcione et al. 2012), aber auch auf Tumorzellen, die den Rezeptor exprimieren (Shulby et al. 2004; Andre et al. 2006; Mauri et al. 2012). So setzen beispielsweise Lymphozyten während der Apoptose CX3CL1 frei, welches als Botenstoff für Makrophagen dient, die wiederum die Zellreste phagozytieren (Truman et al. 2008). Zudem bewirkt CX3CL1 eine autokrine, NF κ B-abhängige Proliferationssteigerung in glatten Muskelzellen (Chandrasekar et al. 2003). Weiterhin fördert es die Röhrenbildung und Proliferation von HUVEC-Zellen (Lee et al. 2006). Die membranständige Form des CX3CL1 vermittelt Zelladhäsion, insbesondere unter physiologischen Fließbedingungen (Imai et al. 1997; Fong et al. 1998). CX3CL1 spielt dadurch eine Rolle beim *Rolling* und der Translokation von Leukozyten durch das Endothel. Synergistische Effekte treten dabei unter anderem mit ICAM-1 und VCAM-1 auf (Umehara et al. 2001; Kerfoot et al. 2003). Zudem ist membranständiges, endotheliales CX3CL1 in der Lage die IFN γ -Produktion in NK-Zellen zu induzieren, wodurch ein Rückkopplungseffekt entsteht, durch den mehr CX3CL1 in den Endothelzellen gebildet wird (Yoneda et al. 2003). Im ZNS kontrolliert CX3CL1 die Aktivität und das Überleben von Mikrogliazellen (Harrison et al. 1998; Boehme et al. 2000). Zudem wurde vielfach eine neuroprotektive Wirkung beschrieben (Meucci et al. 2000; Mizuno et al. 2003; Limatola et al. 2005; Cardona et al. 2006).

Obwohl CX3CL1 bei entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle spielt, traten bei Mäusen mit gezielt ausgeschaltetem Gen für den Liganden oder Rezeptor keine deutlichen Abnormalitäten im Phänotyp auf (Jung et al. 2000; Cook et al. 2001).

Eine erhöhte Expression von CX3CL1 ist in vielen pathologischen Prozessen von Bedeutung (Umehara et al. 2004). Die daraus resultierende überhöhte Aktivität von Leukozyten führt zur Zerstörung des betroffenen Gewebes (Gerard and Rollins 2001; Umehara et al. 2001). Eine Überexpression von CX3CL1 wurde bei koronaren Arterienerkrankungen (Yoneda et al. 2000) sowie in Gefäßen von Arteriosklerose-Patienten und Diabetikern (Wong et al. 2002) nachgewiesen. Weiterhin spielt es eine Rolle bei vielen Nierenerkrankungen (Glomerulonephritis, Nierentumore und Nierentransplantate) (Furuichi et al. 2001; Cockwell et al. 2002; Durkan et al. 2007). Eine erhöhte CX3CL1-Expression kommt zudem bei Transplantatabstoßungen (Robinson et al. 2000), HIV (Foussat et al. 2001) und akuter Hepatitis (Efsen et al. 2002) vor. Ebenso spielt CX3CL1 eine wichtige Rolle bei Th1-dominierten entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (Ruth et al. 2001) und Psoriasis (Raychaudhuri et al. 2001). Auch in neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson (Lee et al. 2010; Cho et al. 2011), Alzheimer (Cardona et al. 2006; Morganti et al. 2012) und HIV-Demenz (Chapman et al. 2000; Limatola et al. 2005) ist CX3CL1 involviert. Wobei CX3CL1 in diesen Erkrankungen sowohl neuroprotektive als auch neurodegenerative Auswirkungen zeigt. Auch in vielen Tumorentitäten werden CX3CL1 und/oder CX3CR1 überexprimiert. Beispielsweise in Gliomen, Neuroblastomen, Prostata-, Pankreas- oder Mammakarzinomen (Ferretti et al. 2014).

Wie für viele andere Proteine auch bekannt, können Mutationen in pathologischen Prozessen eine Rolle spielen. Durch Einzelnukleotid-Polymorphismen im Gen des Rezeptors (CX3CR1-V249I/T280M) entsteht eine geringere Affinität des Liganden zum Rezeptor. Somit können Monozyten schlechter an das vaskuläre Endothel binden, wodurch das Risiko entzündlicher Erkrankungen, wie koronare Arterienerkrankungen und Arteriosklerose, reduziert wird (McDermott et al. 2001; Moatti et al. 2001; McDermott et al. 2003).

CXCL16

Das humane transmembrane Chemokin CXCL16 wurde im Jahr 2000 als *Scavenger-Rezeptor* für oxidiertes *Low density-Lipoprotein* (oxLDL) und Phosphatidylserin entdeckt (Matloubian et al. 2000; Shimaoka et al. 2000; Wilbanks et al. 2001). Das 254 Aminosäure lange Membranprotein ist auch unter dem Namen SR-PSOX bekannt (Shimaoka et al. 2000). Die 273 Aminosäuren lange Proform enthält zudem N-terminal ein hydrophobes Signalpeptid (Wilbanks et al. 2001). Extrazellulär befindet sich im maturen Protein die aus 95 Aminosäuren bestehende Chemokindomäne. Diese enthält sechs Cysteinreste, was für CXC-Chemokine ungewöhnlich ist, sondern bis dato nur mit CC-Chemokinen in Verbindung gebracht wurde (Matloubian et al. 2000; Shimaoka et al. 2000). Die Chemokindomäne sitzt auf einem Mucin-ähnlichen Stiel (110 Aminosäuren), der hochgradig O-glykosyliert ist. Anschließend folgt eine ca. 20 Aminosäuren lange Transmembrandomäne. C-Terminal

befindet sich eine intrazelluläre Domäne (28 Aminosäuren) (Matloubian et al. 2000; Umehara et al. 2004). Diese enthält ein potenzielles Tyrosinphosphorylierungsmotiv und somit SH2-Bindungsmotiv (YIPV). Zudem enthält die intrazelluläre Domäne ein Caseinkinase I-Motiv (SPQS) (Matloubian et al. 2000). Das Molekulargewicht der maturen Form liegt ohne Glykosylierung bei 24 kDa. Aufgrund der starken Glykosylierung des reifen Proteins ist das beobachtete Molekulargewicht deutlich größer und beträgt ca. 60 kDa. Das CXCL16-Gen befindet sich auf Chromosom 17p13 und liegt somit separiert von allen bekannten Chemokingenloki (Matloubian et al. 2000).

Neben der membranständigen Form kann CXCL16 durch die Proteasen ADAM10 und ADAM17 in eine lösliche Form (35 kDa) überführt werden (Abel et al. 2004; Ludwig et al. 2005a), diese setzt sich aus der Chemokindomäne und einem Teil des Mucin-ähnlichen Stiels zusammen (Matloubian et al. 2000). ADAM10 spaltet CXCL16 sowohl konstitutiv als auch inflammatorisch induziert (Abel et al. 2004; Gough et al. 2004; Hundhausen et al. 2007), ADAM17 hingegen nur nach Induktion durch inflammatorische Stimuli (Ludwig et al. 2005b). Das in der Zellmembran verbleibende Fragment wird durch γ -Sekretasen proteolytisch abgebaut (Schulte et al. 2007).

CXCL16 wurde *in situ* auf Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur nachgewiesen. Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Expression in diesen Zellen durch proinflammatorische Stimuli wie IFN γ und TNF α hochreguliert wird (Abel et al. 2004). Zudem wird CXCL16 von Epithelzellen, Keratinozyten und Astrogliazellen konstitutiv exprimiert (Ludwig and Weber 2007). In Astrozyten kann es ebenfalls zu einer entzündungsbedingten Induktion kommen. Weiterhin wird CXCL16 in Gliomen und Schwannomen überexprimiert (Ludwig et al. 2005b).

Der spezifische Rezeptor von CXCL16 ist CXCR6, auch bekannt als Bonzo/TYMSTR/STRL33, und wurde als HIV-Corezeptor entdeckt (Deng et al. 1997; Liao et al. 1997; Unutmaz et al. 2000). CXCR6 wird auf CD4 positiven Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, klassischen NKT-Zellen, Zellen der glatten Muskulatur und Knochenmarksplasma-Zellen exprimiert (Unutmaz et al. 2000; Geissmann et al. 2005). Durch Interleukin-2 und Interleukin-15 erfolgt eine Steigerung der Expression von CXCR6 in CD25RO positiven Gedächtnis-T-Zellen (Unutmaz et al. 2000).

In der löslichen Form wirkt CXCL16 chemotaktisch auf T-Zellen, Knochenmarksplasma-Zellen und klassischen NKT-Zellen (Matloubian et al. 2000; Wilbanks et al. 2001; Johnston et al. 2003; Nakayama et al. 2003). Zudem bewirkt es die Proliferation und Röhrenbildung von HUVEC-Zellen (Zhuge et al. 2005) sowie die Zytokinproduktion und die Zellproliferation von vaskulären Zellen (Chandrasekar et al. 2004). Von den Epithelzellen der Darmlymphgefäße exprimiertes CXCL16 dient zudem dem *Homing* von T-Zellen (Hase et al. 2006). In der Leber führt die Interaktion von CXCL16 und CXCR6 zum Überleben von patrouillierenden NKT-

Zellen (Geissmann et al. 2005). Weiterhin beeinflusst CXCL16 die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (Gursel et al. 2006). In der membranständigen Form spielt CXCL16 eine Rolle bei der Zelladhäsion von CXCR6 exprimierenden Zellen unter Fließbedingungen (Shimaoka et al. 2004). Zudem bindet es spezifisch oxLDL mit hoher Affinität, woraufhin der Komplex internalisiert und degradiert wird (Shimaoka et al. 2000).

Eine Überexpression von CXCL16 wurde mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, unter anderem mit Arteriosklerose (Ludwig and Weber 2007), chronischen Lebererkrankungen (Wehr et al. 2014), Morbus Crohn (Diegelmann et al. 2010), Psoriasis (Oh et al. 2009) sowie renale und kardiovaskuläre Erkrankungen (Izquierdo et al. 2014). Zudem spielt CXCL16 eine Rolle bei Rheumatoider Arthritis (Nanki et al. 2005) und bei HIV-Infektionen (Landro et al. 2009). Weiterhin dient CXCL16 als Kennzeichen für Entzündungen und akutes Koronarsyndrom (Lehrke et al. 2007). Eine deutliche Überexpression ist zudem in vielen Tumorentitäten (z.B. Kolorektalkarziom, Glioblastom, Pankreas- oder Prostatakarzinom) zu finden (Ludwig et al. 2005b; Wente et al. 2008; Darash-Yahana et al. 2009; Verbeke et al. 2011). Hieraus ergibt sich eine wichtige Rolle bei der Progression und Metastasierung von Tumoren (Deng et al. 2010).

1.2 Interzelluläre Kommunikation - Signaltransduktion

In einem multizellulären Organismus müssen einzelne Zellen, Zellverbände, Gewebe und Organe ihre Aktivitäten aufeinander abstimmen, um zum Wohle des gesamten Organismus zu agieren. Dies geschieht durch verschiedene Signalmodalitäten. Sezernieren Zellen den Botenstoff oder Liganden in die Blutbahn, worüber dieser an seinen Wirkungsort transportiert werden kann, bezeichnet man den Vorgang als endokrine Signaltransduktion. Bei den Botenstoffen handelt es sich hierbei um Hormone (Löffler et al. 2014). Erfolgt die Wirkung des Botenstoffs in unmittelbarer Nähe der sezernierenden Zelle, handelt es sich um parakrine Signaltransduktion. Wachstumsfaktoren, wie *Epidermal Growth Factor* (EGF) oder *Transforming Growth Factor-beta* (TGF β), wirken nach diesem Prinzip (Lazar-Molnar et al. 2000). Handelt es sich bei dem Liganden um ein membranständiges Protein, wird die Signaltransduktion als juxtakrin bezeichnet. Beispielsweise TNF α , aber auch die transmembranen Chemokine können so Signale vermitteln (Pan et al. 1997; Baram et al. 2001). Exprimiert eine Zelle sowohl den Liganden als auch den entsprechenden Rezeptor kann es zu einer autokrinen Signaltransduktion kommen. Viele Tumore nutzen diesen Mechanismus, um sich selbst mit verschiedenen Faktoren, wie Wachstumsfaktoren und Matrixmetalloproteinasen, zu versorgen (Lazar-Molnar et al. 2000; Ruan and Lai 2004). Da die Botenstoffe sowohl auf umliegende als auch auf die sezernierende Zellen wirken können, sind die Übergänge zwischen auto- und parakriner Signaltransduktion fließend.

Die Einteilung der Botenstoffe kann zudem aufgrund ihrer Fähigkeit durch Membranen zu gelangen erfolgen. Lipophile Moleküle sind in der Lage die Zellmembran zu passieren und mit intrazellulären Rezeptoren zu interagieren oder direkt als Transkriptionsfaktor zu wirken (Reichel and Jacob 1993). Hydrophile Moleküle können die Zellmembran nicht durchdringen und müssen ihre Signale über membranständige Rezeptoren, beispielsweise G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptor-Tyrosinkinasen, vermitteln (Löffler et al. 2014). Aufgrund der verschiedenen von der Zelle exprimierten Rezeptoren ergibt sich ein komplexes Bild der Signaltransduktion, zumal sich die einzelnen Signalwege auch überschneiden oder gegenseitig regulieren können (Abb. 1.3).

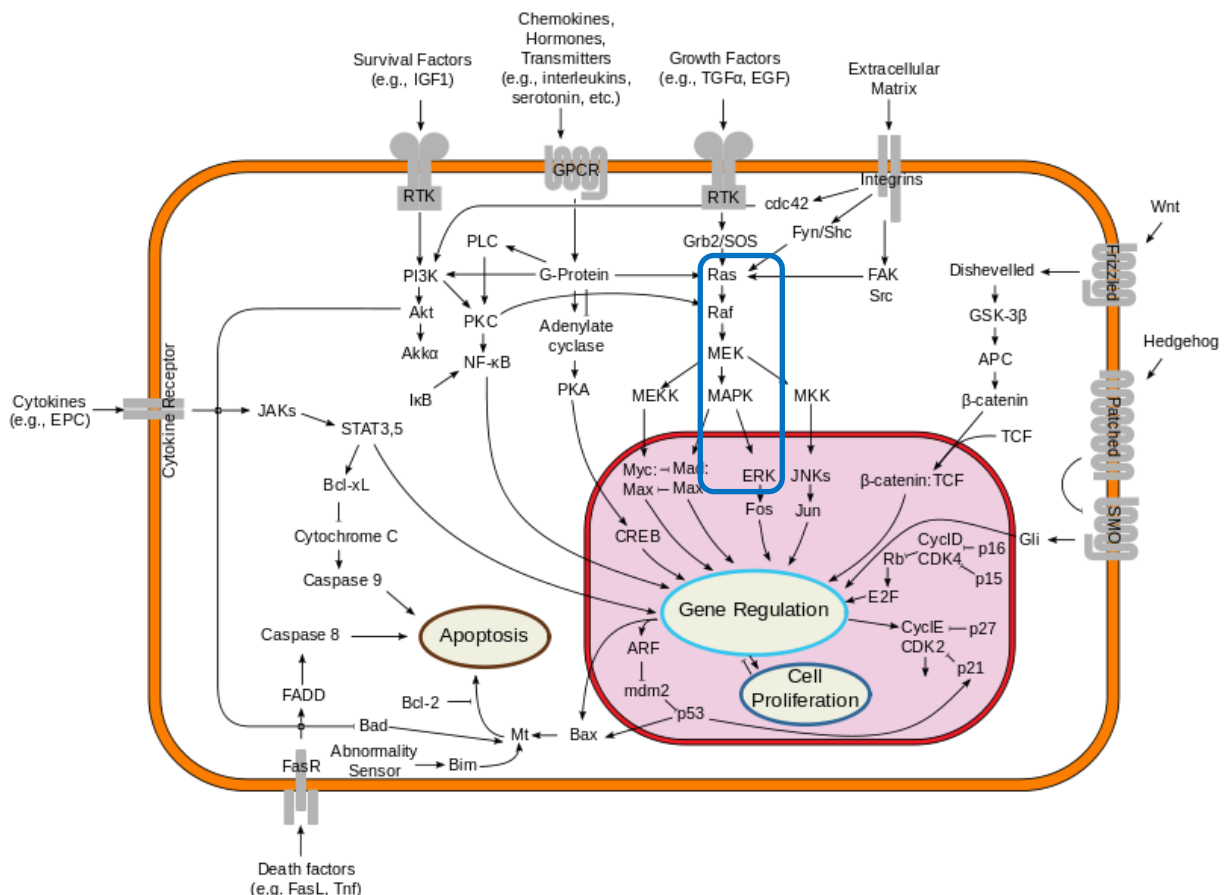


Abb. 1.3: Signaltransduktionswege. Vereinfachte Darstellung des Signalnetzwerks einer Zelle. Hervorgehoben ist der MAP-Kinase-Weg. (Camacho and Pienta 2012)

In der bisher beschriebenen Informationsübermittlung wurde eine monodirektionale Kommunikation angenommen, bei der nach Bindung des Liganden an den Rezeptor es zu einem Signal in der rezeptortragenden Zelle kommt. Bei einer juxtakrinen Signaltransduktion, also einem transmembranen Liganden, können zusätzlich Signale in die ligandentragende Zelle übermittelt werden. Diese Variante der bidirektionalen Kommunikation zwischen Zellen wird als reverse Signaltransduktion bezeichnet (Abb. 1.4).

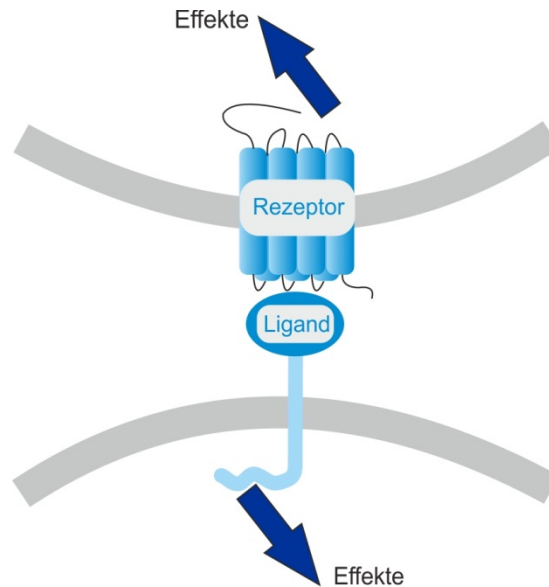


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der reverse Signaltransduktion. Vereinfachte Darstellung der bidirektionalen Kommunikation zwischen zwei Zellen, wobei sowohl in die rezeptor- als auch in die ligandentragende Zelle Signale vermittelt werden und Effekte entstehen. Die Signalvermittlung über den eigentlichen Liganden wird als reverse Signaltransduktion bezeichnet.

Entdeckt wurde die reverse Signaltransduktion für membranständiges TNF α durch Stimulation mit einem spezifischen Antikörper (Ferran et al. 1994). Mittlerweile ist sie für mehrere Mitglieder der TNF-Superfamilie, für Semaphorine und Ephrine beschrieben (Eissner et al. 2004; Toyofuku et al. 2004; Klein 2009). Die meisten Liganden der TNF-Superfamilie können als klassische lösliche Zytokine aber auch als Transmembranproteine des Typs II vorkommen, wobei beide Formen als Trimer aktiv sind (Bremer 2013). Innerhalb der TNF-Superfamilie umfasst die reverse Signaltransduktion neben direkter Stimulation auch costimulatorische Einflüsse. Zudem spielt sie eine Rolle bei der Desensibilisierung und Migration von Leukozyten. Hieraus ergibt sich eine weitere Möglichkeit der Feinabstimmung der adaptiven Immunabwehr. So führt membranständiges TNF α beispielsweise zur Aktivierung von T-Zellen nach Bindung an eine rezeptortragende Zelle (Harashima et al. 2001). Zudem kann die angeborene Immunität über Rückkopplungsmechanismen reguliert werden. Beispielsweise verfallen Monozyten nach Bindung des TNF α -Rezeptors auf Endothelzellen in Anergie (Eissner et al. 2000). Im Nervensystem ist die reverse Signaltransduktion der Semaphorine von großer Bedeutung, insbesondere bei der Zielführung von Zellen und deren Abstoßung (Yu et al. 2010). Die reverse Signaltransduktion der Ephrine reguliert vor allem die Zelladhäsion und Differenzierung bei der Bildung von Synapsen, aber auch bei der Modellierung von Knochen (Klein 2009; Matsuo and Otaki 2012). Somit ergibt sich aus der reversen Signaltransduktion ein wichtiger Feinabstimmungsmechanismus, der insbesondere im Immun- und Nervensystem, aber auch bei Entwicklungsprozessen eine entscheidende Rolle spielt.

Die transmembranen Liganden nutzen zur Informationsübermittlung viele verschiedene Signalwege. Beispielsweise vermittelt membranständiges TNF α eine LPS-Resistenz in Monozyten über die Aktivierung des MAP-Kinase/ERK-Signalwegs (Kirchner et al. 2004). Bei den *Mitogen-activated-protein*-Kinasen (MAP-Kinasen; MAPK) handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen. Sie werden durch diverse extra- und intrazelluläre Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone oder oxidativer Stress, aktiviert und regulieren unter anderem die Proliferation, Migration und Differenzierung sowie das Überleben von Zellen (Kim and Choi 2010). Die MAPK-Familie besteht aus der *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK), p38 und *c-Jun NH₂-terminal Kinase* (JNK), wobei jedes dieser Enzyme in mehreren Isoformen existiert (Schaeffer and Weber 1999; Dhillon et al. 2007). Der MAPK-Signalweg besteht aus mindestens drei Komponenten. Einer MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K), die die MAPK-Kinase (MAP2K) phosphoryliert und aktiviert, welche wiederum die MAPK phosphoryliert. Die aktivierte MAPK phosphoryliert ihrerseits weitere Proteine, unter anderem Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 oder c-Jun (Kim and Choi 2010). Aufgrund des Einflusses auf die Proliferation, Migration und das Überleben von Zellen spielen Veränderungen und Fehlregulationen der MAPK-Wege in vielen Krankheiten und insbesondere der Tumorprogression eine Rolle (Dhillon et al. 2007; Kim and Choi 2010). Auch für Chemokine spielt der MAPK-Weg eine wichtige Rolle. So vermittelt beispielsweise die CXCR7/CXCL12-Achse das Überleben und die Chemotaxis von T-Zellen über ERK 1/2 (Kumar et al. 2012) und auch die transmembranen Chemokine CX3CL1 und CXCL16 können ihre Wirkung über die MAP-Kinase ERK vermitteln (Hattermann et al. 2008; Volin et al. 2010).

1.3 Arbeitshypothese

Die Kommunikation zwischen Zellen erfolgt über diverse endo-, para- und autokrine Mechanismen. Eine Form der bidirektionalen Zell-Zell-Kommunikation ist die reverse Signaltransduktion, bei welcher transmembrane Liganden nach Bindung ihrer Rezeptoren ihrerseits ein Signal in der liganden-tragenden Zelle erzeugen (Bspw. TNF α – TNF α -Rezeptor oder Ephrine – Ephrin-Rezeptor). In unserer Arbeitsgruppe wurden Hinweise auf einen neuen para- und autokrinen Mechanismus gefunden, den wir als inverse Signaltransduktion bezeichneten. Hierbei wird das Signal durch ein zuvor proteolytisch von der Zellmembran gelöstes Chemokin ausgelöst, indem dieses an ein weiteres, noch membranständiges, Chemokin bindet. Das transmembrane Molekül fungiert dabei als Rezeptor und vermittelt die Signale über Phosphorylierungsmotive in seiner intrazellulären Domäne. Zufällig wurde diese Form der Signaltransduktion bei der Untersuchung der transmembranen Chemokine CXCL16 und CX3CL1 und deren Rolle in der Tumorentstehung, -progression und -metastasierung entdeckt. Im Rahmen der vorliegenden

Arbeit sollte die Hypothese der inversen Signaltransduktion anhand der transmembranen Chemokine genauer untersucht werden. Neben dem Nachweis von biologischen Effekten, sollte auch die Bindung des löslichen Chemokins an die entsprechende transmembrane Variante gezeigt werden. Zudem sollten Transfektions- und Mutationsexperimente die Hypothese belegen und die Signalvermittlung genauer beschreiben. Mögliche weitere Rezeptoren für die Signalübertragung sollten durch Inhibitions- und Expressionsanalysen ausgeschlossen werden.

Allgemein soll diese Arbeit durch die inverse Signaltransduktion einen Beitrag zur Erklärung des Vorkommens von transmembranen Chemokinen, insbesondere in Tumoren, leisten. Zudem soll eine grundlegende Vorarbeit für die inverse Signaltransduktion weiterer Liganden erbracht werden, für welche zum Teil schon die reverse Signaltransduktion nachgewiesen wurde.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, D
Autoklav 5050 ELV	Tuttnauer Systec, Breda, NL
Chemilumineszenzdetektor Fusion SL	Peqlab, Erlangen, D
CO ₂ -Inkubator	Memmert, Schwabach, D
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, D
FACSCanto™ System	BD Biosciences, Heidelberg, D
Fluoreszenzspektrophotometer F-2000	Hitachi, Tokio, J
Großschüttler Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, D
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Inkubationsschüttler Innova 4200	New Brunswick Scientific, San Francisco, USA
Laborgebläse Typ 5018	Privileg, Stuttgart, D
Magnetrührer IKAMAG®RET-G	IKA-Werk, Staufen, D
Mikroplattenleser Epoch	BioTek, Bad Friedrichshall, D
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena, D
Fluoreszenzkamera AxioCam MRm	Zeiss, Jena, D
Lichtmikroskop CK2	Olympus, Hamburg, D
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim, D
pH-Meter	Krick, Langenselbold, D
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg, D
Präzisionswaage ED822-CW	Sartorius, Göttingen, D
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Kammer	Bio-Rad, München, D
<i>Real-Time</i> PCR-Cycler ABI PRISM 7500 Fast	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Trans-Blot® Turbo™ Blotting System	Bio-Rad, München, D
Spannungsquelle EPS1001	Amersham pharmacia biotech, Nümbrecht, D
Sterilwerkbank HeraSafe (Zellen)	Heraeus, Hanau, D
Sterilwerkbank TC72 (Bakterien)	Gelaire, Sydney, AUS
Take3™ Multi-Volume Plate	BioTek, Bad Friedrichshall, D
Thermocycler T1	Biometra, Göttingen, D
Transferpette® (10-100 µl)	Brand, Wertheim, D
Vortex VF2	IKA-Werk, Staufen, D
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau, D
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, D

Zentrifugen:

Sorvall®-RC-5B	DuPont Instruments, Hamm, D
Biofuge pico	Heraeus, Hanau, D
Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, D
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-Loch-Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
96-Loch-Platten (MaxiSorp®, ELISA)	Nunc™/Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, D
96-Loch-Platten (<i>Real-Time</i> -RT-PCR)	Applied Biosystems, Darmstadt, D
96-Loch-Platten (Zellkultur)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Amincon Ultrafiltrationszelle	Millipore, Darmstadt, D
Amincon YM 10-Membran	Millipore, Darmstadt, D
Deckgläschen (24x12 mm)	Hecht-Assistent, Sondheim, D
Deckgläschen (24x60 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Finntip Pipetten (1-5 ml)	ROTH, Karlsruhe, D
Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München, D
Kosmetiktücher	Igefa, Ahrensfelde, D
Kryoröhrchen (2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Latex-Handschuhe	ROTH, Karlsruhe, D
MicroSpin™-G25-Säule	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Nitril-Handschuhe	ROTH, Karlsruhe, D
Objektträger (<i>superfrost</i>)	ROTH, Karlsruhe, D
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Petrischalen (92x16 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Präzisionstücher Kimtech Science	Kimberly-Clark, Roswell, USA
PVDF-Membran	GE Healthcare, München, D
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterile Pipetten (10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterile Plastikröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterile Spritzen (10 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht, D
<i>Whatman</i> Papiere	GE Healthcare, München, D
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

2.1.3 Chemikalien

Ac-DEVD-AMC (AMC = 7-Amino-4-Methylcoumarin)	Bachem, Bubendorf, Ch
Acrylamid	Serva, Heidelberg, D
Agar	Invitrogen, Darmstadt, D
Ammoniumperoxidsulfat	Serva, Heidelberg, D
Ampicillin	ROTH, Karlsruhe, D
Araldit	Fluka/ Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bovines Serumalbumin	Biomol, Hamburg, D
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Camptothecin	Biomol, Hamburg, D
CHAPS	Biomol, Hamburg, D
Chloroform	ROTH, Karlsruhe, D
Cy3-NHS-Ester	GE Healthcare, München, D
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
dNTP-Mix	Fermentas, St. Leon-Roth, D
EDTA	ROTH, Karlsruhe, D
Eindeckmedium (Immu-Mount)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, D
Ethanol	ROTH, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum Gold (FCS)	PAA, Pasching, A
Gentamycin-418 Sulfat	Calbiochem, Darmstadt, D
Glucose	Merck, Darmstadt, D
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, D
Glycerin	ROTH, Karlsruhe, D
Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glycin	ROTH, Karlsruhe, D
Goldchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Hefeextrakt	ROTH, Karlsruhe, D
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Isopropanol	ROTH, Karlsruhe, D
Kaliumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamin	Merck, Darmstadt, D
Lipofectamin	Invitrogen, Darmstadt, D

Magnesiumchlorid	Fluka/ Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Methanol	ROTH, Karlsruhe, D
Milchpulver	Reformhaus
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natronlauge (1 N)	ROTH, Karlsruhe, D
Natriumvanadat	Simga-Aldrich, Steinheim, D
Osmium	Merck, Darmstadt, D
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
Penicillin/Streptomycin (GIBCO®)	Invitrogen, Darmstadt, D
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Poly-D-Lysin (PDL)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Quiazol® Lysis Reagent	Quiagen, Hilden, D
Random-Hexamer-Primer	Fermentas, St. Leon-Roth, D
<i>RQ1 DNase Stop Solution</i>	Promega, Mannheim, D
Salzsäure (1 N)	ROTH, Karlsruhe, D
SOC-Medium	Invitrogen, Darmstadt, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D
TEMED	ROTH, Karlsruhe, D
Temozolomid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Triethanolamid-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tris	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Triton X-100	Merck, Darmstadt, D
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypsin (aus bovinem Pankreas)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypton/Pepton	ROTH, Karlsruhe, D
TurboFect	Fermentas, St. Leon-Roth, D
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

2.1.4 Puffer

<i>5x Reaction Buffer for M-MuLV RT</i>	Fermentas, St. Leon-Roth, D
Dissoziationslösung	24 mg HEPES, 20 mg Trypsin, 2 mg EDTA In 10 ml DMEM-Medium lösen, steril filtrieren
Gelpuffer I (Trenngel)	1,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8

Gelpuffer II (Sammelgel)	0,5 M Tris, 0,4% SDS, pH 6,8
LB-Agar	5 g NaCl, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g Trypton/Pepton, 7,5 g Agar, 500 ml H ₂ O, pH 7
LB-Medium	5 g NaCl, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g Trypton/Pepton, 500 ml H ₂ O, pH 7
Lysispuffer (Western Blot)	50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7,8. Vor Verwendung: 2 mM Natriumvanadat, 1 mM Glycerolphosphat
Lysispuffer (Caspaseaktivitätsmessung)	100 mM NaCl, 0,1% CHAPS, 10 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA, 10% Glycerol, 50 mM Hepes, pH 7,4
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 1,26 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O → ad 1 l H ₂ O, pH 7,4
<i>RQ1 DNase 10x Reaction buffer</i>	Promega, Mannheim, D
SDS-Probenpuffer	0,23 g SDS in 7,7 ml dest. H ₂ O, 1,25 ml Gelpuffer II, 1 ml Glycerin, 50 µl 1 M DTT
SDS-Laufpuffer	15,2 g Tris, 72 g Glycin, 5 g SDS → ad 5 l dest. H ₂ O, pH ~ 8,25
TBST	20 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Tween 20, pH 8,0
Transferpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 10% Methanol, pH ~ 9
Trypsin/EDTA	0,1% Trypsin in PBS, 0,02% EDTA

Waschpuffer (Elektronenmikroskopie) 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂,
1 mM MgCl₂, 20 mM Glucose, 20mM
HEPES pH 7,4 + 1% BSA und 1%
Pferdeserum

2.1.5 Verwendete Kits

<i>Cell Proliferation Reagent WST-1</i>	Roche, Grenzach-Wyhlen, D
Fluorokine [®] Human CX3CL1/Fractalkine	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>GeneJET Plasmid Miniprep Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, D
Human CX3CL1/Fractalkine DuoSet [®]	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate</i>	Millipore, Darmstadt, D
<i>One-Step Antibody Biotinylation Kit</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
<i>Pierce[®] Fab Micro Preparation Kit</i>	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, D
Qiagen [®] Plasmid Midi Kit	Quiagen, Hilden, D
<i>QuikChange[®] Lightning Site-directed Mutagenesis Kit</i>	Agilent Technologies, Böblingen, D
<i>ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution</i>	Millipore, Darmstadt, D
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
TMB Substrate Kit	Pierce Biotechnology/Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, D

2.1.6 Proteine und Enzyme

Alexa Fluor [®] 488- <i>conjugated</i> Streptavidin	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
<i>DpnI</i> (Kat.-Nr.: ER1701)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Immunglobulinfraktion des normalen Kaninchenserums	Dako, Hamburg, D
<i>PageRuler™ Prestained Proteinladder</i>	Fermentas, St. Leon-Roth, D
Protein-A-Agarose (Kat.-Nr.: sc-2001)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Revert Aid [™] H Minus Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Roth, D
rhCX3CL1, Chemokindomäne (Kat.-Nr.: 300-31)	Peprotech, Hamburg, D
rhCXCL16, Chemokindomäne (Kat.-Nr.: 300-55)	Peprotech, Hamburg, D
rhEGF (Kat.-Nr.: 11343406)	Immunotools, Friesoythe, D
rhFGF-2 (Kat.-Nr.: 113443623)	Immunotools, Friesoythe, D
<i>RQ1 RNase-free DNase</i> (Kat.-Nr.: M610A)	Promega, Mannheim, D
Streptavidin-5nm Goldpartikel (Kat.-Nr.: EM.STP5)	British Biocell International, Cardiff, UK

2.1.7 Antikörper

Tab.2.1: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Herkunft	Kat.-Nr.	Immunisierte Spezies	Verd. WB	Verd. ICC
Akt	Cell Signaling	9272	Kaninchen	1:500	-
<i>cleaved</i> PARP	Cell Signaling	9541	Kaninchen	1:500	1:100
CD44	Abcam	ab6124	Maus	1:400	-
CXCL16	Peptotech	500-P200	Kaninchen	1:500	1:100
CX3CL1	Peptotech	500-P98	Kaninchen	1:500	1:100
ERK2	Millipore	05-157	Maus	1:250	-
GAPDH	Santa Cruz	sc-25778	Kaninchen	1:250	-
Hämagglutinin	Cell Signaling	2367	Maus	-	1:250
pAkt	Cell Signaling	4060	Kaninchen	1:1000	-
pERK	Cell Signaling	9101	Kaninchen	1:333	1:300

Tab.2.2: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Herkunft	Kopplung	Verd. WB	Verd. ICC	Verd. EIMi
Kaninchen- α Maus-IgG	Dako	HRP	1:30000	-	-
Ziege- α Kaninchen-IgG	Santa Cruz	HRP	1:60000	-	-
Ziege- α Kaninchen-IgG	Invitrogen	Alexa Fluor [®] 555	-	1:1000	-
Ziege- α Kaninchen-IgG	British BioCell International	15nm Goldpartikel	-	-	1:40
Ziege- α Maus-IgG	Invitrogen	Alexa Fluor [®] 488	-	1:1000	-

2.1.8 Plasmide

Alle Plasmide wurden uns freundlicher Weise von Andreas Ludwig (Pharmakologie, Universitätsklinikum RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.3: Verwendete Expressionsvektoren

Name	Protein	Vektor
pcDNA3.1	-	pcDNA3.1
CX3CL1-pcDNA3.1	CX3CL1	pcDNA3.1
CXCL16-HA-pcDNA3.1	CXCL16-HA	pcDNA3.1

2.1.9 Mutagenese-Primer

Die zur Mutagenese verwendeten Primer wurden mit der Software *QuikChange*[®] Primer Design Programm erstellt und von der Firma Eurofins Genomics GbmH (Ebersberg, D) synthetisiert. In der Tabelle 2.4 sind nur die sense-Primer aufgeführt. Hervorgehoben sind die zur Veränderung führenden Basentriplets.

Tab. 2.4: Verwendete Mutagenese-Primer

Name	Erzeugte Veränderung	Sequenz
CX3CL1truncsens	Wegfall der intrazellulären Domäne	5'- TGGCCATGTTACCTACT AGTAA CTCCAGGGCTGCCCTCG -3'
CXCL16truncs	Wegfall der intrazellulären Domäne	5'-CTTTCCTATGTGCTGT GATAG AGGAGGAGGGGGCAG-3'
CXCL16S70AS78As	Veränderung des SXXS Motivs zu AXXA	5'-GAGGGGG GC AGGCACCC GC AGGCCTCTCCAGA-3'
CXCL16Y104Fs	Veränderung des YXVP Motivs zu FXVP	5'-AGATCTGCCGGTTCAT TTT TATACCTGTGGCACCTG-3'

2.1.10 Small interfering RNA (siRNA)

Alle verwendeten siRNAs stammen von Ambion[®]/Life Technologies.

Tab. 2.5: Verwendete siRNA

Name	Interferenz-RNA	Katalognummer
Negative Control #1 siRNA	-	4390843
CX3CL1 Silencer [®] Select siRNA	CX3CL1	4392420 ID: s12630
CXCL16 Silencer [®] Select siRNA	CXCL16	4392420 ID: s33808

2.1.11 TaqMan[®] Gene Expression-Primer für die Real-Time-RT-PCR

Alle TaqMan[®] Gene Expression-Primer stammen von Applied Biosystems/ Life Technologies.

Tab. 2.6: Verwendete Primer

Primer	ID-Nummer	Probe-Sequenz
hCCX-CKR	Hs00664347_s1	AGAAATATGGGTCCTGGAGAAGACA
hCXCL16	Hs00222859_m1	GATCTCAAAGAATGTGGACATGCTT

hCXCR3	Hs00171041_m1	GCCATGGTCCTTGAGGTGAGTGACC
hCXCR4	Hs00607978_s1	GTCCTGCTATTGCATTATCATCTCC
hCXCR6	Hs01890898_s1	CCAGAATAACTAGCACCAGGGACTA
hCXCR7	Hs00664172_s1	CGAGCTCACGTGCAAAGTCACACAC
hCX3CL1	Hs00171086_m1	GCTGGCTGGACAGCACCACGGTGTG
hCX3CR1	Hs00365842_m1	ATGGTCCTTGAGGTGAGTGACCACC
hD6	Hs01907876_s1	GTGATCCTGATACTCTCGGCCTTTA
hDARC	Hs01011079_s1	CTGGACCTGCTGCTGAACCTGGCAG
hGAPDH	Hs99999905_m1	CGCCTGGTCACCAGGGCTGCTTTTA

Die Primer für die Genexpression des vom Cytomegalo-Virus codierten Proteins US28 wurden spezifisch für uns durch Applied Biosystems im Rahmen des Custom TaqMan® Gene Expression Assays hergestellt. Die Sequenzen beruhen auf der Publikation von Matlaf und Kollegen (Matlaf et al. 2013).

Tab. 2.7: Custom TaqMan® Gene Expression Assay für US28

Forward-Primer	US28F-5'-CGGCAACTTCTTGGTGATCTTC-3',
Reverse-Primer	US28R-5'-CATCGCCGGAGCATTGA-3',
TaqMan® FAM™-MGB-Sonde	FAM-CCATCACCTGGCGACGTCGGA-MGB

2.1.12 Inhibitoren

CCX733

ChemoCentryx Inc., Mountain View, USA
(Geschenk von Dr. M. E.T. Penfold und Prof. Dr. T. J. Schall)

Pertussistoxin (PTX)

Calbiochem, Darmstadt, D

2.1.13 Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

PAN Biotech, Aidenbach, D

DMEM-Vollmedium

10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg.,
2% 200 mM L-Glutamin

Opti-MEM Medium

Gibco® / Life technologies

RPMI-1640 (RPMI)

PAN Biotech, Aidenbach, D

RPMI-Vollmedium

10% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg.,
2% 200 mM L-Glutamin

2.1.14 Zelllinien

A764

Bei der A764-Zelllinie handelt es sich um eine humane Glioblastomzelllinie, die durch wiederholtes Subkultivieren aus einer primären Glioblastomkultur hervorgegangen ist. Für die Primärkultur wurde ein solides humanes Glioblastom, welches in der Neurochirurgie in Kiel entnommen wurde, dissoziiert und in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wachsen adhärent.

LOX

Die Melanomzelllinie LOX wurde von Udo Schumacher aus der Anatomie in Hamburg übernommen. Ebenso wie die Glioblastomzelllinien wachsen diese Zellen adhärent.

T98G

Die Zellen der Linie T98G stammen von der Firma ATCC. Sie wurden aus einem Glioblastom gewonnen, das einem 61-jährigen kaukasischen Mann entnommen und in Kultur genommen wurde. Es handelt sich um adhärent wachsende Zellen.

THP-1

Bei der THP-1-Zelllinie handelt es sich um eine monozytäre Tumorzelllinie. Sie stammt von einem 1-jährigen Jungen mit akuter Monozyten-Leukämie und wurden von der Firma CLS erhalten. Die Zellen wachsen in Suspension.

U343

Die U343-Zellen wurden von dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg erhalten und leiten sich von einem Glioblastom ab, das einem kaukasischen Mann entnommen und in Kultur genommen wurde. Es handelt sich um adhärent wachsende Zellen.

Weitere Tumorzelllinien wurden nur für die Transkriptionsanalyse mittels TaqMan®-RT-PCR verwendet und stammen aus folgenden Quellen:

Tab. 2.8: Herkunft der Tumorzelllinien für die Transkriptionsanalyse

Zelllinie	Tumorentität	Quelle
A172	Glioblastom	ATCC
HT29	kolorektales Adenokarzinom	Udo Schumacher Anatomie Hamburg
MCF-7	Mammakarzinom	
OH3	kleinzelliges Lungenkarzinom	
SH-SY5Y	Neuroblastom	

U118	Glioblastom	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
------	-------------	---

Zudem wurden humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) der Firma PAA (Pasching, A) für die Transkriptionsanalyse verwendet und von Andreas Ludwig (Pharmakologie, Universitätsklinikum RWTH Aachen) erhielten wir eine RNA-Probe aktivierter T-Zellen zur Untersuchung.

2.1.15 Primäre Zellen

Die primären Zellen stammen von Glioblastomen, die in der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, entnommen wurden und durch den damaligen Direktor Prof. Dr. H.M. Mehdorn und die Leiterin des molekularbiologischen Forschungslabors Prof. Dr. Dr. J. Held-Feindt zur Verfügung gestellt wurden. Die Resektionen waren medizinisch notwendig und die Patienten unterschrieben im Vorwege eine Erklärung, in der sie der Nutzung des entnommenen Tumormaterials für wissenschaftliche Untersuchungen zustimmten. Die Aufbereitung der Zellen erfolgt schnellstmöglich nach der Entnahme.

2.1.16 Bakterien

Für die Transformationen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet. Dieser wurde bei Invitrogen (Darmstadt, D) erworben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung etablierter Zelllinien

Die im Rahmen der Zellkultur durchgeführten Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank. Alle hierzu verwendeten Materialien wurden autoklaviert bzw. mit 70%-igen Ethanol desinfiziert. Die verwendeten Reagenzien wurden sterilfiltriert (0,2 μ m Porengröße).

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C, wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5% CO₂-Begasung kultiviert und in DMEM-Medium (A764, U343, T98G) und RPMI-Medium (LOX, THP-1) gehalten. Beiden Medien wurde 10% fetales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung und 2% 200 mM L-Glutamin zugesetzt (Vollmedium). Weiterhin wurde zusätzlich der Selektionsmarker Gentamycin-418 (750 μ g/ml) bei den stabil transfizierten LOX-Zellen zugefügt.

2.2.1.2 Kultivierung von Primärzellen

Die aus einer Tumorsektion stammenden Gewebestücke wurden an einer Sterilwerkbank in Petrischalen mit kaltem PBS überführt. Um die Gewebestücke zu reinigen, wurden die Petrischalen leicht geschwenkt. Unbrauchbare Bereiche, wie kleine Blutgefäße oder starke Blutungen, wurden mit einer Uhrmacherpinzette und einem Skalpell entfernt. Anschließend wurde das Gewebe zerkleinert, in 10 ml-Reaktionsröhrchen überführt und mit vorgewärmter Dissoziationslösung (s. 2.1.4) aufgeschüttelt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 15 min wurde der Ansatz erneut kräftig geschüttelt. Es folgte die Zugabe einer DNase-Lösung (Endkonzentration 2 µg/ml) und eine weitere 15-minütige Inkubation bei 37°C. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpräzipitat in DMEM-Vollmedium aufgenommen. Je nach Zellzahl wurden die Zellen entsprechend ausgesät. Die Primärzellen wurden maximal bis zur zehnten Subkultur verwendet.

2.2.1.3 Subkultivierung von Zellen

Bei einer Konfluenz von 80-90% erfolgte die Subkultivierung der Zellen, wozu das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurde 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und direkt wieder abgenommen. Je nach Zelllinie erfolgte eine Inkubation für 3-5 min bei 37°C, nach der die abgelösten Zellen in das entsprechende Zellkulturmedium aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt wurden. Abhängig von der Proliferationsgeschwindigkeit wurden die Zellen in Verdünnungen von 1:3 bis 1:5 auf Zellkulturflaschen ausgesät. Für Experimente wurden die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt und anschließend die gewünschte Zellzahl ausgesät.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90-100% kultiviert und anschließend, wie unter 2.2.1.2 erläutert, trypsinisiert und in 10 ml Einfriermedium (DMEM-Medium mit 10% DMSO) aufgenommen. Nach kurzer Resuspension wurde die Zelllösung in Kryoröhrchen gefüllt. Diese wurden sofort für einen Zeitraum von 2-3 Tage bei -80°C eingefroren und anschließend in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff umgelagert.

2.2.1.5 Inkulturnahme von Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden nach Entnahme aus dem Stickstoffbehälter im Wasserbad bei 37°C nahezu vollständig aufgetaut und die Zellsuspension in ein 50 ml-Röhrchen mit 5 ml Zellkultur-Vollmedium überführt. Anschließend an eine fünfminütige Zentrifugation bei 1500 rpm wurde das Zellpräzipitat in 5 ml DMEM-Vollmedium

resuspendiert und in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde das Zellkultur-Medium gewechselt, um tote Zellen zu entfernen.

2.2.1.6 Transiente Transfektion von Zellen

Die zu transfizierenden Zellen wurden mittels PBS serum- und antibiotikafrei gewaschen. Anschließend wurden 900 µl reines DMEM-Medium in die 25 cm² Zellkulturflasche vorgelegt und die Zellen bis zur weiteren Verwendung bei 37°C gehalten. Der Transfektionsansatz setzte sich aus 100 µl DMEM-Medium, 4 µg Plasmid-DNA und 4 µl Turbofect zusammen und wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden der Ansatz auf die vorbereiteten Zellen gegeben und diese für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Transfektions-Medium durch Zellkultur-Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C gehalten, bevor sie für weitere Versuche verwendet wurden.

2.2.1.7 Stabile Transfektion von Zellen

Die Transfektion erfolgt wie bei der transienten Transfektion. Am folgenden Tag wurden die Konfluenz der Zellen unter dem Mikroskop CK2 (Olympus) bewertet. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert (s. 2.2.1.2), in 6 ml DMEM-Vollmedium aufgenommen und auf eine 6-Loch-Platte verteilt. Zur Selektion wurde das Antibiotika Gentamycin-418 (750 µg/ml) dazu gegeben. Ein Mediums- und Antibiotikawechsel erfolgte alle zwei Tage.

2.2.1.8 Transfektion von Zellen mit siRNA

Die zu transfizierenden Zellen wurden auf 6-Lochplatten ausgesät (150000 Zellen/Loch) und für 24 h in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Für die Transfektion wurden die Zellen mit einem Ansatz aus Opti-MEM Medium, Lipofectamin und siRNA (50 pmol/Loch; CXCL16-siRNA, CX3CL1-siRNA und Kontroll-siRNA (ausgewählte Negativkontrolle)) für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut für 24 h mit DMEM mit 10% FCS kultiviert, bevor sie für die Stimulation dreimal für 20 min mit DMEM mit 0,5% FCS gewaschen wurden. Die Stimulation mit 10 nM Chemokin erfolgte ebenfalls in DMEM mit 0,5% FCS für 15 min.

2.2.1.9 Stimulation von Zellen

Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Stimulation erfolgte in DMEM-Medium mit 0,5% BSA. Die Zellen wurden zweimal für 1 h bei 37°C vorinkubiert, um Störungen durch Serumfaktoren zu minimieren. Nach einem weiteren Mediumswechsel wurde für 10 min inkubiert und anschließend die Zellen stimuliert. Hierzu wurde der Stimulus in gewünschter Konzentration in das Medium gegeben und die Zellen für die entsprechende Zeit bei 37°C inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Entfernung

des Mediums und direkt anschließender Herstellung von Zelllysaten, Membran- oder RNA-Isolaten oder Fixierung mittels Aceton/Methanol zur immunzytochemischen Färbung.

2.2.1.10 Zellmigrationsversuch mittels Scratch-Test

In diesem Versuch wird die ungerichtete Migration der Zellen in einem Spalt untersucht. Dieses Experiment wird auch als Wundheilungstest bezeichnet.

Die Zellen wurden in einer 6-Loch-Platte bis zu einer optischen Konfluenz von 100% gehalten. Anschließend wurden mit Hilfe einer 10 µl Pipettenspitze zwei senkrechte und zwei waagerechte Kratzer in den Zellrasen gemacht. Nach einem Mediumswechsel auf DMEM mit 1% BSA erfolgte die Stimulation der Zellen durch Zugabe des Stimulus. Die Verläufe des Zellrasens wurden zum Zeitpunkt 0 Stunden mittels eines Mikroskops (Axiovert 200M von Zeiss, 10x Objektiv) fotografisch festgehalten, wobei pro Loch drei Stellen der Kratzer fotografiert wurden. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 24 h bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die identischen Stellen erneut fotografiert. Zur Auswertung wurde die Fläche des Spalts nach 0 h und 24 h bestimmt. Aus der Differenz der Spalte ergibt sich ein Maß für das Migrationsverhalten. Die Differenz der Spalte der unstimulierten Kontrolle wurde dabei gleich 100% gesetzt.

2.2.1.11 Proliferationsassay mit WST-1

Zur Bestimmung der Proliferation wurde der kolorimetrische Assay, basierend auf dem Tetrazolium-Salz WST-1, der Firma Roche verwendet. WST-1 wird von den Mitochondrien zu Formazan umgesetzt, welches photometrisch nachweisbar ist. Somit werden nur lebende Zellen bei dieser Methode gemessen. Es erfolgte eine Vierfachbestimmung pro Wert.

Es wurden 5000 Zellen/Loch auf eine 96-Loch-Platte in Vollmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Vor der Stimulation wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Stimulation in 100 µl DMEM-Medium mit 0,2% FCS. Als Positivkontrolle diente eine Stimulation mit 10% FCS. Medium und Stimuli ohne Zellen wurden als Nullwert verwendet. Nach Zugabe der Stimuli wurden die Zellen für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl *Cell Proliferation Reagent* WST-1 hinzugefügt und der Ansatz alle 30 min bei einer Wellenlänge von 440 nm photometrisch vermessen bis keine weitere Änderung der Absorption zu verzeichnen war bzw. die Werte oberhalb einer Absorption von 2 lagen. Als Referenzwellenlänge diente eine Messung bei 620 nm.

2.2.1.12 Herstellung von konditioniertem Medium

Eine definierte Zahl stabil transfizierter Lox-Zellen (Lox-*tm*-CXCL16, Lox-*tm*-CX3CL1 und Lox-pcDNA) wurde in eine Zellkulturflasche überführt und für einen Tag inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 3,5 ml DMEM Medium + 0,5% BSA für

24 h (CX3CL1) bzw. 48 h (CXCL16) erneut inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die CX3CL1-Konzentration wurde mittels ELISA (DouSet[®], R&D Systems, s. 2.2.4.2) bestimmt. Zur Untersuchung der konditionierten Medien auf CXCL16 wurden 75 µl Medium mit 25 µl SDS-Probenpuffer vermischt und anschließend mittels Western Blot auf s-CXCL16 analysiert.

2.2.1.13 Apoptosenachweis durch Aktivitätsbestimmung der Caspasen 3 und 7

Zur Bestimmung der Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde Ac-DEVD-AMC (AMC = 7-Amino-4-Methylcoumarin) als Substrat verwendet. Die Caspasen spalten das AMC ab, welches fluorimetrisch nachweisbar ist.

Die Zellen wurden für 48 h mit 400 µg/l Temozolomid in DMEM + 0,2% FCS inkubiert. Als Kontrolle diente eine Stimulation mit 2% DMSO. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen im Medium abgekratzt, um auch die abgelösten Zellen zu untersuchen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min; 2000 rpm) und zweimal mit PBS gewaschen. Nachdem die Zellen in Caspase-Lysispuffer lysiert und vereinzelt wurden, erfolgte eine Proteinbestimmung. Für die Messung wurden 50 µg Zellysate eingesetzt. Nach Zugabe von 40 µM Ac-DEVD-AMC wurden die Ansätze für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend im Fluorimeter (Extinktion: 360 nm; Emission: 460 nm) gemessen.

2.2.1.14 Apoptosenachweis durch Spaltungsnachweis von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

Alternativ zur Aktivitätsbestimmung der Caspasen 3 und 7 wurde die Apoptose durch die Spaltung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) mittels Western Blot und immunzytochemischer Färbung nachgewiesen. PARP ist ein Enzym im DNA-Reparatursystem und wird während der Apoptose durch Caspase 3 gespalten.

Zur Stimulation wurden die Zellen mit 0,1 µg/ml Camptothecin, einem Hemmstoff der Topoisomerase I, für 18 h inkubiert. Als Kontrolle erfolgte die gleiche Stimulation mit 0,1% DMSO. Das gespaltene Enzym wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen *cleaved* PARP (Asp124, 1:500; Cell Signaling) im Western Blot detektiert. Für die immunzytochemische Färbung wurden die Zellen mit Aceton-Methanol fixiert (10 min; Verhältnis 1:1) und anschließend mit dem gleichen Antikörper gefärbt (1:100). Das entstehende Fluoreszenzsignal der Färbung wurde auf die Fläche der Zellkerne normalisiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Zelllysaten wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von eiskaltem Lysispuffer wurden die Zellen mittels eines Zellschabers abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die LOX-Zellen wurden weiterhin für wenige Sekunden sonifiziert, wohingegen die anderen Zelllinien direkt zentrifugiert wurden. Der Zentrifugationsschritt erfolgte für 5 min bei 4°C und 12000xg, um Zelltrümmer und Zellkerne abzutrennen. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und eine Konzentrationsbestimmung der Proteine nach Bradford durchgeführt (s. 2.2.2.3).

2.2.2.2 Membranisolation

Zur Herstellung von Membranisolaten wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 1 ml 5 mM HEPES-Puffer (hypoton) wurden die Zellen mittels eines Zellschabers gelöst, in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 4°C und 800xg zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl 200 mM HEPES-Puffer (isoton) versetzt, das Präzipitat, das Kerne und Detritus enthielt, wurde verworfen. Anschließend wurde der Isolationsansatz für 1 h bei 4°C und 20000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat, je nach Größe, in 30-100 µl 20 mM HEPES-Puffer + 0,14 M NaCl gelöst. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Zelllysats bestimmt (s. 2.2.2.3).

2.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der photometrischen Methode von Bradford.

Für die Konzentrationsbestimmung wurden die Komponenten aus Tab. 2.8 in den dort angegebenen Mengen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß zusammengeführt.

Tab. 2.9: Pipettierschema der Proteinbestimmung nach Bradford

<u>Membranisolate</u>	Membranisolat	BSA-Lösung (1 mg/ml)	Wasser	1 M NaOH	Bradford-Reagenz
Leerwert	-	-	795 µl	5 µl	200 µl
Standard	-	10 µl	785 µl	5 µl	200 µl
Probe	5 µl	-	790 µl	5 µl	200 µl
<u>Zelllysate</u>	Zelllysate	BSA-Lösung (1 mg/ml)	Wasser	Lysispuffer	Bradford-Reagenz
Leerwert	-	-	795 µl	5 µl	200 µl
Standard	-	10 µl	785 µl	5 µl	200 µl
Probe	5 µl	-	795 µl	-	200 µl

Anschließend wurde die Extinktion bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \frac{A_{(\text{Probe})}}{A_{(\text{Standard})}} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.2.4 Vorbereitung der Proteinproben auf den Western Blot

Für den Western Blot wurden $5 \mu\text{g}$ Protein eingesetzt. Die Proteinlösung wurde auf $20 \mu\text{l}$ mit SDS-Probenpuffer mit DTT aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 95°C gekocht.

2.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Analyse von Proteingemischen wurden diese mit der anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt, um eine Überdeckung der Eigenladung der Aminosäuren zu gewährleisten. Diese erhielten hierdurch eine negative Netto-Ladung. Somit konnte in einer diskontinuierlichen Zonenelektrophorese (SDS-PAGE) eine Auftrennung ausschließlich nach dem Molekulargewicht erfolgen.

In dieser Arbeit wurden 10 und 12%-ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Taschen wurden vor der Beladung mit Wasser gespült. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingebaut und die Taschen mit $5 \mu\text{g}$ Protein (s. 2.2.2.4) beladen. Zusätzlich wurde eine Tasche mit $4 \mu\text{l}$ eines definierten Molekulargewichtsmarkers beladen. In den Innenraum der Kammer wurde ein Tropfen gesättigte Bromphenolblau-Lösung gegeben, um den Verlauf der Elektrophorese verfolgen zu können. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei einer Obergrenze von 400 V.

2.2.2.6 Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

Die aufgetrennten Proteinproben wurden aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dies geschah mittels Western Blot im *Semi-Dry*-Verfahren. Hierzu wurde die PVDF-Membran in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Die *Whatmann*-Papiere wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran und das SDS-Gel wurden zwischen jeweils zwei *Whatmann*-Papiere so angeordnet, dass das Gel der Kathode und die Membran der Anode zugewandt waren. Der Transfer erfolgte für 30 min bei einer Obergrenze von 25 V.

2.2.2.7 Immunologische Detektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz

Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurden die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine für 1 h bei Raumtemperatur in einer 5%-igen Milchpulver-TBST-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert, wobei der Antikörper in 1 ml 5%-iger Milchpulver-TBST-Lösung verdünnt und

zusammen mit der Membran in Schlauchfolie eingeschweißt wurde. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Sollte der Primärantikörper eine Phosphorylierung nachweisen, wurde die Membran nach der Blockierung mehrfach mit TBST gewaschen und der Antikörper in 5%-iger BSA-Lösung verdünnt aufgetragen.

Um nach der Inkubation überschüssige Antikörper-Moleküle zu entfernen, wurde die Membran dreimal für 15 min in TBST gewaschen. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte in 0,5%-iger BSA-TBST-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST wurden die gebundenen Antikörper mittels des ECL-Kits (Immobilon™ Western, Millipore) detektiert. Die Signale wurden mit dem Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) oder mittels eines Chemilumineszenzdetektors (Fusion SL, Peqlab) detektiert.

2.2.2.8 Strippen von PVDF-Membranen

Um auf einer PVDF-Membran einen weiteren Nachweis mittels eines anderen Antikörpers durchführen zu können, müssen die zuvor gebundenen Antikörper abgelöst werden. Hierzu wurde die Membran nach der Detektion kurz mit TBST gespült und anschließend für 30 min mit einer Stripping-Lösung (Millipore) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem die Membran zweimal für 5 min mit 5%iger Milchpulver-TBST-Lösung blockiert wurde, konnte eine erneute Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper erfolgen.

2.2.2.9 Chemische Quervernetzung von Membranisolaten mit Paraformaldehyd

Nach der Membranisolation wurden die Proteine in 0,2 M Triethanolamin-Hydrochloridlösung (pH 8,0) gelöst. 1,5 mg Membranprotein wurden mit 2 nM rekombinanten s-Chemokin (PeproTech) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 1% Paraformaldehyd (PFA) zu den Ansätzen gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Quervernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 M Tris (pH 8,3) und einer Inkubation von 15 min gestoppt. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer und 10 minütiger Inkubation bei 95°C, wurde eine Gelelektrophorese und Western Blot wie bereits beschrieben durchgeführt. Zur Detektion der Quervernetzungsergebnisse wurden Antikörper gegen die Chemokindomänen von CXCL16 und CX3CL1 verwendet (anti-CXCL16/anti-CX3CL1 1:500; PeproTech).

2.2.2.10 Fluoreszenzmarkierung zum Bindungsnachweis

Die Zellen wurden auf Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläsern ausgesät. Die Zellen wurden einmal mit PBS gespült und anschließend mit vorgewärmten (37°C) DMEM+0,5% BSA versetzt. Zum schonenden Herunterkühlen der Zellen wurden diese zuerst 15 min bei Raumtemperatur und darauffolgend 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die

Zellen für 1 h mit 2 nM Cy3-gekoppeltem CXCL16 bzw. Biotin-gekoppeltem CX3CL1 (Fluorokine, R&D Systems) auf Eis inkubiert. An die CX3CL1-Biotin-Reaktion schloss sich weiterhin eine 30 minütige Inkubation mit Streptavidin-Alexa Fluor[®]488 an. Nach vorsichtigem spülen mit PBS wurden die Zellen mit Aceton/Methanol (1:1) fixiert. Anschließend wurden die Kerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (1:30000 in PBS verdünnt) gefärbt und die Deckgläser nach erneutem spülen auf Objektträger mit Fluoreszenz-Eindeckmedium (Immu-Mount, Thermo Fisher Scientific) aufgebracht. Das Ergebnis wurde an dem Axiovert 200M-Mikroskop (Zeiss) betrachtet und fotografiert.

Die Kopplung des CXCL16 wurde mittels monoreaktiven Cy3-NHS-Ester (GE Healthcare) durchgeführt. Hierzu wurden 2 µg CXCL16 (Peprotech) mit vierfachem Überschuss an Cy3-Farbreagenz in 0,2 M NAHCO₃ (pH 8,3; Gesamtreaktionsvolumen 90 µl) 1 h inkubiert und anschließend die Reaktion mit 1 µl 1 M Tris (pH 8,3) gestoppt.

2.2.2.11 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Bei der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie können fluoreszenzmarkierte Zellen auf bestimmte Eigenschaften untersucht werden. Hierzu kann mittels des Vorwärtsstreulichts (abhängig vom Volumen der Zelle) und des Seitwärtsstreulichts (abhängig von der Granularität der Zelle) eine Zellpopulation, die in diesem Fall die lebenden Zellen beinhaltet, bestimmt werden. Durch die Markierung mit einem fluoreszierenden Stoff (in diesem Fall durch die Bindung von fluoreszenzmarkierten Chemokinen) können Eigenschaften dieser Zellpopulation untersucht werden.

Die adhärennten Zellen wurden mit 0,5 mM EDTA abgelöst, um die Proteine an der Oberfläche der Zellen nicht zu schädigen, da eine Trypsinisierung die enzymatische Spaltung der Adhäsionsmoleküle zur Folge hätte. Anschließend wurden die Zellen mit PBS+0,2% BSA gespült und 200.000 Zellen pro Färbungsansatz verwendet (Volumen = 30 µl). Anschließend wurden die Zellen 1 h mit 2 µM Biotin-gekoppeltem CXCL16 oder dem CX3CL1 Fluorokine Assay (R&D Systems; verwendet laut Gebrauchsanweisung) auf Eis inkubiert. Anschließend folgte für beide Chemokine eine 30 minütige Inkubation mit Avidin-Fluorescein (Avidin-FITC, Fluoresceinisothiocyanat; aus dem Fluorokine Assay von R&D Systems). Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS+0,2% BSA gewaschen und in 300 µl PBS+0,2% BSA aufgenommen. Die Analyse erfolgte am FACSCanto System (BD biosciences).

Die Biotinylierung des CXCL16 erfolgte mittels des *One-Step Antibody Biotinylation Kits* der Firma Miltenyi.

2.2.2.12 Herstellung von F(ab)-Fragmenten aus Antikörpern

Bei den F(ab)-Fragmenten handelt es sich um die Antigen-bindende Fragmente eines Antikörpers, welche durch die enzymatische Spaltung mit Papain gewonnen werden.

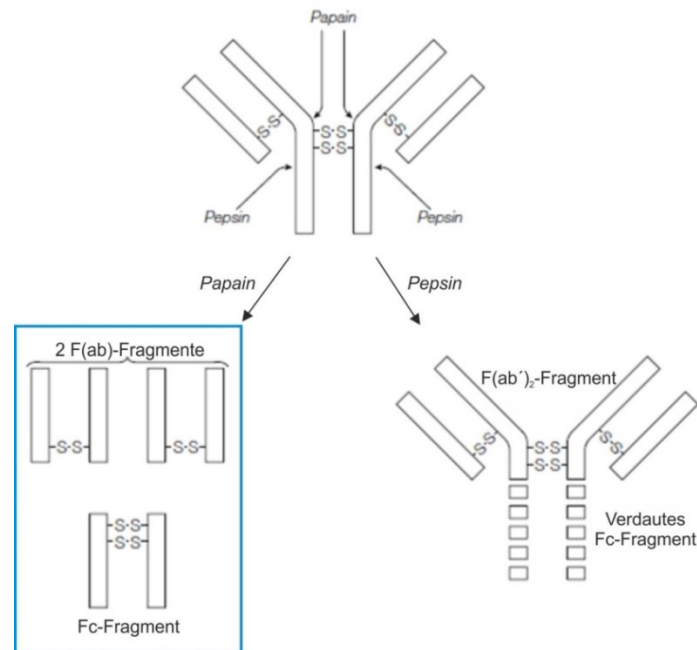


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des enzymatischen Verdauens eines Antikörpers durch Papain und Pepsin. Ein Antikörper kann durch Pepsin in ein F(ab')₂-Fragment enzymatisch gespalten werden. Das Fc-Fragment zerfällt durch den Verlust seiner Disulfidbrücken. Durch das Enzym Papain ergeben sich 2 F(ab)-Fragmente und ein Fc-Fragment nach der Spaltung. (Quelle: Verändert nach <http://www.expertsmind.com/topic/antibodies-an-overview/fab-and-fc-fragments-94397.aspx> (21.07.2015))

Zur Herstellung der F(ab)-Fragmente wurden 5 µg Antikörper oder Kontroll-IgG-Serum mit 0,8 µg *Immobilized Papain* (Pierce™ Fab Micro Preparation Kit, Thermo Scientific) für 6 h bei 37°C und 350 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 3 min bei 5000xg zentrifugiert, wodurch das an Agarose gebundene Papain entfernt wurde. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl Protein-A-Agarose versetzt. Es folgte eine weitere Inkubation für 1,5 h bei 4°C und 350 rpm. Der Ansatz wurde anschließend für 5 min bei 1000xg zentrifugiert, um die an die Protein-A-Agarose gebundenen Fc-Fragmente zu entfernen.

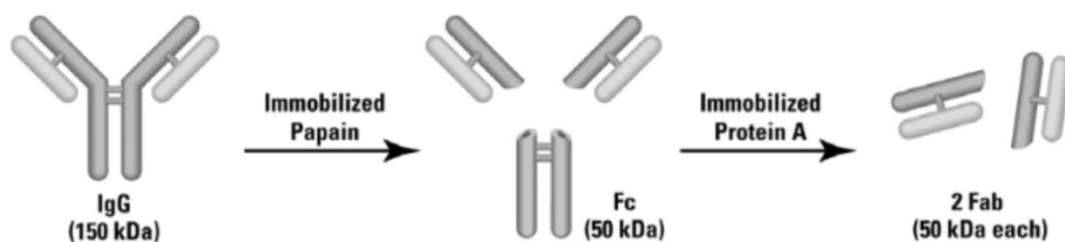


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Herstellung der F(ab)-Fragmente. Ein Antikörper wird mittels Papain-Verdau in 2 F(ab)-Fragmente und ein Fc-Fragment gespalten. Das Fc-Fragment wird anschließend durch Inkubation mit Protein-A-Agarose aus dem Ansatz entfernt. (Quelle: Gebrauchsanweisung des Pierce™ Fab Micro Preparation Kits, Thermo Scientific)

Zur Abtrennung von Salzen und anderen niedermolekularen Substanzen wurden die Überstände abschließend über eine MicroSpin™-G25-Säule (Amersham Bioscience) aufgereinigt (Zentrifugation: 2 min, 800xg). Für die Stimulationen wurden 0,1 µg/ml F(ab)-Fragment verwendet.

2.2.2.13 Immunogold-Elektronenmikroskopie zum Bindungsnachweis

Die auf Poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden in DMEM + 0,5% BSA für 30 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend schonend heruntergekühlt (30 min bei Raumtemperatur, 15 min bei 8°C, 15 min bei 4°C). Alle folgenden Inkubationen und Waschschrte wurden bei 4°C durchgeführt und die Puffer wurden ebenfalls auf 4°C vorgekühlt. Die Zellen wurden zweimal kurz mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit den Primärantikörpern für CXCL16 bzw. CX3CL1 (1:100 verdünnt, PeproTech). Nach einem weiteren Waschschrte wurden die Proben 1 h mit dem Goldpartikel-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen gekoppelt mit 15 nm Goldpartikel, 1:40 verdünnt) inkubiert. Nachdem die Zellen erneut gewaschen wurden, folgte eine einstündige Inkubation mit 3 µg/ml rekombinanten CXCL16, welches mit 5 nm Goldpartikel gekoppelt war, bzw. mit biotinyliertem rekombinanten CX3CL1 (R&D Systems). Auf die Inkubation mit biotinyliertem CX3CL1 folgte weiterhin eine Inkubation mit Streptavidin, welches mit 5 nm Goldpartikel gekoppelt war.

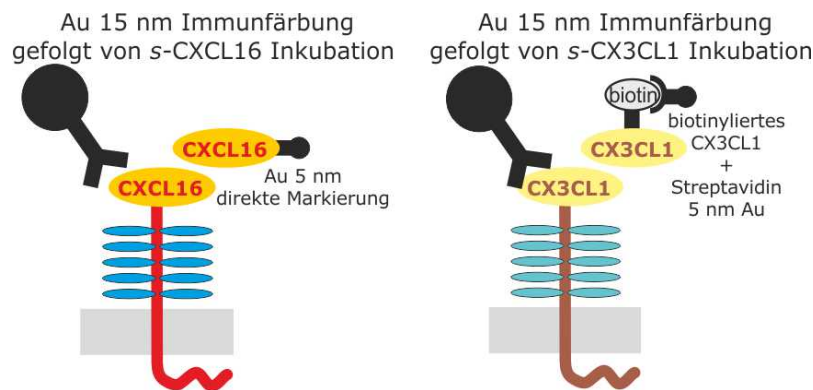


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Immunogold-Elektronenmikroskopie. Die transmembranen Chemokine wurden mit einem Goldpartikel-gekoppelten (Au 15 nm) Antikörper markiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit direkt Goldpartikel-gekoppeltem rekombinanten CXCL16 (Au 5 nm) bzw. biotinyliertem rekombinanten CX3CL1. Bei letzterem folgte zusätzlich eine Inkubation mit Goldpartikel-gekoppeltem Streptavidin (Au 5 nm). Im Elektronenmikroskop konnte bei Bindung des rekombinanten Chemokins an die transmembrane Variante eine direkte Nähe von 15 nm zu 5 nm Goldpartikeln gezeigt werden.

Nach einem weiteren Waschschrte wurden die Zellen mit 0,5% Glutaraldehyd und 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gespült und über Nacht bei 4°C in PBS gelagert. Nachdem sie 30 min in Osmium inkubiert wurden, folgte eine

Alkoholreihe (50% Ethanol bis 100% Ethanol) zur schrittweisen Entwässerung der Proben. Anschließend wurden die Zellen in 2% Araldit eingebettet (5 h bei 4°C, 48 h bei 65°C). Nachdem die Proben geschnitten wurden, wurden sie am Elektronenmikroskop (Zeiss EM 900, Zeiss) untersucht und fotografiert.

Die 5 nm Goldpartikel zur Konjugation an CXCL16 wurden nach der Anleitung von Slot und Geuze hergestellt (Slot and Geuze 1985). Für die Kopplung an CXCL16 wurden 12,5 ml der 5 nm Goldpartikellösung mit 0,2 M K₂CO₃ auf pH 9,0 eingestellt und mit 1 mM CXCL16 versetzt. Der Ansatz wurde für 72 h bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 ml 10% BSA-Lösung folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Der Ansatz wurde mittels 50 ml Amincon-Ultrafiltrationszelle und YM 10-Membran auf 5 ml konzentriert. Anschließend wurde der Ansatz auf die äquilibrierte S-300-Säule gegeben und mit 20 ml/h und 10 mM HEPES + 0,1% BSA (pH 7,8) eluiert. Es wurden 5 ml-Fractionen aufgefangen und die tiefroten Fractionen vereinigt. Durch erneute Ultrafiltration erfolgte eine Konzentrierung auf 2 ml. Durch Messung der Extinktion bei 520 nm wurde die Konzentration mit folgender Formel berechnet: Konzentration [nM] = E₅₂₀ x 70.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Isolierung mittels Trizol

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, unter einem Laborabzug mit 1 ml Trizol geerntet und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde der Ansatz gut durchmischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 12000xg und 4°C. Die obere, durchsichtige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nachdem der Ansatz gut durchmischt wurde, wurde dieser für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 min bei 12000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 1 ml Ethanol versetzt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 7600xg und 4°C. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Präzipitat getrocknet und je nach Größe in ca. 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Nachdem die Lösung für 10 min bei 58°C inkubiert wurde, wurde die Konzentration mittels des Mikroplattenlesers Epoch (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bestimmt. Die RNA wurde bei - 80°C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung von cDNA mittels Random-Hexamer-Primer

Während der gesamten cDNA-Herstellung erfolgten alle Pipettierschritte auf einem Kühlblock und die Inkubationsschritte im Thermocycler T1 (Biometra).

In einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß wurde 1 µg RNA auf 8 µl mit Wasser aufgefüllt. Bei zu geringer RNA-Konzentration wurden 8 µl RNA-Lösung eingesetzt. Zuerst wurde 1 µl DNase-Puffer (*RQ1 DNase 10x Reaction buffer*, Promega) zugegeben, der Ansatz gemischt und

anschließend kurz herunterzentrifugiert. Nach Zugabe von 1 µl DNase folgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl EDTA-Lösung (*RQ1 DNase Stop Solution*, Promega) und Inkubation für 10 min bei 65°C gestoppt. Auch hier wurde der Ansatz nach Zugabe der Lösung gemischt und zentrifugiert. Anschließend wurde 1 µl Random-Hexamer-Primer hinzu pipettiert und nach erneutem Mischen und Zentrifugieren für 5 min bei 70°C inkubiert. In diesem Schritt erfolgt die Anlagerung der Primer an die RNA. Im nächsten Schritt wurden 7 µl des folgenden Ansatzes zu der RNA pipettiert.

5x Reaktionspuffer (<i>5x Reaction Buffer for M-MuLV RT</i> , Fermentas)	4 µl
dNTP-Mix	2 µl
Wasser	1 µl

Nach fünfminütiger Inkubation bei 25°C wurde 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt und der Ansatz nach folgendem Schema inkubiert.

10 min	25°C
60 min	42°C
10 min	70°C

Nach Beendigung dieser Schritte wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Quantitative Real-Time-RT-Polymerase-Kettenreaktion (*Real-time-RT-PCR*)

Die quantitative Realtime-PCR wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems durchgeführt.

Für die quantitative *Real-Time-RT-PCR* wurde die cDNA auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und jeweils 2 µl in die Vertiefung einer optisch durchlässigen 96-Loch-Platte pipettiert. Hierzu wurde ein Mastermix aus TaqMan® Universal PCR Master Mix, Primer und dest. H₂O gegeben (Tab. 2.9).

Tab. 2.10: Zusammensetzung des Mastermixes für die *Real-Time-RT-PCR*

Komponente	Menge pro Probe
Primer	1 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	10 µl
dd H ₂ O	7 µl

Um die relative Änderung der Genexpression bestimmen zu können, wurden das Referenz-Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bei den Messungen mitgeführt.

Dieses sogenannten „*housekeeping*“-Gen zeichnet sich dadurch aus, dass seine Expression zu fast jedem Zeitpunkt konstant ist.

Die Amplifikation der Proben erfolgte nach dem *Quantitation-Comparative C_T* (Standard)-Programm (Tab. 2.10; Applied Biosystems).

Tab. 2.11: Programm der *Real-Time*-RT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initialschritt	50°C	2 min	1
Aktivierungsschritt	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	15 s	40
<i>Annealing</i> und Elongation	60°C	1 min	
Abschluss	4°C	∞	-

Die Amplifikation und die Detektion der gemessenen Fluoreszenzsignale erfolgten im ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems). Zur Auswertung wurde der C_T-Wert (*Threshold Cycle* = Schwellenwert-Zyklus) verwendet. Dieser gibt an, bei welchem Zyklus die Fluoreszenz der Probe erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Mittels der C_T-Werte der GAPDH konnte die relative Änderung der Expression berechnet werden (ΔC_T-Wert).

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Probe})} - C_{T(\text{GAPDH})}$$

Weiterhin konnte die Expression der Probe als n-fache Expression der GAPDH beschrieben werden.

$$\text{n-fache Expression} = 2^{-(\Delta C_T)}$$

Die Expression der GAPDH entspricht dabei einem Wert von 1. Eine n-fache Expression kleiner als 1 bedeutet, dass das Gen geringer als die GAPDH exprimiert wird. Wohingegen ein Wert größer als 1 bedeutet, dass das Gen eine stärkere Expression aufweist.

2.2.3.4 Transformation von Bakterien und Plasmidamplifikation

Das Einbringen von Plasmiden in kompetente Bakterien erfolgte mittels der Hitzeschock-Methode. Hierzu wurden 50 µl kompetente *E. coli*-Bakterien in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, welches auf Eis gelagert wurden. Nach Zugabe von 1 µl Plasmid wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 s bei 42°C im Wasserbad, worauf eine fünfminütige Inkubation auf Eis folgte. In einem sterilen Röhrchen wurden 500 µl LB-Medium zu dem Ansatz gegeben und für 1h bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Auf eine ampicillinhaltige Agarplatte wurden anschließend 200 µl des Ansatzes ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank kultiviert.

Zur weiteren Plasmidamplifikation wurde eine 150 ml-Kultur angesetzt. Hierzu wurden 150 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit einer Kolonie der Bakterien von der Agarplatte angeimpft. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 4°C und 6000xg für 15 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.3.5 Plasmid-Isolation (Midi-Präp)

Die Plasmid-Isolation erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Midi and Maxi Kit.

Das Präzipitat der Bakterienkultur wurde in 4 ml Resuspensions-Puffer gelöst. Anschließend wurden 4 ml Lysis-Puffer zugefügt und nach mehrmaligem Invertieren der Ansatz für 5 min unter Luftausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurden 4 ml Neutralisations-Puffer zugegeben und nach erneutem Invertieren der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 20000xg wurde der Überstand über einen Faltenfilter auf die QIAGEN-tip 100 Säule gegeben. Diese wurde zuvor mit 4 ml Equilibrierungspuffer vorbereitet. Da ausschließlich das Plasmid an die Säulenmatrix binden sollte, erfolgte so eine Abtrennung von den restlichen Bestandteilen. Nachdem der Ansatz vollständig auf die Säule gegeben wurde, wurde diese zweimal mit 10 ml Wasch-Puffer gewaschen. Um das Plasmid zu eluieren, wurde die Säule mit 5 ml Elutions-Puffer beladen. Der Durchfluss wurde in ein 15 ml-PE-Röhrchen aufgefangen. Zur weiteren Aufreinigung wurde die Lösung in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach kräftigem Durchmischen wurden die Ansätze für 30 min bei 4°C und 15000xg zentrifugiert. Die Präzipitate wurden mit 400 µl 70% Ethanol versetzt und für 10 min bei 4°C und 15000xg zentrifugiert. Nachdem die Präzipitate an der Luft getrocknet wurden, wurden sie je nach Größe in ca. 10 µl Wasser gelöst, vereinigt und die Konzentration mittels des Mikroplattenlesers Epoch (BioTek) bestimmt.

2.2.3.6 Zielgerichtete Mutation des Plasmids

Zur Veränderung der Basensequenz der Plasmide wurde eine zielgerichtete Mutation mit dem *QuikChange® Lightning Site-directed Mutagenesis* Kit (Agilent Technologies) durchgeführt. Die hierzu benötigten komplementären Primer wurden mit der Software *QuikChange® Primer Design* Programm geplant (Sequenzen s. 2.1.9) und durch die Firma Eurofins Genomics GbmH synthetisiert. Die Durchführung des Mutagenese-Kits erfolgte laut Gebrauchsanweisung. Die Mutagenese-PCR wurde im Thermocycler T1 (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt:

Tab. 2.12: Programm der Mutagenese-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Aktivierungsschritt	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	20 s	17
<i>Annealing</i>	60°C	10 s	
Elongation	68°C	3 min 30 s	
Abschluss	4°C	∞	-

Anschließend folgte die Fragmentierung des DNA-Templates durch das Enzym *DpnI* bei 37°C für 10 min, ebenfalls durchgeführt im Thermocycler T1.

Die so veränderten Plasmide wurden in *E. coli* (Stamm: DH5 α) transformiert, auf Ampicillin-haltige Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die daraus resultierenden Kolonien in 10 ml-Kulturen überführt und bei 37°C über Nacht und 160 rpm inkubiert. Das Plasmid wurde daraus mittels Mini-Präparation (s. 2.2.3.7) aufgereinigt. Um den Erfolg der Mutagenese zu überprüfen, wurden die Plasmide sequenziert (GATC Biotech AG, Koblenz).

2.2.3.7 Plasmid-Isolation (Mini-Präp)

Die Plasmid-Isolation der Mutageneseexperimente erfolgte mittels des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Roth, D). Alle Inkubations- und Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Zentrifugation wurde mit 12000xg durchgeführt.

Die 10 ml-Kultur zur Plasmid-Vermehrung wurde bei 4°C und 8000xg für 15 min zentrifugiert und das Präzipitat in 250 μ l *Resuspension Solution* resuspendiert. Anschließend wurden 250 μ l *Lysis Solution* dazugegeben und der Ansatz mehrfach invertiert. Darauf folgend wurden 350 μ l *Neutralisation Solution* zugefügt und der Ansatz erneut invertiert. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation, um Zelldebris und chromosomale DNA abzutrennen. Der Überstand wurde auf eine *GeneJet*-Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule zweimal mit jeweils 500 μ l *Wash Solution* gespült und nach jedem Waschschritt für 45 s zentrifugiert. Um die verbliebene Flüssigkeit zu entfernen, wurde nach Entsorgung des Durchlaufs zusätzlich 1 min zentrifugiert. Nachdem die Säule auf ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt wurde, wurde das Plasmid mit 50 μ l *Elution buffer* eluiert. Hierzu wurde die Säule 2 min mit dem Elutionspuffer inkubiert und anschließend für 2 min zentrifugiert. Die Konzentration wurde mittels des Mikroplattenlesers Epoch (BioTek) bestimmt.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Fluoreszenz-Immunzytochemie mittels Aceton/Methanol-Fixierung

Für die Fluoreszenz-Immunzytochemie wurden die Zellen auf ein mit Poly-D-Lysin beschichtetes Deckgläschen ausgesät. Zu Beginn der Färbung wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu fixieren, wurden diese für 10 min mit einem eiskalten Aceton-Methanol-Gemisch (Verhältnis 1:1) inkubiert und anschließend erneut dreimal für 5 min mit PBS gespült. Es folgte ein Blockierungsschritt für 60 min mit PBS, welches je 0,5% BSA und Glycin enthielt. Die Blockierlösung wurde abgenommen und direkt 100 µl in PBS verdünnter Primärantikörper aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Nach der Inkubation folgte erneut ein dreimaliges Spülen mit PBS, anschließend wurden 100 µl ebenfalls in PBS verdünnter Sekundärantikörper aufgetragen. Von hier an wurden die Deckgläschen lichtgeschützt bearbeitet und gelagert. Die Zellen wurden bei 37°C für 60 min inkubiert und anschließend ein weiteres Mal mit PBS gespült. Es folgte eine Inkubation mit 100 µl DAPI-Lösung (1:30000 in PBS verdünnt) für 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Spülen mit PBS und kurzem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Deckgläschen mit Fluoreszenz-Eindeckmedium (Immu-Mount, Thermo Fisher Scientific) eingedeckelt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Das Ergebnis der Färbung wurde an dem Axiovert 200M-Mikroskop (Zeiss) betrachtet und fotografiert.

2.2.4.2 Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA))

Bei einem *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen verwendet werden kann.

Verwendet wurde der ELISA Human CX3CL1/Fractalkine DuoSet® (R&D Systems). Die Durchführung erfolgte laut Protokoll, wobei alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur erfolgten. Abschließend wurde das TMB-Substrat (TMB Substrate Kit, Pierce Biotechnology/Thermo Fisher Scientific) zugegeben und die Farbentwicklung beobachtet. Wurde diese mittels Sichtkontrolle für optimal befunden, wurde die Enzymreaktion mittels 2 N H₂SO₄ gestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag von blau (650 nm) zu gelb (450 nm) kam. Die Farbintensität wurde mittels des Mikroplattenlesers Epoch (BioTek) bei 450 nm bestimmt. Als Kontrollreferenz diente eine Messung bei 550 nm. Abzüglich der Referenzmessung sowie der Leerwerte wurde aus den Messwerten der Konzentrationsreihe eine lineare Funktion ermittelt, welche zur Konzentrationsberechnung verwendet wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Vorkommen der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 sowie der Chemokinrezeptoren CX3CR1 und CXCR6 in humanen Zelllinien

3.1.1 Transkriptionsanalyse der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 sowie der entsprechenden Chemokinrezeptoren CX3CR1 und CXCR6 in humanen Zelllinien

Die Transkription der transmembranen Chemokine CX3CL1 und CXCL16 sowie deren Chemokinrezeptoren CX3CR1 und CXCR6 wurde in humanen Zelllinien auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Als Referenzwert wurde die Transkription des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-(GAPDH)-Gens verwendet, welches unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium sowie äußerer Einflüsse transkribiert wird. Bei den daraus resultierenden ΔC_t -Werten entspricht ein Unterschied von 3,33 einem zehnfachen Transkriptionsunterschied. Somit bedeutet ein niedriger ΔC_t -Wert eine hohe Expression.

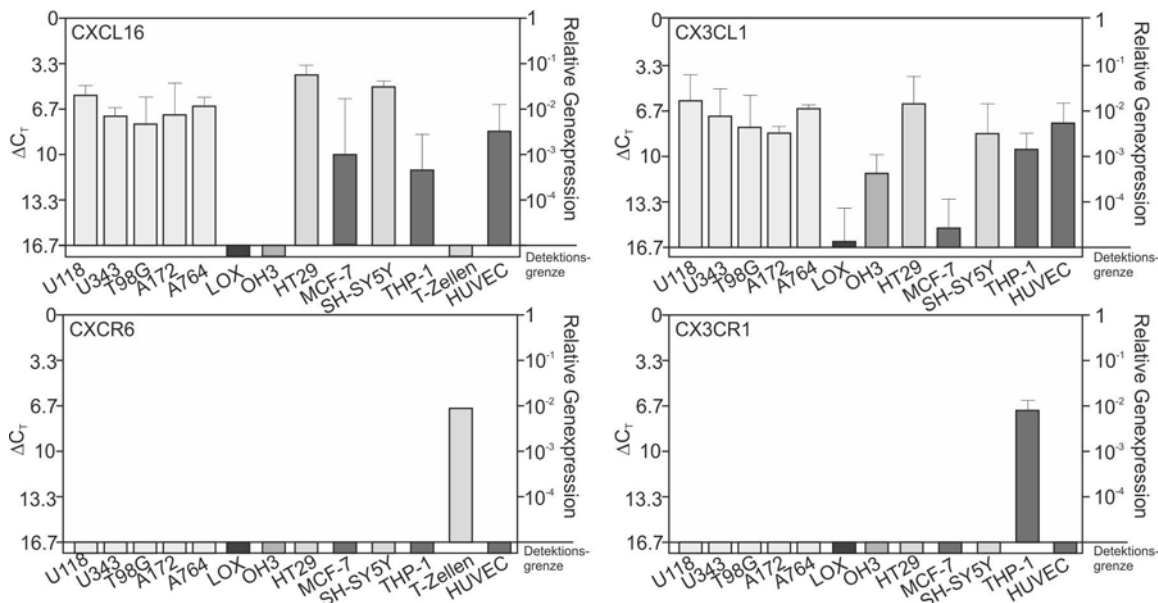


Abb. 3.1: Transkriptionsanalyse der transmembranen Chemokine CX3CL1, CXCL16 und ihrer Rezeptoren CX3CR1 und CXCR6 in humanen Zelllinien. Zur Untersuchung wurde die mRNA verschiedener Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft sowie humaner Endothelzellen (HUVEC) und T-Zellen mittels TaqMan®-RT-PCR quantifiziert. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. CXCL16 wurde von vielen Tumorzelllinien und von HUVEC-Zellen transkribiert, wohingegen LOX-, OH3- und T-Zellen die wenigen Ausnahmen bildeten. Der Rezeptor CXCR6 hingegen wurde nur in aktivierten T-Zellen gefunden. CX3CL1 wurde von allen getesteten Tumorzelllinien und von HUVEC-Zellen transkribiert. Für LOX- und MCF7-Zellen lag die Expression nur knapp oberhalb der Detektionsgrenze. CX3CR1 wurde nur in THP-1-Zellen nachgewiesen (n=3). Vorversuche hierzu wurden schon während der Diplomarbeit durchgeführt.

Die transmembranen Chemokine CX3CL1 und CXCL16 wurden von allen getesteten humanen Glioblastomzelllinien (U118, U343, T98G, A172 und A764) deutlich transkribiert ($\Delta C_t \sim 7$), ebenso wie von einer großen Bandbreite anderer humaner Zelllinien. Sowohl CX3CL1 als auch CXCL16 wurden von der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT29 ($\Delta C_t(\text{CX3CL1}) = 6,3$; $\Delta C_t(\text{CXCL16}) = 4,3$), von der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y ($\Delta C_t(\text{CX3CL1}) = 8,4$;

$\Delta C_{t(CXCL16)} = 5,17$), der monozytären Zelllinie THP-1 ($\Delta C_{t(CX3CL1)} = 9,6$; $\Delta C_{t(CXCL16)} = 11,2$) und von Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC; $\Delta C_{t(CX3CL1)} = 7,7$; $\Delta C_{t(CXCL16)} = 8,4$) exprimiert. Die kleinzellige Lungenkarzinomzelllinie OH3 transkribierte nur CX3CL1 ($\Delta C_{t(CX3CL1)} = 11,3$), wohingegen die Mammakarzinomzelllinie MCF7 zwar deutlich CXCL16 aber nur in sehr geringen Maß CX3CL1 produzierte ($\Delta C_{t(CX3CL1)} = 15,3$; $\Delta C_{t(CXCL16)} = 10,2$). Die Melanomzelllinie LOX exprimiert kein CXCL16 und auch CX3CL1 wurde nur knapp oberhalb der Detektionsgrenze transkribiert ($\Delta C_{t(CX3CL1)} = 16,3$). Da auch auf Proteinebene kein Nachweis der transmembranen Chemokine erfolgte (s. 3.1.2), wurde diese Zelllinie in allen nachfolgenden Experimenten als Negativkontrolle verwendet. Weiterhin konnte in aktivierten T-Zellen kein CXCL16 nachgewiesen werden.

Während die Chemokinliganden in vielen verschiedenen Zelltypen vorkamen, wurden die Chemokinrezeptoren CX3CR1 und CXCR6 nur von jeweils einem Zelltyp transkribiert. CXCR6 konnte ausschließlich in aktivierten T-Zellen ($\Delta C_{t(CXCR6)} = 9,7$) nachgewiesen werden, CX3CR1 nur in der monozytären Zelllinie THP-1 ($\Delta C_{t(CX3CR1)} = 7,1$).

3.1.2 Expressionsnachweis der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 in humanen Zelllinien

Zum Nachweis der Expression wurde exemplarisch eine Immunfluoreszenzfärbung der Chemokine CXCL16 und CX3CL1 in ausgewählten Zelllinien durchgeführt (Abb. 3.2). Übereinstimmend mit der Transkriptionsanalyse konnte gezeigt werden, dass die humane Glioblastomzelllinie U343 deutliche Mengen CXCL16 exprimiert. CX3CL1 wurde in der humanen Glioblastomzelllinie A764 nachgewiesen. Wie die Transkriptionsanalyse zeigte, exprimierten beide Glioblastomzelllinien zudem das jeweils andere transmembrane Chemokin. Die Melanomzelllinie exprimiert hingegen auf Proteinebene weder CXCL16 noch CX3CL1.

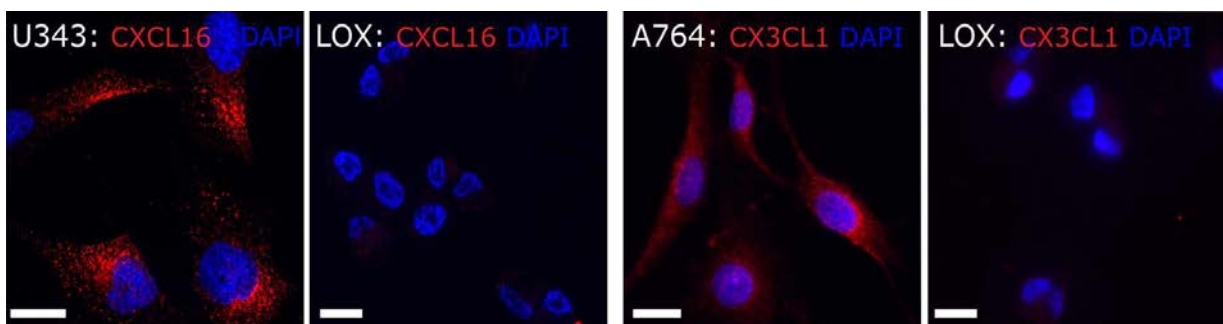


Abb. 3.2: Expressionsnachweis von CXCL16 und CX3CL1 in humanen Zelllinien. Nach Aceton-Methanol-Fixierung wurden die Zellen immunzytochemisch gegen CXCL16 (U343, LOX; anti-CXCL16 (PeproTech, 500-P200)) oder CX3CL1 (A764, LOX; anti-CX3CL1 (PeproTech, 500P98)) gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor[®]555-anti-Kaninchen verwendet. Die U343-Zellen waren deutlich CXCL16-positiv, die LOX-Zellen exprimierten kein CXCL16. CX3CL1 wurde in den A764-Zellen nachgewiesen, in den LOX-Zellen erfolgte kein Nachweis auf Proteinebene. Die Zelllinien wurden exemplarisch auf Grund der Transkriptionsanalyse ausgewählt (n=3).

3.2 Stimulation von humanen Zellen durch die Chemokine CX3CL1 und CXCL16

3.2.1 Stimulation von humanen Glioblastomzelllinien mit CX3CL1 und CXCL16

Wie unter 3.1.1 gezeigt, exprimierten Glioblastomzelllinien zwar die Chemokine CX3CL1 und CXCL16 aber nicht die entsprechenden Rezeptoren. Die Stimulation von verschiedenen Glioblastomzelllinien (U343, A764, T98G) mit diesen Chemokinen, in einer löslichen rekombinanten Form, erzeugte allerdings eine zeit- und dosisabhängige Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2. (Abb. 3.3 und 3.5)

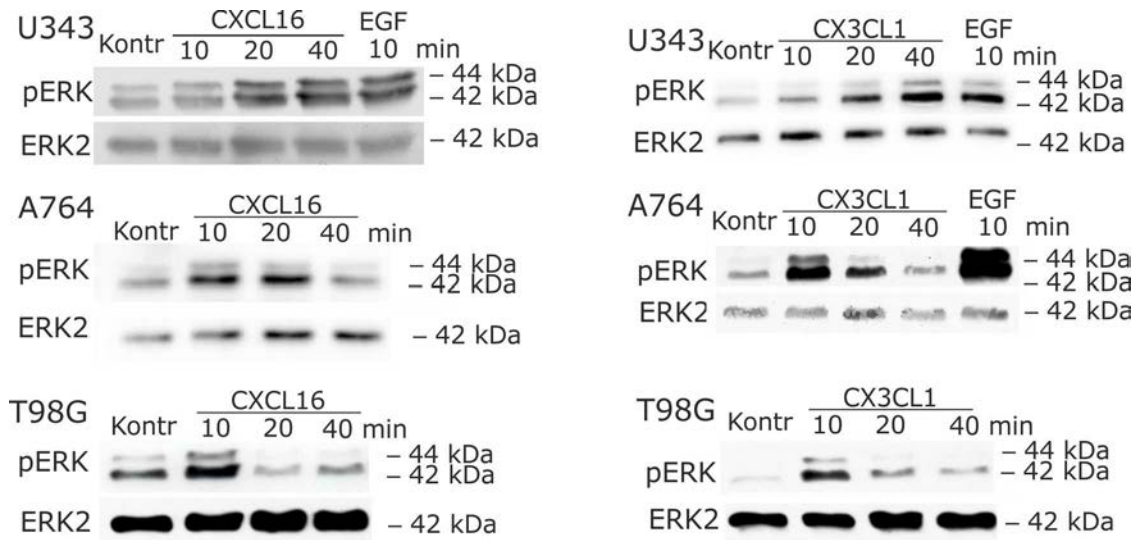


Abb. 3.3: Zeitabhängige Stimulation von humanen Glioblastomzelllinien mit CXCL16 und CX3CL1. Die Glioblastomzelllinien wurden für 10, 20 und 40 min mit 1 nM CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert. Als Positivkontrolle wurde 10 min mit 2 nM EGF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Zelllysate wurden im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Die Stimulation mit CXCL16 erzeugte in den U343-Zellen nach 20 und 40 min eine Phosphorylierungssteigerung von ERK1/2. In den A764-Zellen trat dieser Effekt schon nach 10-20 min auf und war nach 40 min wieder auf das Ausgangsniveau zurückgegangen. In den T98G-Zellen erzeugte CXCL16 nur nach 10 min eine deutliche Aktivierung von ERK1/2. Die Stimulation mit CX3CL1 führte in den U343-Zellen zu einem Anstieg des Phosphorylierungsgrads über die Zeit, wobei das Maximum nach 40 min erreicht war. In den A764-Zellen lag das Maximum dieser Stimulation bei 10 min. Ebenso wie CXCL16 führte CX3CL1 in den T98G-Zellen nur nach 10 min zu einer starken Aktivierung von ERK1/2. Für jede Zelllinie mit jedem Chemokine gilt mindestens n=2. Vorversuche hierzu wurden schon während der Diplomarbeit durchgeführt.

In Abbildung 3.3 ist zu sehen, dass es in der Glioblastomzelllinie U343 durch eine Stimulation sowohl mit CX3CL1 als auch mit CXCL16 zu einer Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 nach 20-40 min kam. Bei der Zelllinie A764 lag diese Reaktion etwas früher bei 10-20 min, nach 40 min war die Menge des phosphorylierten ERKs auf das Ausgangsniveau zurückgegangen. Die T98G-Zellen hingegen wiesen ein schmaleres Zeitfenster der Reaktion auf. Hierbei war nur für den Zeitpunkt 10 min eine deutliche Aktivierung zu beobachten, nach 20 min war der anfängliche Phosphorylierungsgrad wieder erreicht. Diese Ergebnisse wurden für U343 (CXCL16) und A764 (CX3CL1) auch mittels Immunfluoreszenzfärbung verifiziert (Abb. 3.4). Für die Stimulation der U343-Zelllinie mit

CXCL16 konnte eine Phosphorylierungssteigerung nach 10 und 20 min gezeigt werden, für die A764-Zellen war eine deutliche Aktivierung nach 20 min erkennbar, die auch nach 40 min noch sichtbar war.

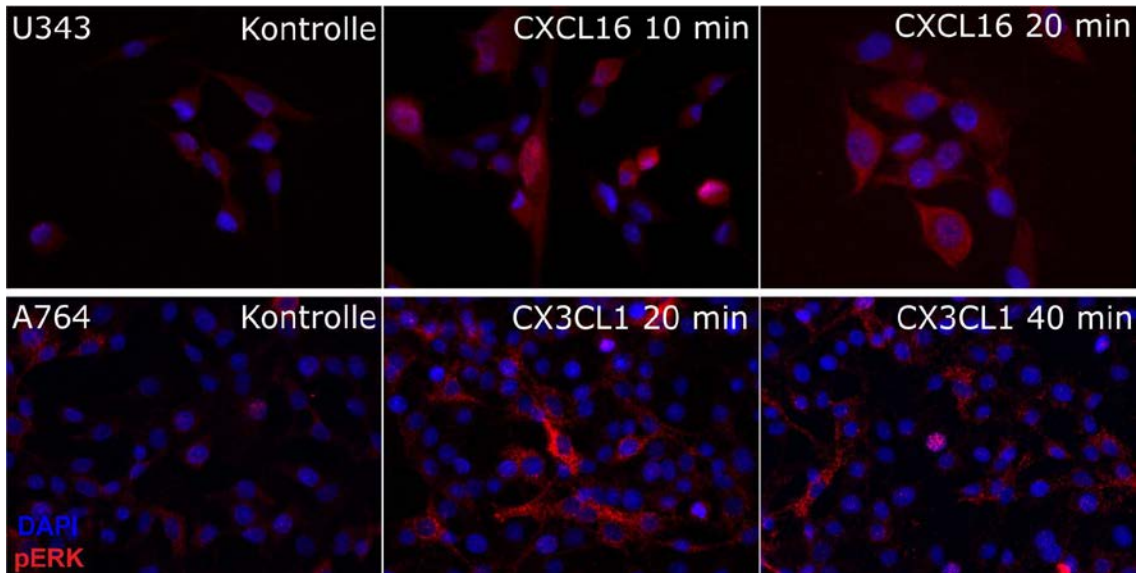


Abb. 3.4: Immunfluoreszenz-Färbung der Stimulation von Glioblastomzellen mit CXCL16 bzw. CX3CL1. Die Glioblastomzellen wurden für 10 und 20 min (CXCL16) bzw. 20 und 40 min (CX3CL1) mit 1 nM rekombinanten Chemokin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Aceton-Methanol fixiert und immunzytochemisch gegen phosphoryliertes ERK1/2 (Phospho-p42/44 MAPK Antikörper (Cell Signaling Technologies, #9101)) gefärbt. Als Sekundärintikörper wurde Alexa Fluor®555-anti-Kaninchen verwendet. In den U343-Zellen erzeugte CXCL16 nach 10 und 20 min eine Steigerung des Phosphorylierungsgrads von ERK1/2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Eine Stimulation mit CX3CL1 bewirkte in den A764-Zellen eine Aktivierung von ERK1/2 nach 20 und 40 min (n=2). Vorversuche hierzu wurden schon während der Diplomarbeit durchgeführt.

Die Dosisabhängigkeit der Stimulation von Glioblastomzellen mit den transmembranen Chemokinen CX3CL1 und CXCL16 ist in Abb. 3.5 für die T98G-Zelllinie gezeigt. Die Stimulation mit CXCL16 erzeugte ein Maximum des Phosphorylierungsgrads bei einer Konzentration von 0,1 - 1 nM, wobei der Effekt bei 10 nM wieder schwächer wurde. CX3CL1 hingegen führte ab einer Konzentration von 0,1 nM zu einem gleichbleibend starken phospho-ERK-Signal.

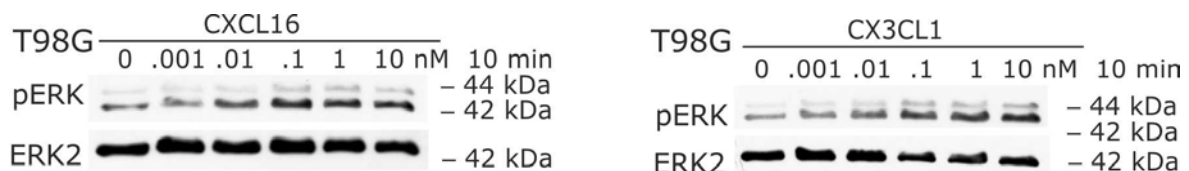


Abb. 3.5: Dosisabhängige Stimulation von T98G-Zellen mit CXCL16 und CX3CL1. Die Glioblastomzelllinie T98G wurden für 10 min mit verschiedenen Konzentrationen von 0-10 nM CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Die Stimulation mit CXCL16 führte ab einer Konzentration von 0,01 nM zu einer Aktivierung von ERK1/2, wobei ein deutlicher Effekt erst ab 0,1 nM zu beobachten war. Die Aktivierung durch CX3CL1 erfolgte im gleichen Konzentrationsspektrum. Es zeigten sich minimale Effekte bei 0,01 nM CX3CL1 und eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung ab 0,1 nM (n=3). Vorversuche hierzu wurden schon während der Diplomarbeit durchgeführt.

3.2.2 Stimulation von primären, humanen Glioblastomzellen mit CX3CL1 und CXCL16

Der stimulierende Effekt der transmembranen Chemokine auf rezeptornegative Zellen konnte ebenfalls in primären humanen Glioblastomzellen gezeigt werden (Abb. 3.6). Die Primärkultur 70/11 exprimierte CXCL16 ($\Delta C_T = 9,02$), wies allerdings keine Expression des Rezeptors CXCR6 auf. Eine Stimulation dieser Primärkultur 70/11 mit löslichem, rekombinanten CXCL16 führte zu einer leicht gesteigerten Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 nach 20 min. Nach 40 min war eine deutliche Aktivierung sichtbar. Eine Stimulation der Primärkultur 49/09, welche CX3CL1 ($\Delta C_T = 9,55$) aber nicht den Rezeptor CX3CR1 exprimierte, mit löslichem, rekombinanten CX3CL1 erzeugte eine transiente Aktivierung von ERK1/2 nach 10-20 min.

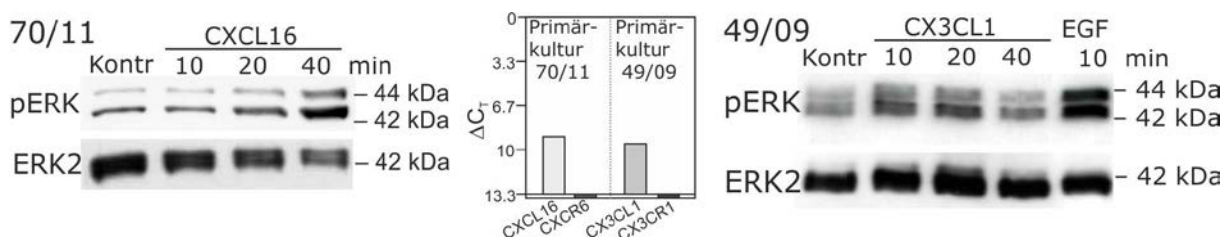


Abb. 3.6: Zeitabhängige Stimulation von primären, humanen Glioblastomzellen mit CXCL16 und CX3CL1. Die Glioblastom-Primärkulturen wurden für 10, 20 und 40 min mit 1 nM rekombinanten CXCL16 bzw. CX3CL1 inkubiert. Als Positivkontrolle wurde für die Kultur 49/09 10 min mit 2 nM EGF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Im Western Blot wurden die Zelllysate auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Zusätzlich wurde die Expression von CXCL16/CXCR6 bzw. CX3CL1/CX3CR1 in der entsprechenden Primärkultur mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. CXCL16 erzeugte in der Primärkultur 70/11 ($\Delta C_{T(CXCL16)} = 9,0$; CXCR6 negativ) nach 20-40 min eine Aktivierung von ERK1/2. Die Stimulation mit CX3CL1 führte in der Primärkultur 49/09 ($\Delta C_{T(CX3CL1)} = 9,6$; CX3CR1 negativ) nach 10-20 min zu einer Aktivierung. EGF führte nach 10 min zu einer deutlichen Phosphorylierung von ERK1/2.

3.2.3 Stimulation der humanen Melanomzelllinie LOX mit CX3CL1 und CXCL16

Im Gegensatz zu den Glioblastomzellen war die Expression in der Melanomzelllinie LOX sowohl für die Liganden (CXCL16 und CX3CL1) als auch für die Rezeptoren (CXCR6 und CX3CR1) negativ (vgl. 3.1.1). Eine Stimulation mit den löslichen, rekombinanten Chemokinen CX3CL1 und CXCL16 führte in dieser Zelllinie zu keiner Phosphorylierungssteigerung der MAP-Kinasen ERK1/2 (Abb. 3.7). Das ERK1/2 in der LOX-Zelllinie aber grundsätzlich aktivierbar war, zeigte die Positivkontrolle mit den Wachstumsfaktoren EGF und FGF-2.

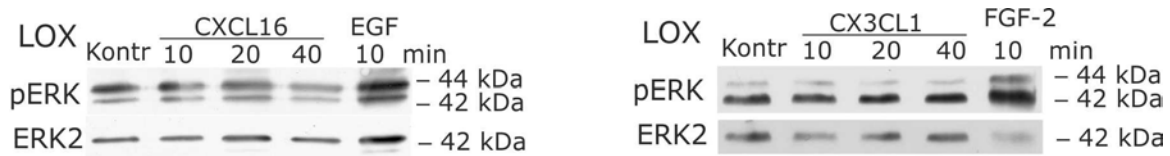


Abb. 3.7: Zeitabhängige Stimulation der humanen Melanomzelllinie LOX mit CXCL16 und CX3CL1. Die Melanomzelllinie LOX wurden für 10, 20 und 40 min mit 1 nM CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert. Als Positivkontrolle erfolgte eine Stimulation mit 2 nM EGF bzw. FGF-2 für 10 min. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Weder die Stimulation mit CXCL16 noch mit CX3CL1 führte zu einer Aktivierung von ERK1/2 in einem Zeitraum von 40 min. EGF und FGF-2 erzeugten jeweils eine deutlich vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 (n=3). Vorversuche hierzu wurden schon während der Diplomarbeit durchgeführt.

3.3 Biologische Effekte der Stimulation mit den Chemokinen CX3CL1 und CXCL16 in humanen Zelllinien

3.3.1 Einfluss auf die Migration durch Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 in humanen Glioblastomzelllinien

Da Chemokine als Chemotaxis-vermittelnde Peptide entdeckt wurden, liegt es nahe, einen Einfluss von CXCL16 und CX3CL1 auf die Migration der humanen Glioblastomzelllinien zu vermuten. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde *in vitro* ein Wundheilungsversuch („Scratchtest“) durchgeführt. Hierzu wurden dem konfluenten Zellrasen mit einer Pipettenspitze Kratzer zugefügt und diese zum Zeitpunkt 0 h fotografiert. Es folgte eine 24-stündige Stimulation, nach deren Abschluss die exakten Stellen erneut fotografiert wurden. Über einen Vergleich der zwei Bilder wurde die Zunahme der mit Zellen bewachsenen Fläche bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass weder CXCL16 (100% zu 101,9%) noch CX3CL1 (100% zu 95,6%) nach 24 h einen Einfluss auf die Migration der U343- bzw. A764-Zellen besitzen (Abb. 3.8 erste zwei Reihen). Als Positivkontrolle wurden 20% fetales Kälberserum (FCS) verwendet. Dies führte in beiden Zelllinien zu einer deutlich gesteigerten Migration (U343=284,4% bzw. A764=208,4%) nach 24 h (Abb. 3.8 untere Reihe).

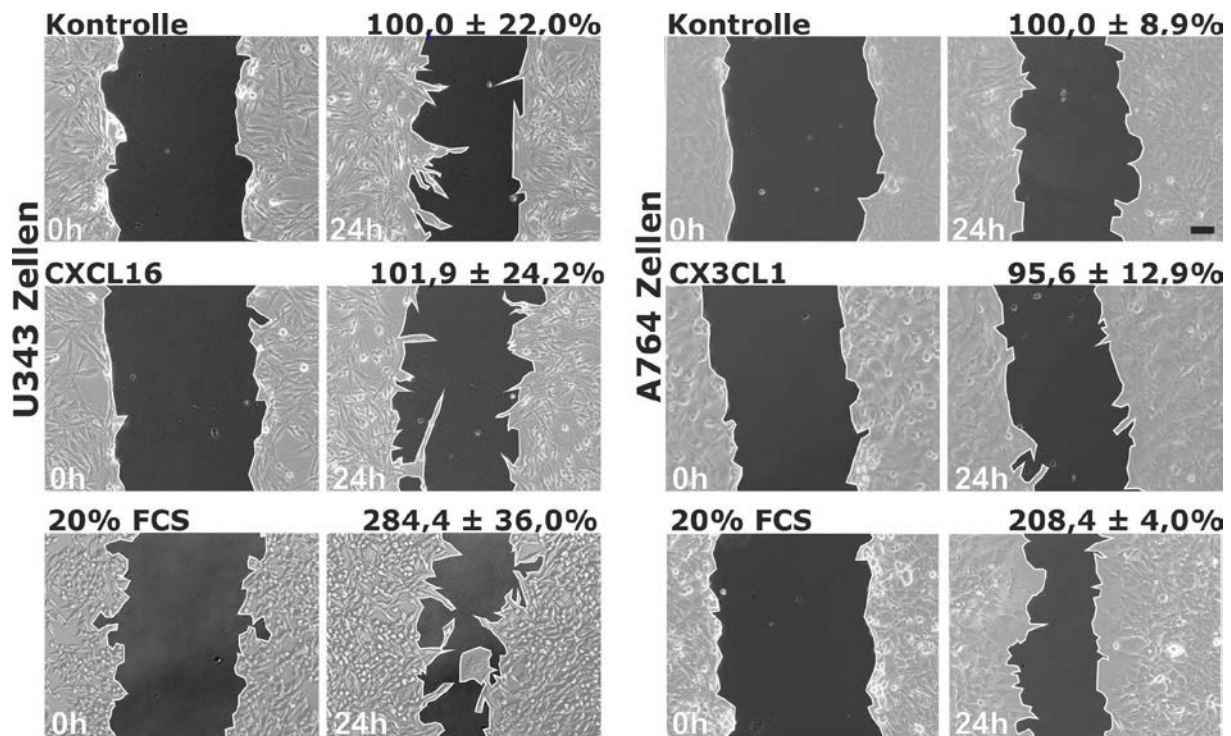


Abb. 3.8: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Migration von humanen Glioblastomzelllinien. Dem konfluenten Zellrasen wurden mit einer Pipettenspitze Kratzer zugefügt und diese zum Zeitpunkt 0 h an 3 verschiedenen Stellen fotografiert. Nach 24-stündiger Stimulation mit 10 nM Chemokine wurden exakt diese Stellen erneut fotografiert und die Fläche des Spalts zu beiden Zeitpunkten bestimmt. Die Differenz der Flächen der unstimulierten Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Als Positivkontrolle diente eine Inkubation mit 20% FCS. Der Balken gibt einen Maßstab von 50 μ m an. CXCL16 zeigte keinen Einfluss auf die Migration der U343-Zelllinie, wohingegen 20% FCS zu einer deutlichen Migrationssteigerung führt. In den A764-Zellen zeigte sich durch CX3CL1 ebenfalls keine gesteigerte Migration. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten angegeben. Vorversuche hierzu wurden schon während der Diplomarbeit durchgeführt.

3.3.2 Einfluss auf die Proliferation durch Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 in humanen Zelllinien

Für viele Chemokine ist eine proliferationsfördernde Wirkung bekannt. So wurden unter anderem für CXCL8 wachstumsfördernde Effekte in Melanomen (Norgauer et al. 1996) und für CCL2 auf humane Endothelzellen (Salcedo et al. 2000) nachgewiesen. Auch für die transmembranen Chemokine CXCL16 und CX3CL1 wurde ein Einfluss auf die Proliferation beschrieben. So fördert CX3CL1 unter anderem das Wachstum von vaskulären glatten Muskelzellen (White et al. 2010) und Prostatakrebszellen (Shulby et al. 2004), wo CXCL16 ebenfalls eine proliferationsfördernde Wirkung zeigt (Darash-Yahana et al. 2009).

Wie bereits erwähnt (vgl. 3.1.1), exprimierten die humanen Glioblastomzelllinien die Chemokine CX3CL1 und CXCL16, allerdings nicht deren Rezeptoren CX3CR1 und CXCR6. Wurden die Glioblastomzellen der Linie U343 aber für 24 h mit 1 nM CXCL16 stimuliert, erzeugte dies eine signifikante Steigerung der Proliferation (152,6%) verglichen mit der unstimulierten Probe, die gleich 100% gesetzt wurde. Die Proliferation wurde mittels eines WST-basierten Tests bestimmt. Als Positivkontrolle wurde hierbei Medium mit 10% fetalem

Kälberserum (FCS) verwendet (Abb. 3.9 links). Der gleiche Effekt war in den A764-Zellen nach 24-stündiger Stimulation mit CX3CL1 zu beobachten (139,5%; Abb. 3.9 mitte).

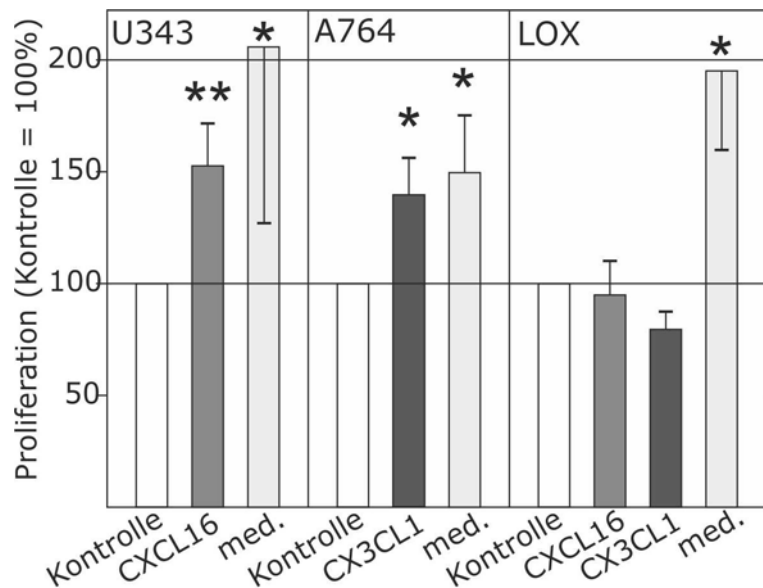


Abb. 3.9: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Proliferation von humanen Zelllinien. Die Proliferationsrate wurde nach 24-stündiger Stimulation mit 1 nM rekombinanten CXCL16 bzw. CX3CL1 durch einen WST-basierten Test bestimmt. Als Positivkontrolle wurde Medium mit 10% FCS verwendet. Die unstimulierte Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt. Die Stimulation mit CXCL16 erzeugte in den U343-Zellen eine signifikante Steigerung der Proliferation. Ebenso führte CX3CL1 in den A764-Zellen zu einer signifikant gesteigerten Proliferation. In den LOX-Zellen wurde durch die Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 keine Proliferationssteigerung erreicht. Eine signifikante Steigerung gelang nur mit 10% FCS im Medium. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes aus vier technischen Replikaten bestand, angegeben. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem Student's T-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Die humane Melanomzelllinie LOX wies eine Proliferationssteigerung nur bei 10% fetalem Kälberserum auf. CX3CL1 (79,5% \pm 7,9) und CXCL16 (94,9% \pm 15,3) zeigten nach 24 h keinen proliferationsfördernden Effekt (Abb. 3.9 rechts). Die LOX-Zellen exprimieren im Gegensatz zu den Glioblastomzellen die Chemokine CX3CL1 und CXCL16 nicht (vgl. 3.1.1).

3.3.2 Einfluss auf die Apoptose durch Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 in der humanen Glioblastomzelllinien A764

Um den Einfluss der Chemokine CXCL16 und CX3CL1 auf die Apoptose zu untersuchen, wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mittels eines Fluoreszenz-gekoppelten Caspasesubstrats (Ac-DEVD-AMC (Bachem)) bestimmt. Die Zellen der Glioblastomzelllinie A764 wurden für 48 h mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid (2 mM) inkubiert. Erfolgte diese Inkubation in Gegenwart von 1 nM CXCL16/CX3CL1, verringerte sich die Aktivität der Caspasen 3 und 7 signifikant (CXCL16: 55,3%; CX3CL1: 45,8%) im Vergleich zur Temozolomid-Probe, deren Wert gleich 100% gesetzt wurde. Im Gegensatz dazu zeigte die

Negativkontrolle des Lösungsmittels DMSO nur eine sehr schwache Aktivität der Caspasen, wobei CX3CL1 und CXCL16 keinen Einfluss auf die Aktivität hatten (Abb. 3.10).

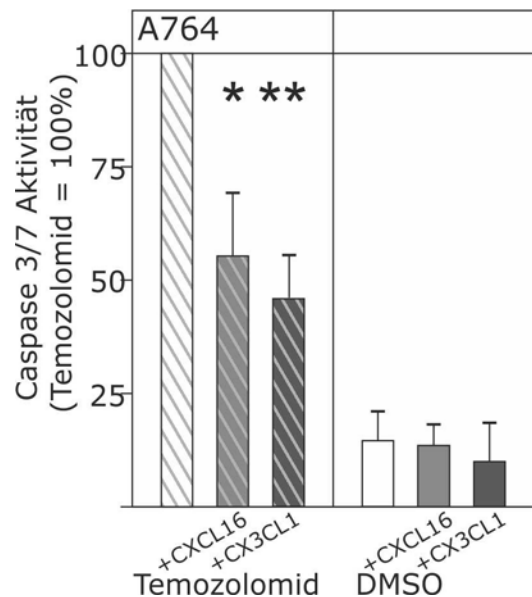


Abb. 3.10: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Apoptose von humanen A764-Glioblastomzellen. Die A764-Zellen wurden für 48 h mit 2 mM Temozolomid (2% DMSO als Kontrolle) behandelt und zusätzlich mit 1 nM CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert. Die Aktivitätsbestimmung der Caspase 3 und 7 erfolgte über einen Fluoreszenz-basierten Proteolyse-Test (Bachem). Die Messung der Temozolomid-Probe ohne Chemokine wurde gleich 100% gesetzt. Sowohl eine Stimulation mit CXCL16 als auch eine Stimulation mit CX3CL1 führte zu einer signifikant reduzierten Caspase 3/7-Aktivität in den A764-Zellen. In den DMSO-Kontrollproben kam es nur zu einer geringen Aktivierung der Caspasen 3/7, auf die CXCL16 und CX3CL1 keinen Effekt hatten. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten aufgeführt. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem Student's T-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.4 Untersuchungen zu möglichen Rezeptoren, die die Effekte der Stimulation von CX3CL1 und CXCL16 in humanen Zelllinien vermitteln

3.4.1 Inhibition von G-Protein-vermittelter Signaltransduktion in humanen Zellen

Obwohl die humanen Glioblastomzelllinien die Rezeptoren CX3CR1 und CXCR6 nicht exprimierten (vgl. 3.1.1), wurde durch die Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 sowie eine Proliferationssteigerung und ein Schutz vor Apoptose hervorgerufen (vgl. 3.2 und 3.3). Da Chemokinrezeptoren meist mehr als ein Chemokin binden, könnten diese Effekte durch andere Chemokinrezeptoren vermittelt worden sein. Im Allgemeinen handelt es sich bei Chemokinrezeptoren um G-Proteingekoppelte 7-Transmembranrezeptoren, womit durch Inhibition der G-Proteine durch Pertussistoxin eine Aktivierung der MAP-Kinasen unterbunden werden könnte.

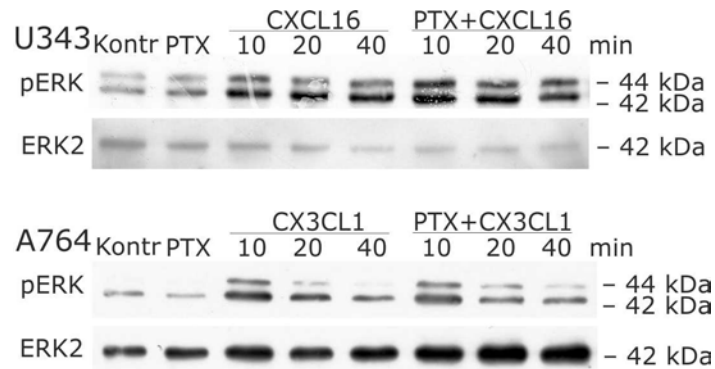


Abb. 3.11: Stimulation humaner Glioblastomzelllinien mit CXCL16 und CX3CL1 in Gegenwart von Pertussistoxin. Nach Vorinkubation für 18 h mit 200 ng/ml Pertussistoxin (PTX) wurden die Glioblastomzelllinien U343 und A764 mit 1 nM rekombinanten CXCL16 bzw. CX3CL1 für 10, 20 und 40 min stimuliert. Als Kontrolle diente die gleiche Stimulation ohne vorherige PTX-Inkubation. Im Western Blot wurden die Zelllysate auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Sowohl auf die A764 als auch auf die U343-Zellen hatte PTX keinen direkten Einfluss. Ebenso wurde der Einfluss der Chemokinstimulation auf die Aktivierung von ERK1/2 nicht durch PTX beeinflusst (n=3).

In Abbildung 3.11 ist gezeigt, dass weder die Stimulation mit rekombinanten CXCL16 noch die mit rekombinanten CX3CL1 durch Pertussistoxin beeinflusst wurde. Die Glioblastomzelllinie U343 wurde mit CXCL16 in Gegenwart von PTX stimuliert, wobei diese Reaktion keinen Unterschied zu der Kontrollreaktion ohne PTX zeigte. CXCL16 erzeugte jeweils eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 nach 10, 20 und 40 min. Pertussistoxin selbst zeigte keinen aktivierenden Effekt auf die Zellen (Abb. 3.11 oben). Für die Reaktion von CX3CL1 auf die Glioblastomzelllinie A764 zeigte sich das gleiche Bild. Die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 als Folge der Stimulation ist in Gegenwart von Pertussistoxin identisch zu der Kontrollreaktion, wobei das Maximum der Aktivierung bei 10 min lag und danach abnahm. Auch in dieser Zelllinie weist PTX keinen eigenen Effekt auf die Phosphorylierung auf (Abb. 3.11 unten). Die aktivierenden Effekte der Chemokine CXCL16 und CX3CL1 wurden somit nicht über $G_{i\alpha}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt.

Als zusätzliche Kontrolle wurde die monozytäre Zelllinie THP-1, die den Rezeptor CX3CR1 exprimiert ($\Delta C_{t(CX3CR1)} = 7,1$), in Gegenwart von PTX mit CX3CL1 stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung der Kinase Akt untersucht. Die Kinase Akt wurde hierbei verwendet, da die Stimulation mit CX3CL1 in der THP-1-Zelllinie ein deutlich stärkeres Signal für Akt als für ERK1/2 lieferte. Es zeigte sich, dass die Aktivierung von Akt durch CX3CL1 nach Zugabe von PTX deutlich gehemmt wurde (Abb. 3.12). Die Funktionsfähigkeit des Pertussistoxins wurde damit nachgewiesen.

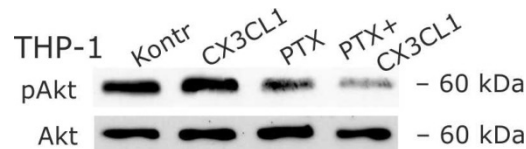


Abb. 3.12: Stimulation der monozytären Zelllinie THP-1 mit CX3CL1 in Gegenwart von Pertussistoxin. Nach Vorinkubation für 18 h mit 200 ng/ml Pertussistoxin (PTX) wurde die THP-1-Zelllinie mit 1 nM CX3CL1 für 20 min stimuliert. Als Kontrolle diente die gleiche Stimulation ohne vorherige PTX-Inkubation. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Zelllysate wurden im Western Blot auf eine Phosphorylierung von Akt untersucht. Der Akt-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Die Stimulation mit CX3CL1 erzeugte eine Aktivierung von Akt. Erfolgte diese Stimulation nach Vorinkubation mit PTX, wurde der stimulatorische Effekt von CX3CL1 auf die THP-1 inhibiert (n=3).

Weiterhin wurde uns eine veränderte CX3CL1-Variante (F1) aus dem Labor von Prof. Philippe Deterre zu Verfügung gestellt. Diese bindet, trotz verkürztem N-Terminus, mit gleicher Affinität wie das native CX3CL1 an den Rezeptor CX3CR1. Allerdings erzeugt diese manipulierte Variante keine Effekte in der rezeptortragenden Zelle, es handelt sich somit um einen Antagonisten zu CX3CR1 (Dorgham et al. 2009). Nach Stimulation mit CX3CL1 zeigte die Glioblastom Primärkultur 76/12 eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2. Der gleiche Phosphorylierungsgrad konnte durch eine Stimulation mit der manipulierten CX3CL1-Variante F1 erzeugt werden (Abb. 3.13). Ein antagonistischer Effekt wie auf CX3CR1 lag hier nicht vor.

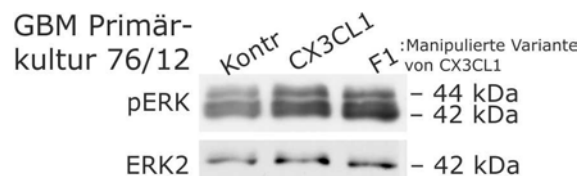


Abb. 3.13: Stimulation der Glioblastom-Primärkultur 76/12 mit einer manipulierten CX3CL1-Variante. Die primären Glioblastomzellen der Kultur 76/12 wurden für 20 min mit 1 nM CX3CL1 oder 100 nM F1 (manipulierte CX3CL1-Variante; rekombinanter CX3CR1-Antagonist) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Zelllysate wurden im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Sowohl CX3CL1 als auch die F1-Variante aktivierten nach 20 min die Phosphorylierung von ERK1/2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

3.4.2 Expressionsnachweis von Chemokin- und Decoy-Rezeptoren in humanen Zelllinien

Zusätzlich zu den Inhibitionsversuchen mit Pertussistoxin zeigte auch die Expressionsanalyse verschiedener Rezeptoren, dass typische G-Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren nicht die Ursache der Signaltransduktion nach Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 sein konnten.

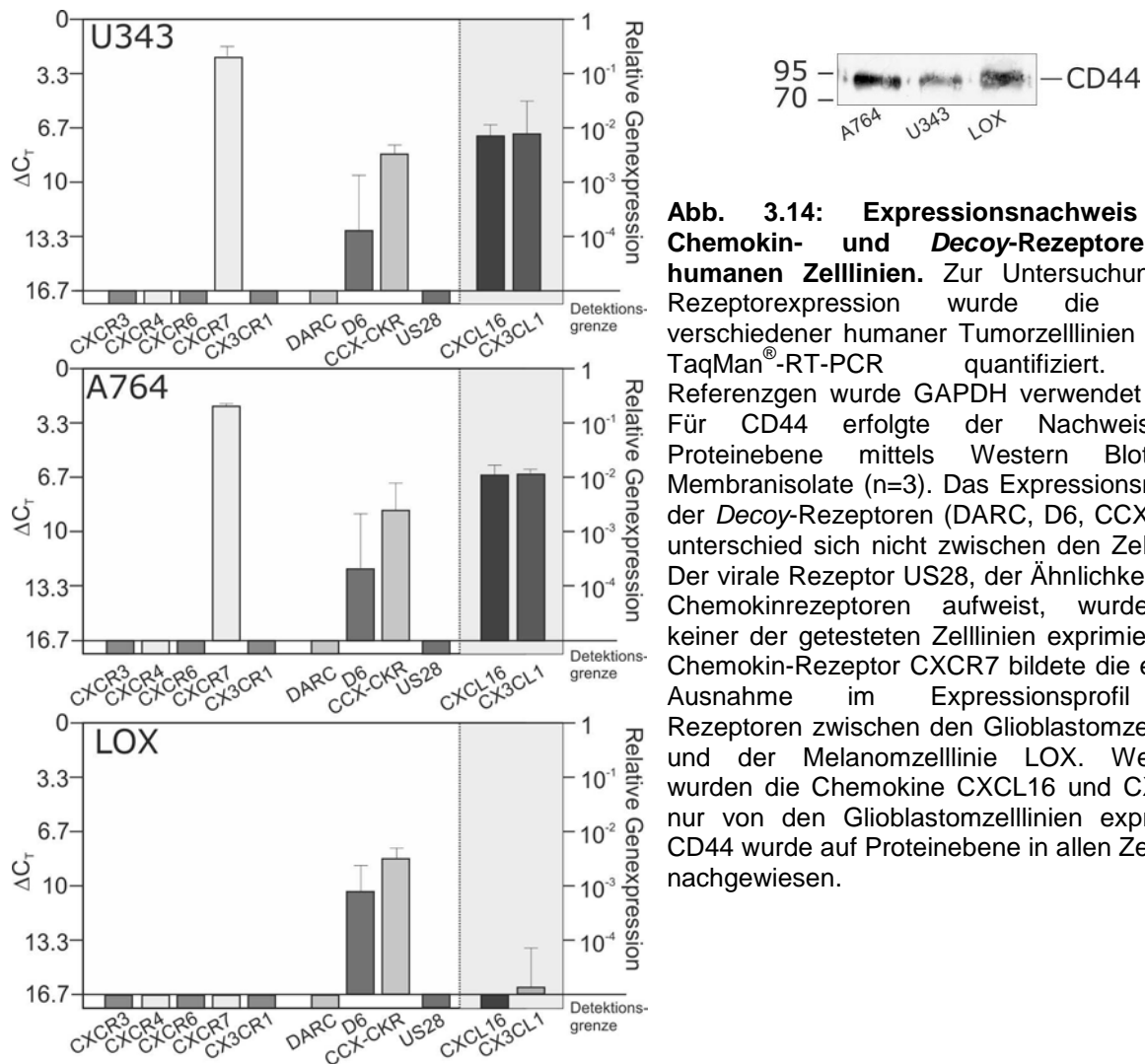


Abbildung 3.14 (links) zeigt, dass sowohl CXCR3 als auch CXCR4, die ein strukturell ähnliches Ligandenspektrum zu CXCR6 aufweisen, weder von den Glioblastomzelllinien U343 und A764 noch von der Melanomzelllinie LOX exprimiert wurden. Weiterhin zeigten diese Zelllinien ein identisches Expressionsprofil für die Decoy-Rezeptoren *Duffy antigen receptor for chemokines* (DARC), D6 und CCX-CKR. Diese binden eine Vielzahl verschiedener Chemokine, vermitteln aber keine Signaltransduktion in die Zelle. Sie dienen wahrscheinlich der Regulation der Chemokinkonzentration in ihrer Umgebung (Graham et al. 2012). Das vom humanen Cytomegalovirus codierte Chemokinrezeptor-ähnliche Molekül US28, bei dem es sich um einen funktionalen Chemokin-bindenden Rezeptor handelt (Vomaske et al. 2009), wurde von keiner der hier untersuchten Zelllinien exprimiert. CD44 ist ein multifunktionaler Rezeptor, der unter anderem bei Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle spielt (Naor et al. 1997). Da CD44 aber sowohl von der LOX-Zelllinie als auch von den Glioblastomzelllinien U343 und A764 exprimiert wurde (Abb. 3.14 rechts), war auch dieser Rezeptor nicht differenziell für die Signalvermittlung durch CXCL16 und CX3CL1. Nur der atypische Chemokinrezeptor CXCR7 wurde allein von den Glioblastomzelllinien exprimiert,

nicht aber von den LOX-Zellen (Abb. 3.14 links). Zudem kann CXCR7 G-Protein-unabhängig eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 bewirken (Kumar et al. 2012), sodass eine Stimulation des Signalwegs trotz PTX möglich wäre.

3.4.3 Inhibition des Chemokinrezeptors CXCR7 in der Glioblastomzelllinie U343

Sollte es sich bei CXCR7 um den Rezeptor handeln, der die Effekte nach Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 in ansonsten Rezeptor-negativen Zellen vermittelt, müsste die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 durch einen spezifischen CXCR7-Antagonisten (CCX733) hemmbar sein. Abbildung 3.15 zeigt, dass sowohl in Gegenwart von 0,1% DMSO als auch in Gegenwart von CCX733 eine Phosphorylierungssteigerung von ERK1/2 durch Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 erfolgte.

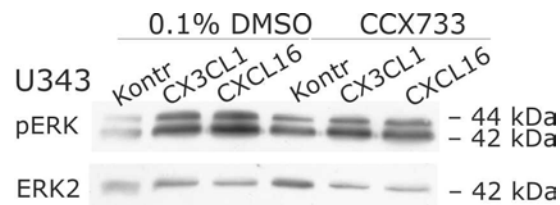


Abb. 3.15: Stimulation der Glioblastomzelllinie U343 mit CX3CL1 und CXCL16 in Gegenwart des CXCR7-Antagonisten CCX733. Nach Vorinkubation für 2 h mit 100 nM CCX733 wurden die U343-Zellen mit 1 nM CX3CL1 bzw. CXCL16 für 20 min stimuliert. Als Kontrolle diente die gleiche Stimulation in Gegenwart von 0,1% DMSO. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Nach 20 min erzeugten sowohl CX3CL1 als auch CXCL16 eine Aktivierung von ERK1/2. CCX733 konnte dies nicht inhibieren (n=2).

3.5 Bindungsexperimente mit löslichem, rekombinanten CX3CL1 und CXCL16 in humanen Zelllinien

3.5.1 Bindungsexperimente mit Fluoreszenz- und Biotin-markierten löslichen Chemokinen in humanen Zelllinien

Um den Rezeptor zu identifizieren, der die Signalübertragung von CXCL16 und CX3CL1 vermittelt, wurden Bindungsnachweise mit Fluoreszenz-markierten löslichen, rekombinanten CXCL16 (s-CXCL16-Cy3) und Biotin-markiertem löslichen, rekombinanten CX3CL1 (s-CX3CL1-Biotin) durchgeführt.

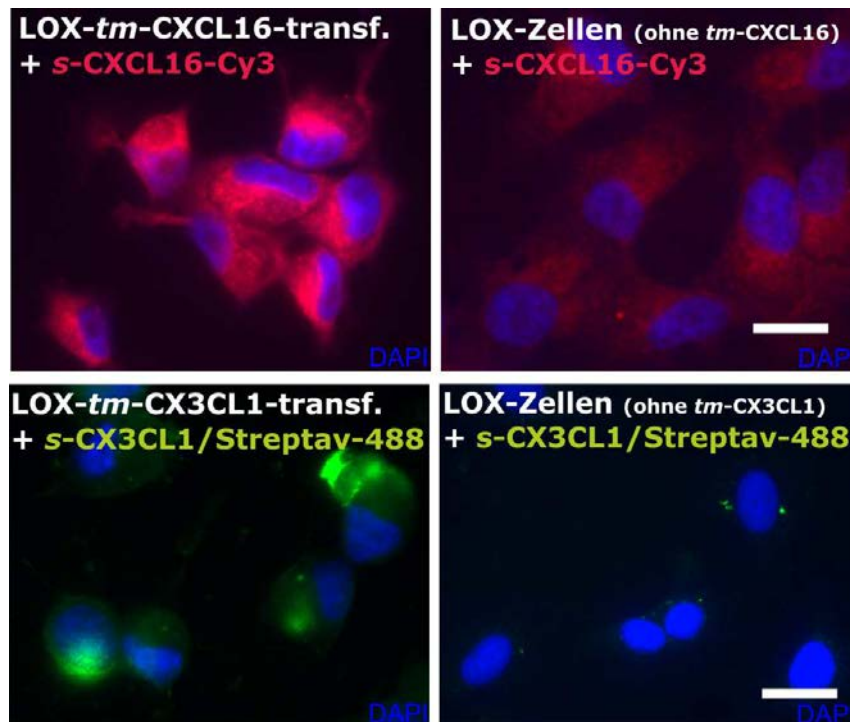


Abb. 3.16: Bindungsnachweis durch Fluoreszenz-markierte Chemokine in transfizierten und untransfizierten LOX-Zellen mittels Lichtmikroskopie. Nach Inkubation für 1 h mit 2 nM Cy3-gekoppeltem CXCL16 bzw. Biotin-gekoppeltem CX3CL1 (hier folgte noch eine 30 minütige Inkubation mit Streptavidin-Alexa Fluor[®]488) wurden die Zellen mit Aceton-Methanol fixiert und die Kerne mit DAPI gegengefärbt. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte LOX-Melanomzellen verwendet. Die Balken zeigen einen Maßstab von 20 μ m an. Das Cy3-gekoppelte CXCL16 band deutlich an die mit *tm*-CXCL16 transfizierten LOX-Zellen. In den untransfizierten LOX-Zellen erzeugte es auf Grund seines lipophilen Charakters nur eine schwache Hintergrundfärbung. Das über die Biotin-Streptavidin-Bindung sichtbar gemachte CX3CL1-Biotin band an die mit *tm*-CX3CL1 transfizierten LOX-Zellen, nicht aber an die untransfizierte Kontrolle (n=2).

In Abbildung 3.16 ist gezeigt, dass LOX-Zellen, die kein transmembranes Chemokin exprimierten, auch kein lösliches Chemokin banden. Wurden LOX-Zellen verwendet, die durch Transfektion die transmembranen (*tm*-) Chemokine CX3CL1 oder CXCL16 exprimierten, änderte sich dieses Bild. Cy3-markiertes s-CXCL16 band deutlich an LOX-Zellen, die mit *tm*-CXCL16 transfiziert waren. Der gleiche Effekt zeigte sich an *tm*-CX3CL1 transfizierten LOX-Zellen, wenn diese mit Biotin-markierten s-CX3CL1 inkubiert wurden. Sichtbar gemacht wurde diese Markierung durch Alexa Fluor[®]488-gekoppeltes Streptavidin, welches eine Bindung mit Biotin einging.

Dieses Ergebnis konnte in einer durchflusszytometrischen Analyse (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) bestätigt werden. Biotin-markiertes CXCL16 und CX3CL1 banden deutlich stärker an entsprechend transfizierte LOX-Zellen als an pcDNA transfizierte Kontrollzellen. Auch hier wurden die Bindungen indirekt über eine Biotin/Avidin-Fluorescein-Bindung (Avidin gekoppelt an Fluoresceinisothiocyanat (FITC)) messbar gemacht (Abb. 3.17). Abgebildet wurde die Zellzahl (Ordinate) gegen die Fluoreszenzintensität (Abszisse).

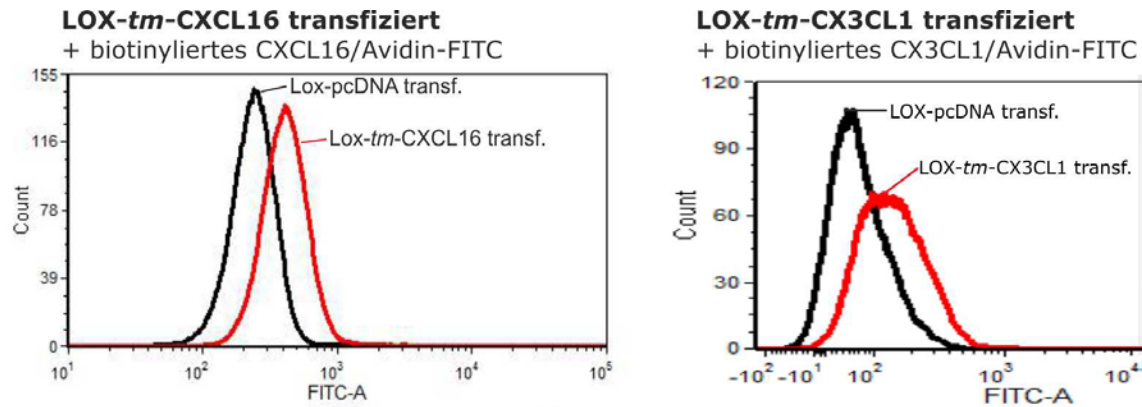


Abb. 3.17: Bindungsnachweis durch Fluoreszenz-markierte Chemokine in transfizierten LOX-Zellen mittels FACS-Analyse. Die transfizierten LOX-Zellen wurden für 1 h mit 2 nM Biotin-gekoppeltem rekombinanten CXCL16 bzw. CX3CL1 inkubiert. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation mit Avidin-FITC. Anschließend wurde die Fluoreszenz der Zellen im FACS-Gerät analysiert. Sowohl s-CXCL16-Biotin als auch s-CX3CL1-Biotin binden stärker an die entsprechend transfizierten LOX-Zellen als an die pcDNA-transfizierten Zellen.

3.5.2 Bindungsexperimente mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie in humanen Zelllinien

Ein weiterer Nachweis der direkten Bindung von löslichen rekombinanten Chemokinen an die entsprechende transmembrane Variante konnte mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie erbracht werden. Hierzu wurde das transmembrane Chemokin mittels einer nativen Färbung mit spezifischem Primärantikörper und einem Sekundärantikörper, der mit einem 15 nm Goldpartikel gekoppelt war, markiert. Das lösliche Chemokin wurde entweder direkt mit einem 5 nm Goldpartikel (CXCL16) markiert oder indirekt über eine Biotin-Streptavidin-Bindung (CX3CL1).

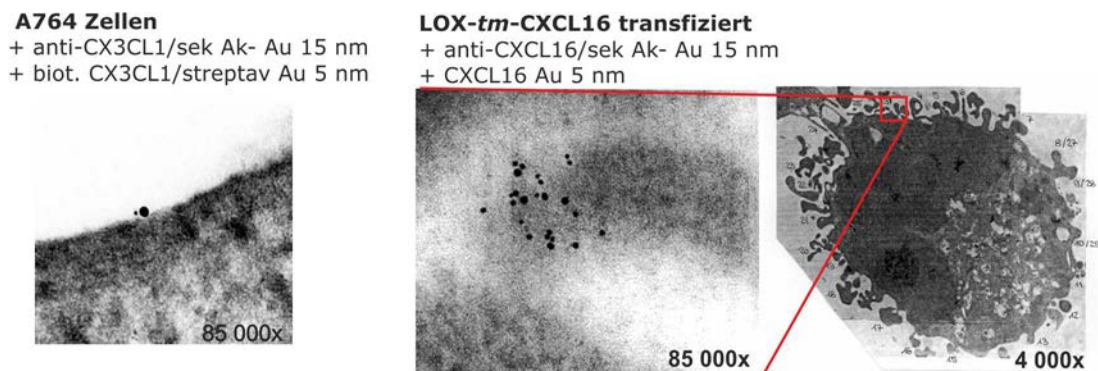


Abb. 3.18: Bindungsnachweis der Chemokine durch Immunogold-Elektronenmikroskopie. Die Zellen wurden zuerst mit einem Primärantikörper gegen CXCL16 bzw. CX3CL1 und anschließend mit einem 15 nm-Goldpartikel-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 µg/ml rekombinanten CXCL16, gekoppelt mit einem 5 nm-Goldpartikel, bzw. rekombinanten CX3CL1-Biotin, dem eine weitere Inkubation mit 5 nm-Goldpartikel-gekoppelten Streptavidin folgte, markiert. Nach Fixierung mit 4% Glutaraldehyd und 0,5% Paraformaldehyd und der Einbettung in Araldit wurden die Zellen im Elektronenmikroskop fotografiert. In den A764-Zellen konnte *tm*-CX3CL1 in direkter Nachbarschaft zu s-CX3CL1 nachgewiesen werden. In den mit *tm*-CXCL16 transfizierten LOX-Zellen gelang dieser Nachweis für CXCL16 (n=2).

In der Glioblastomzelllinie A764 konnte gezeigt werden, dass sich *tm*-CX3CL1 und *s*-CX3CL1 in direkter Nachbarschaft befanden, was einer Bindung der löslichen an die transmembrane Form entspricht (Abb. 3.18 links). Gleiches konnte in LOX-Zellen, die transmembranes CXCL16 nach Transfektion exprimierten, für CXCL16 nachgewiesen werden. Auch hier befanden sich 5 nm und 15 nm Goldpartikel in direkter Nähe (Abb. 3.18 rechts).

3.5.3 Bindungsexperimente mittels chemischer Quervernetzung der Chemokine in transfizierten LOX-Melanomzellen

Weiterhin konnte die Bindung von löslichen rekombinanten Chemokinen an ihre transmembrane Variante mittels chemischer Quervernetzung gezeigt werden. Hierzu wurden Membranisolate der transfizierten LOX-Zellen mit den entsprechenden löslichen Chemokinen inkubiert und mittels Paraformaldehyd (PFA) quervernetzt. Die Proteine wurden anschließend in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt und mittels eines Western Blots auf die Chemokindomäne detektiert.

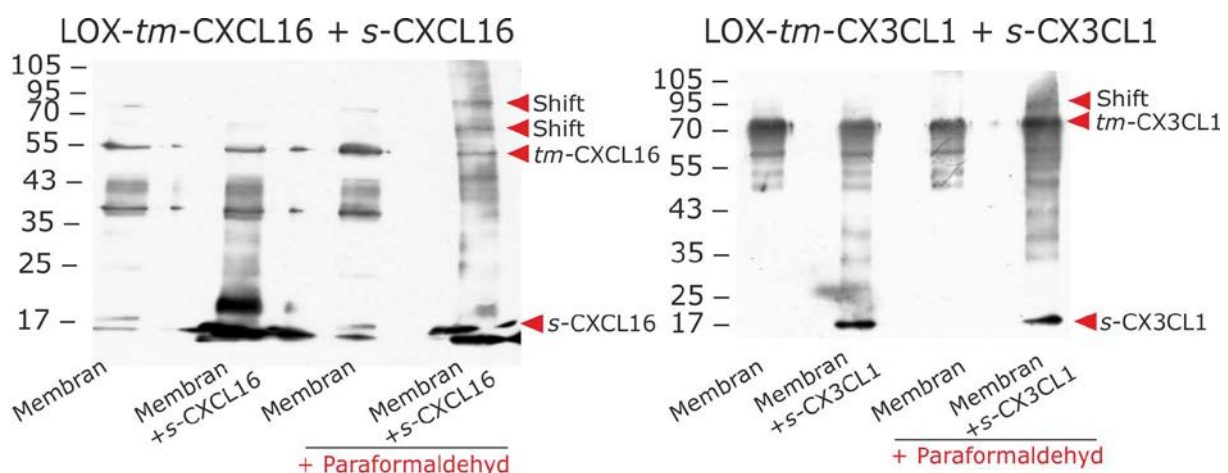


Abb. 3.19: Bindungsnachweis durch chemische Quervernetzung der Chemokine mit Membranisolaten transfizierter LOX-Zellen. Membranisolate von LOX-Zellen, die mit einem *tm*-Chemokin transfiziert waren, wurden mit 2 nM *s*-CXCL16 bzw. *s*-CX3CL1 über Nacht inkubiert und anschließend mit 1% Paraformaldehyd (PFA) quervernetzt. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne PFA. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen die entsprechende Chemokindomäne von CXCL16 bzw. CX3CL1 untersucht. In den Ansätzen, die sowohl *s*-Chemokin als auch PFA enthielten, kam es zu einer Verschiebung der Bande des *tm*-Chemokins zu einem größeren Molekulargewicht. In den anderen Ansätzen wurde diese Molekulargewichtsverschiebung nicht beobachtet (n=2).

In Abbildung 3.19 (links) ist gezeigt, dass nur in Gegenwart von löslichem CXCL16 und PFA es zu einer Verschiebung der Bande zu höherem Molekulargewicht kommt. Die zweite Bandenverschiebung könnte auf ein weiteres Molekül hindeuten, welches an das *tm*-CXCL16 bindet. Für CX3CL1 wurde ebenfalls eine Molekulargewichtsverschiebung des *tm*-Chemokins in Gegenwart von löslichem CX3CL1 und PFA beobachtet (Abb. 3.19 rechts).

3.6 Transfektion der nicht-responsiven Melanomzelllinie LOX mit transmembranen Chemokinen

3.6.1 Nachweis der Transfektion von *tm*-Chemokinen in die Melanomzelllinie LOX

Abbildung 3.20 (außen) zeigt, dass nach Transfektion mit *tm*-CX3CL1 bzw. *tm*-CXCL16 die Expression um das 700-fache (CXCL16) bzw. 8000-fache (CX3CL1) gesteigert wurde. Auch auf Proteinebene konnten die transmembranen Chemokine mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (Abb. 3.20 Mitte). In Zellen, die mit dem Leervektor pcDNA3.1 transfiziert wurden, wurden die *tm*-Chemokine weder auf mRNA- noch auf Proteinebene nachgewiesen.

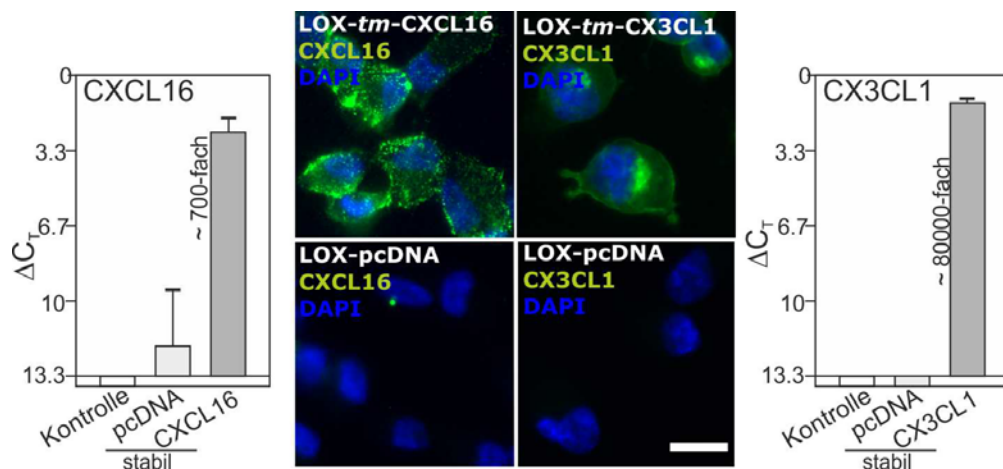


Abb. 3.20: Transfektionsnachweis von CXCL16 und CX3CL1 in humanen LOX-Melanomzellen. Zum Nachweis der Transfektion wurde die mRNA der transfizierten LOX-Zellen mittels TaqMan[®]-RT-PCR quantifiziert. Untransfizierte LOX-Zellen dienten als Kontrolle. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet ($n=3 \pm$ Standardabweichung). Auf Proteinebene erfolgte der Nachweis mittels immunzytochemischer Fluoreszenz-Färbung ($n=3$). Nach Aceton-Methanol-Fixierung wurden die Zellen gegen CXCL16 oder CX3CL1 (anti-Human CXCL16 bzw. anti-Human CX3CL1; PeproTech) gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor[®]488-anti-Kaninchen verwendet und die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Der Balken zeigt einen Maßstab von 20 μ m. CXCL16 wurde von den mit *tm*-CXCL16 transfizierten LOX-Zellen 700-fach stärker transkribiert als von den untransfizierten Kontrollzellen. Die pcDNA-transfizierten Zellen zeigten nur eine sehr geringe Transkription, welche zudem eine hohe Standardabweichung aufwies. Auf Proteinebene wurde CXCL16 in den pcDNA-transfizierten LOX-Zellen nicht nachgewiesen, deutlich aber in den *tm*-CXCL16-transfizierten Zellen. CX3CL1 wurde in den entsprechend transfizierten LOX-Zellen 8000-fach stärker transkribiert als in den Kontrollzellen und war auf Proteinebene deutlich nachweisbar. Die pcDNA-transfizierten Zellen wiesen weder auf mRNA- noch auf Proteinebene CX3CL1 auf.

3.6.2 Stimulation und biologische Effekte durch CX3CL1 und CXCL16 in transfizierten LOX-Zellen

Wurden untransfizierte LOX-Zellen mit löslichem, rekombinanten CXCL16 oder CX3CL1 stimuliert, kam es zu keiner Reaktion der Zelle (vgl. 3.2.3). Im Gegensatz dazu erzeugte eine Stimulation mit löslichem CXCL16 in LOX-Zellen, die mit transmembranen CXCL16 transfiziert wurden, eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 nach 10-20 min (Abb. 3.21 links), entsprechend den Glioblastomzelllinien, die die transmembranen Chemokine exprimierten (vgl. 3.2.1). Ebenso führte eine Stimulation mit rekombinanten CX3CL1 in *tm*-

CX3CL1-transfizierten LOX-Zellen zu einem gesteigerten Phosphorylierungsgrad und somit zur Aktivierung von ERK1/2 nach 10 min und einem Maximum bei 20 min, wobei der Effekt auch nach 40 min noch anhielt (Abb. 3.21 rechts).

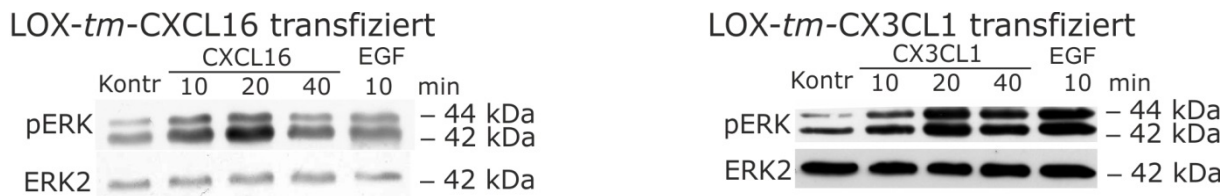


Abb. 3.21: Zeitabhängige Stimulation von humanen transfizierten Lox-Zellen mit CXCL16 oder CX3CL1. Die mit *tm*-CXCL16 bzw. *tm*-CX3CL1 transfizierten LOX-Zellen wurden für 10, 20 und 40 min mit 1 nM CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert. Als Positivkontrolle wurde 10 min mit 2 nM EGF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Die Zelllysate wurden im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. CXCL16 erzeugte in den entsprechend transfizierten LOX-Zellen nach 10 min eine Aktivierung von ERK1/2, die nach 20 min ihr Maximum erreichte und nach 40 min wieder abnahm. In den *tm*-CX3CL1-transfizierten LOX-Zellen folgte nach 10-minütiger Stimulation mit CX3CL1 eine Phosphorylierungssteigerung von ERK1/2, deren Maximum bei 20 min lag und bis zum Vierzig-Minuten-Wert erhalten blieb. EGF führte in beiden Fällen ebenfalls zu einer Aktivierung von ERK1/2 (n=3).

Weiterhin ließen sich anti-apoptotische Effekte in den transfizierten LOX-Zellen nachweisen. Nach 18-stündiger Inkubation mit 0,3 μ M Camptothecin, einem Chinolinalkaloid mit zytostatischer Wirkung, welches die Topoisomerase I hemmt (Pizzolato and Saltz 2003), zeigte sich in allen transfizierten LOX-Zellen eine deutliche Zunahme der gespaltenen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (*cleaved* PARP; cPARP) im Vergleich zu der Kontrollinkubation mit 0,1% DMSO. Hierbei wurde im Western Blot nahezu kein gespaltenes PARP detektiert. Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase ist ein Enzym, welches eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur, insbesondere bei der Korrektur von Einzelstrangbrüchen, spielt (Benafif and Hall 2015). Während der Apoptose wird PARP proteolytisch durch die Caspase 3 gespalten (Brauns et al. 2005) und somit dient die gespaltene Variante als Indikator für den programmierten Zelltod. Wurden die mit *tm*-CXCL16 und *tm*-CX3CL1 transfizierten LOX-Zellen zusätzlich zu Camptothecin mit dem entsprechenden Chemokin stimuliert, fiel die Menge an gespaltenem PARP geringer aus als nach der Inkubation mit Camptothecin allein (Abb. 3.22 links). In den LOX-pcDNA-Zellen hatte die Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 keinen anti-apoptotischen Effekt (Abb. 3.22 rechts).

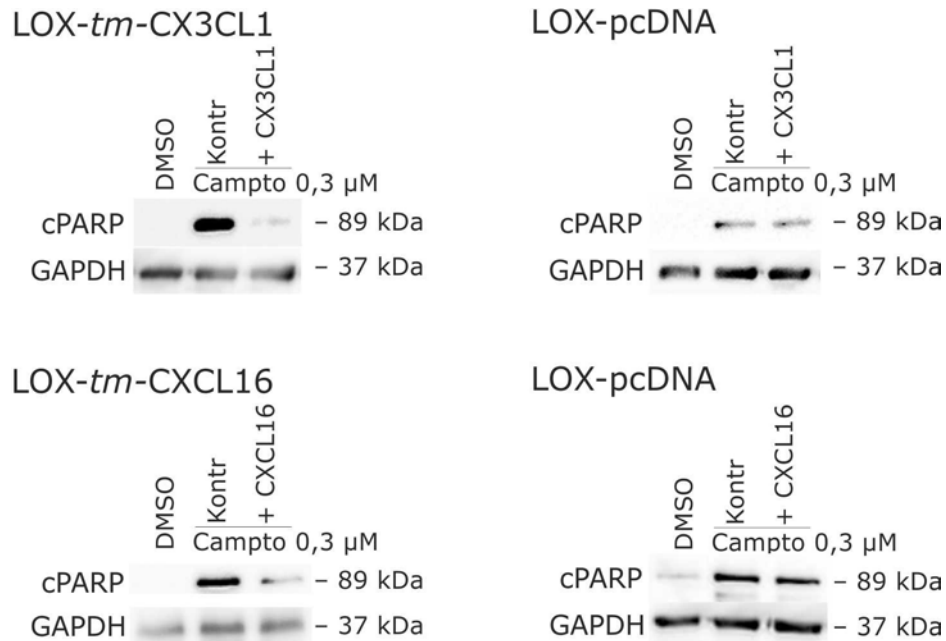


Abb. 3.22: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Apoptose von transfizierten LOX-Zellen. Die mit *tm*-CXCL16, *tm*-CX3CL1 bzw. pcDNA transfizierten LOX-Zellen wurden für 18 h mit 0,3 μM Camptothecin inkubiert und zusätzlich mit 10 nM CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert. Die Inkubation mit 0,1% DMSO diente als Negativkontrolle. Anschließend wurden die Zellen lysiert und im Western Blot auf gespaltenes PARP (cPARP) untersucht. Der GAPDH-Nachweis wurde als Beladungskontrolle verwendet. Allgemein wurde in allen verwendeten LOX-Zellen eine deutliche Zunahme des gespaltenen PARP durch Inkubation mit Camptothecin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nachgewiesen. In den mit *tm*-CX3CL1 bzw. *tm*-CXCL16 transfizierten Zellen erzeugte die Stimulation mit dem entsprechenden Chemokin eine deutliche Reduktion der gespaltenen PARP-Menge im Vergleich zur Camptothecin-Inkubation ohne zusätzliche Stimulation. In den pcDNA-transfizierten LOX-Zellen hatte die Chemokinstimulation keinen Einfluss auf die Spaltung von PARP (n=3).

Ebenso wie im Western Blot, zeigte sich in der immunzytochemischen Färbung auf gespaltenes PARP, dass durch die zusätzliche Stimulation mit löslichen Chemokinen in den entsprechend transfizierten LOX-Zellen ein anti-apoptotischer Effekt trotz Stimulation mit 0,3 μM Camptothecin (18 h) entstand (Abb. 3.23). In den mit *tm*-CXCL16 transfizierten LOX-Zellen reduzierte sich die Menge an cPARP signifikant auf 34,9%, in den mit *tm*-CX3CL1 transfizierten LOX-Zellen signifikant auf 56,9%. Auf die Lox-pcDNA-Zellen hatte die Stimulation mit s-CXCL16 und s-CX3CL1 keinen Einfluss. Die cPARP-Menge blieb im Vergleich zur reinen Camptothecin-Inkubation nahezu unverändert (CXCL16: 97,2%; CX3CL1: 98,2%). Die Menge an gespaltenem PARP in den DMSO-Kontrollreaktionen entsprach der Reduktion durch die Chemokinstimulation bzw. 34,9% bei den mit pcDNA-transfizierten Zellen.

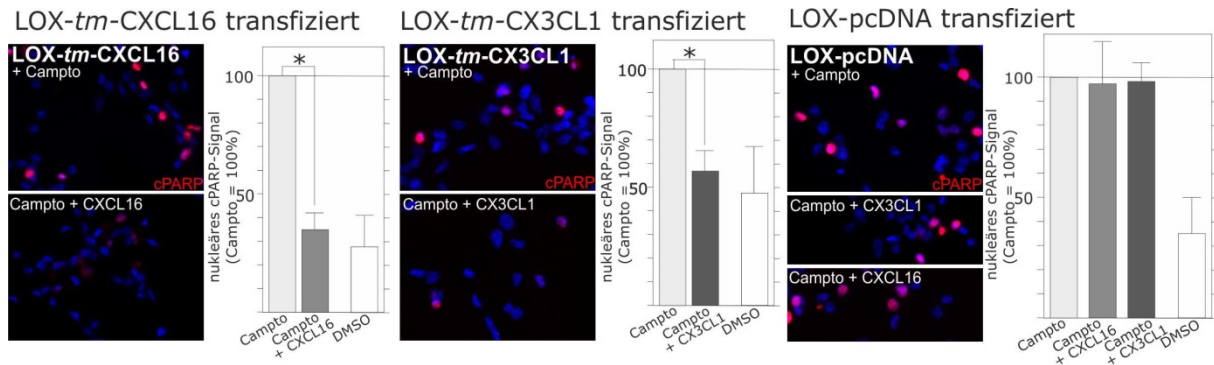


Abb. 3.23: Einfluss der Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 auf die Spaltung von PARP in transfizierten LOX-Zellen. Die mit *tm*-CXCL16, *tm*-CX3CL1 bzw. pcDNA transfizierten LOX-Zellen wurden für 18 h mit 0,3 μ M Camptothecin inkubiert und zusätzlich mit 10 nM CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert. Die Inkubation mit 0,1% DMSO diente als Negativkontrolle. Anschließend wurden die Zellen mit Aceton-Methanol fixiert und auf *cleaved* PARP (*cleaved* PARP (Asp214) Antikörper, (Cell Signaling, #9541)) gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor[®]555-anti-Kaninchen verwendet und die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Für die Auswertung wurde das cPARP-Signal auf die Kernfläche normiert. Die Inkubation mit Camptothecin führte in allen verwendeten LOX-Zellen zu einer Spaltung von PARP im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Stimulation mit dem entsprechenden Chemokin reduzierte die Menge an gespaltenem PARP in den mit *tm*-CX3CL1 bzw. *tm*-CXCL16 transfizierten Zellen signifikant. In den pcDNA-transfizierten Zellen hatte die Chemokinstimulation keinen Einfluss auf die Spaltung von PARP. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten aufgeführt. Statistische Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem Student's T-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Somit können in transfizierten Zellen genau wie in den getesteten Tumorzelllinien ähnliche Stimulationseffekte durch lösliche Chemokine erreicht werden, sobald das korrespondierende transmembrane Chemokin exprimiert ist.

3.6.3 Trunkierung der intrazellulären Domäne der transmembranen Chemokine zum Nachweis der Signaltransduktion

Ein weiterer Nachweis zur Vermittlung des Chemokinsignals über die transmembranen Chemokine erfolgte durch die Trunkierung der Intrazellulärdomäne von CX3CL1 und CXCL16 (Δ Chemokin). Hierzu wurden mittels zielgerichteter Mutagenese zwei Stopcodons direkt hinter die Transmembrandomäne in das Plasmid eingefügt. Der Mutationserfolg wurde zum einen durch Sequenzierung des Plasmids und zum anderen auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot nachgewiesen.

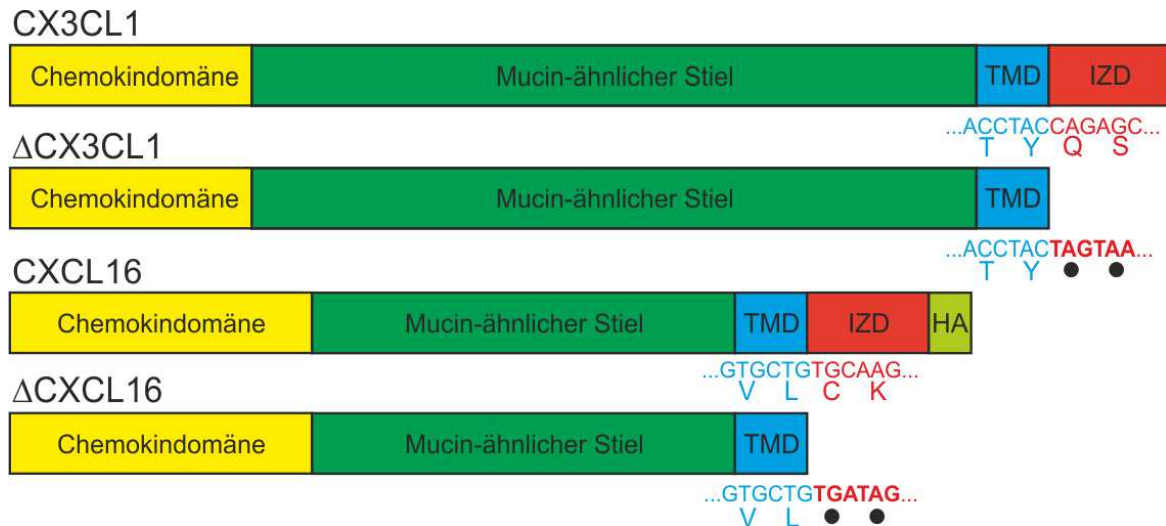


Abb. 3.24: Schematische Darstellung der Trunkierung der intrazellulären Domäne der transmembranen Chemokine. Neben den einzelnen Domänen der transmembranen Chemokine sind die Basentriplets der letzten zwei Aminosäuren der Transmembrandomäne (TMD) und die Basentriplets der ersten zwei Aminosäuren der intrazellulären Domäne (IZD) und die daraus resultierenden Aminosäuren gezeigt. Bei den trunkierten Chemokinen (Δ Chemokin) sind die mutierten Basensequenzen und die daraus entstehenden Stopcodons (●), welche den Wegfall der intrazellulären Domäne und, im Fall des CXCL16, der Hämagglutinin(HA)-Markierung bewirken, gezeigt.

Das vom CXCL16-Plasmid codierte Chemokin enthielt am intrazellulären C-Terminus eine Hämagglutinin(HA)-Markierung, welche durch die Mutation nicht mehr translatiert wurde (Abb. 3.25 oben links). Für Δ CX3CL1 erfolgte der Mutationsnachweis über einen Größenvergleich im Western Blot auf die Chemokindomäne von CX3CL1. Hierbei zeigte sich, dass die trunkierte Variante einige Kilodalton kleiner war als die unmutierte Variante (rechnerisch ergibt sich aus 35 fehlenden Aminosäuren eine Differenz von ca. 3,5 kDa) (Abb. 3.25 oben rechts).

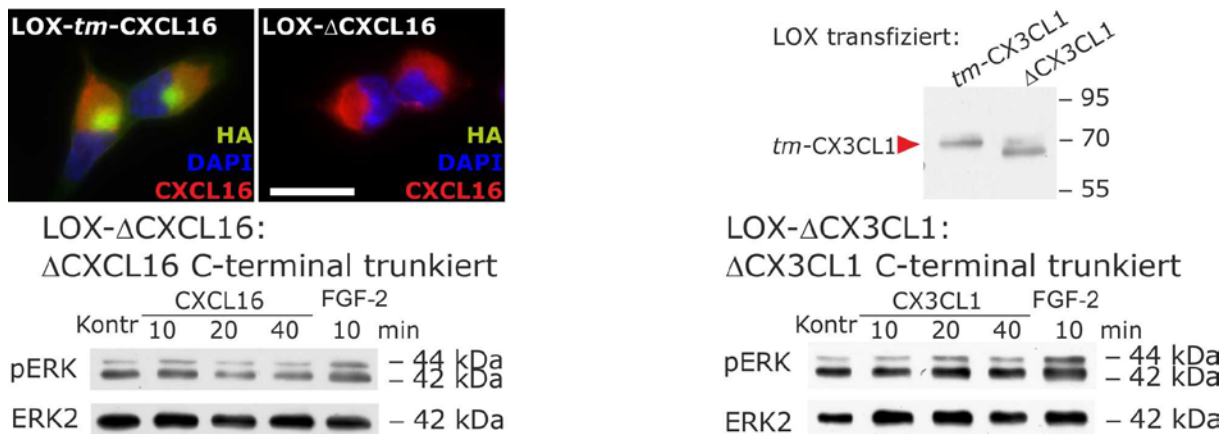


Abb. 3.25: Nachweis der C-terminalen Trunkierung der transmembranen Chemokine und Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 in transfizierten LOX-Zellen. Die mit der C-terminal trunkeierten Variante Δ CXCL16 bzw. Δ CX3CL1 transfizierten LOX-Zellen wurden für 10, 20 und 40 min mit 1 nM rekombinanten CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert. Als Positivkontrolle wurde 10 min mit 2 nM FGF-2 stimuliert. Die Zelllysate wurden im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle (n=3). Weiterhin wurde die Trunkierung auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzfärbung (CXCL16) oder Western Blot (CX3CL1) nachgewiesen (n=2). LOX-*tm*-CXCL16 und LOX- Δ CXCL16 wurden auf CXCL16 und Hämagglutinin (HA) gefärbt, wobei letzteres C-terminal im CXCL16-Vektor enthalten ist. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor-555[®] anti-Kaninchen (CXCL16) und Alexa Fluor[®] 488 anti-Maus (HA) verwendet und die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Die Membranisolate von LOX-*tm*-CX3CL1 und LOX- Δ CX3CL1 wurden vor der Verwendung in der SDS-PAGE deglykosyliert, mittels Western Blot gegen CX3CL1 detektiert und der Unterschied so durch die Molekulargewichtsverschiebung sichtbar gemacht. Die Stimulation mit CXCL16 führte in den LOX- Δ CXCL16-Zellen zu keiner Aktivierung von ERK1/2. FGF-2 hingegen erzeugte eine gesteigerte Phosphorylierung. In der Immunfluoreszenzfärbung wiesen die LOX- Δ CXCL16-Zellen keine Hämagglutinin-Markierung mehr auf, waren aber deutlich positiv für CXCL16. Die Stimulation mit CX3CL1 in den LOX- Δ CX3CL1-Zellen erzeugte keinen stimulatorischen Effekt auf ERK1/2. FGF-2 erhöhte den Phosphorylierungsgrad. Im Western Blot auf CX3CL1 war erkennbar, dass das *tm*-CX3CL1 der LOX- Δ CX3CL1-Zellen ein geringeres Molekulargewicht aufwies als das der LOX-Zellen, die mit der vollständigen CX3CL1-Variante transfiziert waren.

LOX-Zellen, die mit einem trunkeierten transmembranen Chemokin transfiziert wurden, konnten nicht mehr durch CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert werden, im Gegensatz zu LOX-Zellen, die mit der vollständigen Variante transfiziert waren (vgl. 3.6.1). Nach Stimulation mit CXCL16 oder CX3CL1 kam es nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2. Diese konnte nur noch durch FGF-2 hervorgerufen werden (Abb. 3.25 unten).

3.6.4 Zielgerichtete Mutagenese von Phosphorylierungsmotiven in der intrazellulären Domäne des transmembranen CXCL16

Bei der reversen Signaltransduktion der TNF-Superfamilie erfolgt die Signalweitergabe vorwiegend über die Phosphorylierung eines Caseinkinase I-Motivs (S/TXXS/T), welches in der intrazellulären Domäne der Transmembranproteine enthalten ist (Watts et al. 1999). Ephrine und Semaphorine vermitteln ihre Signale unter anderen über Prolin-reiche Regionen (Zhou et al. 2008; Klein 2009). Für das transmembrane CXCL16 käme ebenfalls ein

Wurden die mit Kontroll-siRNA transfizierten T98G-Zellen mit rekombinanten CXCL16 oder CX3CL1 stimuliert, zeigte sich weiterhin eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 nach 15 min (Abb. 3.27 Blot Mitte). In den Zellen, die mit der spezifischen CX3CL1-siRNA transfiziert wurden, konnte eine Stimulation mit CX3CL1 keine Aktivitätssteigerung von ERK1/2 mehr hervorrufen (Abb. 3.27 Blot rechts). Gleiches galt für CXCL16; auch hier wurde in den mit CXCL16-siRNA transfizierten Zellen keine gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen (Abb. 3.27 Blot links).

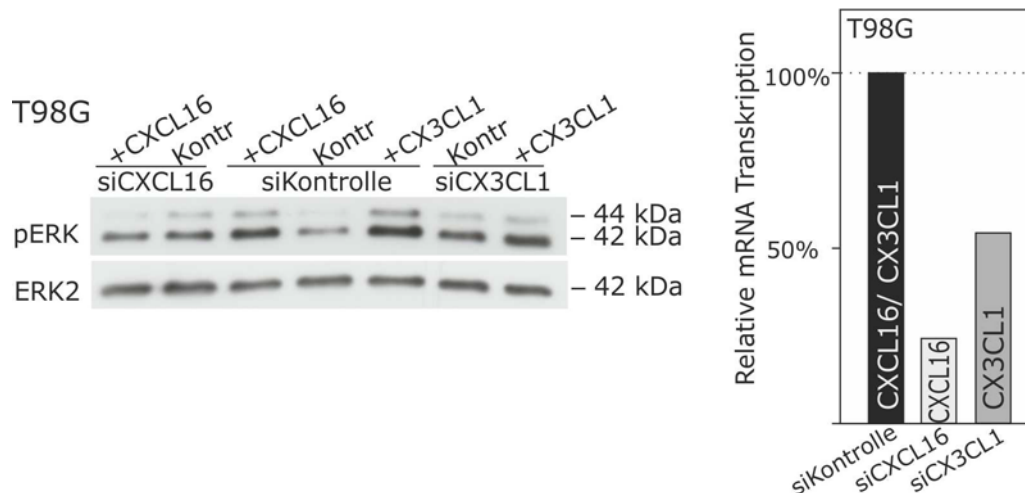


Abb. 3.27: Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 nach siRNA-Transfektion in humanen T98G-Zellen. Nach Transfektion der T98G-Zellen mit siRNA gegen CXCL16 bzw. CX3CL1 sowie einer Kontroll-siRNA wurde der Transfektionserfolg mittels TaqMan®-RT-PCR nachgewiesen. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Gezeigt ist die Reduktion in Bezug auf die Kontroll-siRNA-Transfektion. 36 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1 nM rekombinanten CXCL16 bzw. CX3CL1 für 15 min stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Zelllysate im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Durch die Transfektion mit spezifischer siRNA gegen CXCL16 und CX3CL1 ließ sich die transkribierte Menge dieser Chemokine in den T98G-Zellen deutlich senken im Vergleich zu den Zellen, die mit der unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden. In den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen führte die Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 zu einer Aktivierung von ERK1/2. Diese Effekte wurden durch die Verwendung der spezifischen siRNA gegen das entsprechende Chemokin unterbunden (n=2).

3.7.2 Transfektion von responsiven Glioblastom-Primärkulturen mit siRNA zur Expressionsminimierung von CXCL16 und CX3CL1

Ebenso wie in der Zelllinie T98G konnte auch in zwei Primärkulturen, die aus verschiedenen Glioblastomen stammten, gezeigt werden, dass eine Reduktion des Expressionsniveaus von CX3CL1 und CXCL16 eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 durch Stimulation mit dem entsprechenden Chemokin verhinderte.

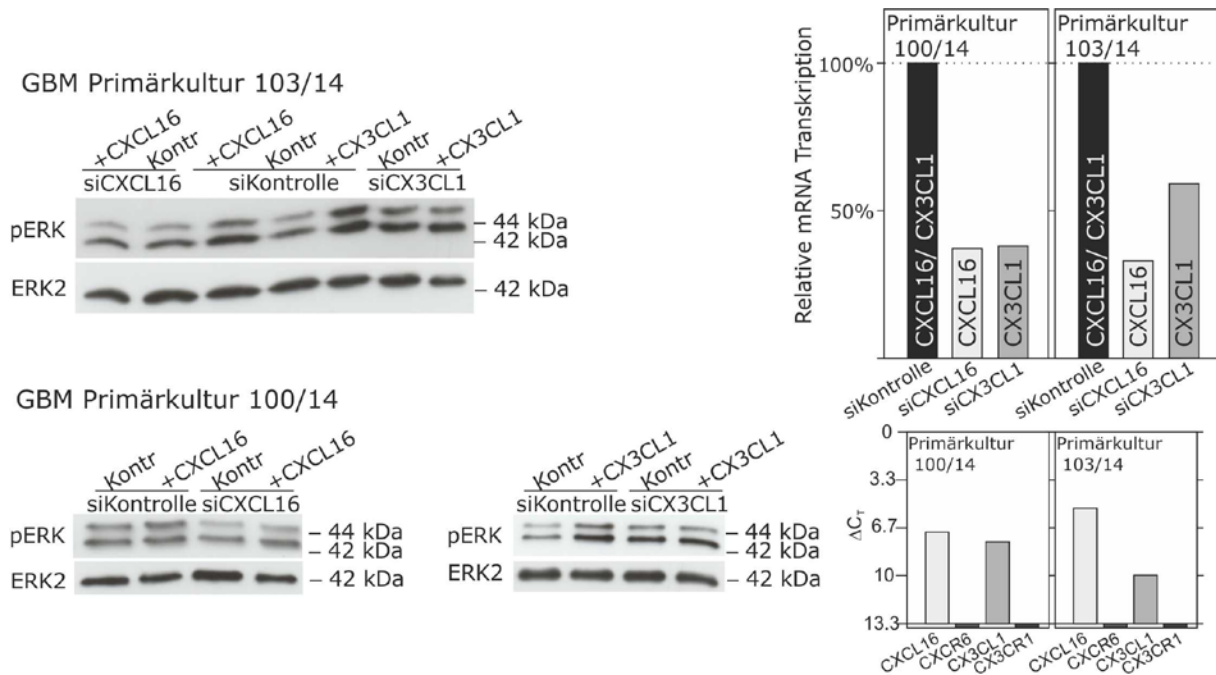


Abb. 3.28: Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 nach siRNA-Transfektion in primären, humanen Glioblastomzellen. Die Glioblastom-Primärkulturen wurden auf die Expression von CXCL16, CXCR6, CX3CL1 und CX3CR1 mittels TaqMan[®]-RT-PCR untersucht. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Nach Transfektion der Primärzellen mit siRNA gegen CXCL16 bzw. CX3CL1 sowie einer Kontroll-siRNA wurde der Transfektionserfolg ebenfalls mittels TaqMan[®]-RT-PCR nachgewiesen. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet. Gezeigt ist die Reduktion in Bezug auf die Kontroll-siRNA-Transfektion. 36 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 1 nM rekombinanten CXCL16 bzw. CX3CL1 für 15 min stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Im Western Blot wurden die Zelllysate auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. Die Primärkulturen 100/14 und 103/14 exprimierten beide CXCL16 und CX3CL1, wiesen aber keine Expression der Rezeptoren CXCR6 und CX3CR1 auf. Durch die Transfektion mit spezifischer siRNA gegen CXCL16 und CX3CL1 wurde die Expression dieser Chemokine in den Primärkulturen deutlich verringert im Vergleich zu den Zellen, die mit der unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden. In den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen erzeugte die Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2. Diese Aktivierung blieb nach der Verwendung der spezifischen siRNA gegen das entsprechende Chemokin aus.

In Abbildung 3.28 ist gezeigt, dass beide Primärkulturen sowohl CXCL16 (100/14: $\Delta\text{Ct}=6,9$; 103/14: $\Delta\text{Ct}=5,3$) als auch CX3CL1 (100/14: $\Delta\text{Ct}=7,6$; 103/14: $\Delta\text{Ct}=9,9$), aber nicht die Rezeptoren CXCR6 und CX3CR1 exprimierten (Abb. 3.28 rechts unten). Durch Transfektion mit der spezifischen siRNA wurde die Expression von CXCL16 auf 37% (100/14) bzw. 33% (103/14) gesenkt im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde. Für CX3CL1 wurde so eine Reduktion auf 38% (100/14) bzw. 59% (103/14) erreicht (Abb. 3.28 rechts oben).

Durch Stimulation mit löslichem, rekombinanten CXCL16 bzw. CX3CL1 wurde in den Kontroll-transfizierten Primärkulturen 100/14 und 103/14 nach 15 min eine Aktivitätssteigerung der MAP-Kinasen ERK1/2 ausgelöst. Eine Transfektion mit spezifischer siRNA gegen CX3CL1 bzw. CXCL16 verhinderte diesen Effekt sowohl in der Primärkultur 100/14 als auch in der Primärkultur 103/14 (Abb. 3.28 links).

3.8 Stimulation von transfizierten LOX-Melanomzellen mit konditioniertem Medium

Um nachzuweisen, dass die beobachteten Effekte nicht durch die verwendeten rekombinanten Chemokine erzeugt wurden, wurden die Stimulationsexperimente mit nativem CX3CL1 und CXCL16 wiederholt. Hierzu wurde konditioniertes Medium von den stabil transfizierten LOX-Zellen verwendet. Dieses enthielt je nach verwendetem Zelltyp CXCL16, CX3CL1 oder keines von beiden.

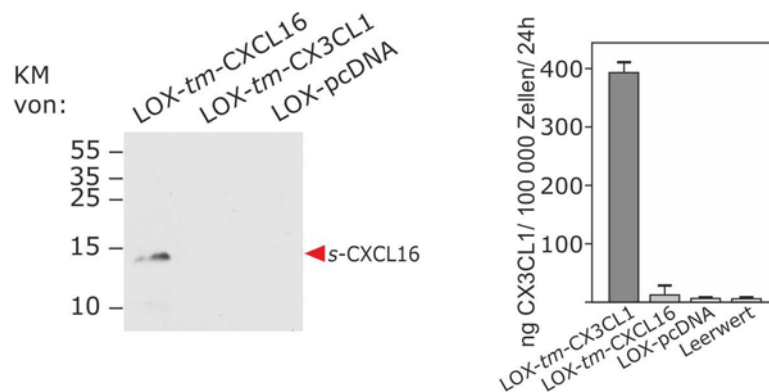


Abb. 3.29: Nachweis der löslichen Chemokine CX3CL1 und CXCL16 in konditionierten Medien von transfizierten LOX-Zellen. Die konditionierten Medien wurden durch Inkubation für 24 h (CX3CL1) bzw. 48 h (CXCL16) mit den entsprechend transfizierten LOX-Zellen erzeugt. Die konditionierten Medien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot gegen CXCL16 gemacht. Weiterhin wurden die konditionierten Medien in einem ELISA auf ihren CX3CL1-Gehalt untersucht. Lösliches CXCL16 wurde nur in dem Medium nachgewiesen, welches von den LOX-*tm*-CXCL16 stammte. Das Medium der LOX-*tm*-CX3CL1-Zellen enthielt s-CX3CL1, die Medien der anderen transfizierten LOX-Zellen waren CX3CL1-negativ.

Wurden die konditionierten Medien durch eine Gel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend ein Western Blot auf die Chemokindomäne des CXCL16 durchgeführt, konnte dieses nur in dem Medium detektiert werden, welches von den CXCL16-transfizierten LOX-Zellen (LOX-*tm*-CXCL16) stammte. Die Medien der *tm*-CX3CL1- und Kontrollvektor-transfizierten LOX-Zellen enthielten kein CXCL16 (Abb. 3.29 links). In einem antikörperbasierten Nachweisverfahren (*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA); Human CX3CL1/Fractalkine Quantikine ELISA Kit (R&D Systems)) wurde nur in den *tm*-CX3CL1-transfizierten Zellen (LOX-*tm*-CX3CL1) CX3CL1 (~395 ng/100000 Zellen/24 h) nachgewiesen (Abb. 3.29 rechts).

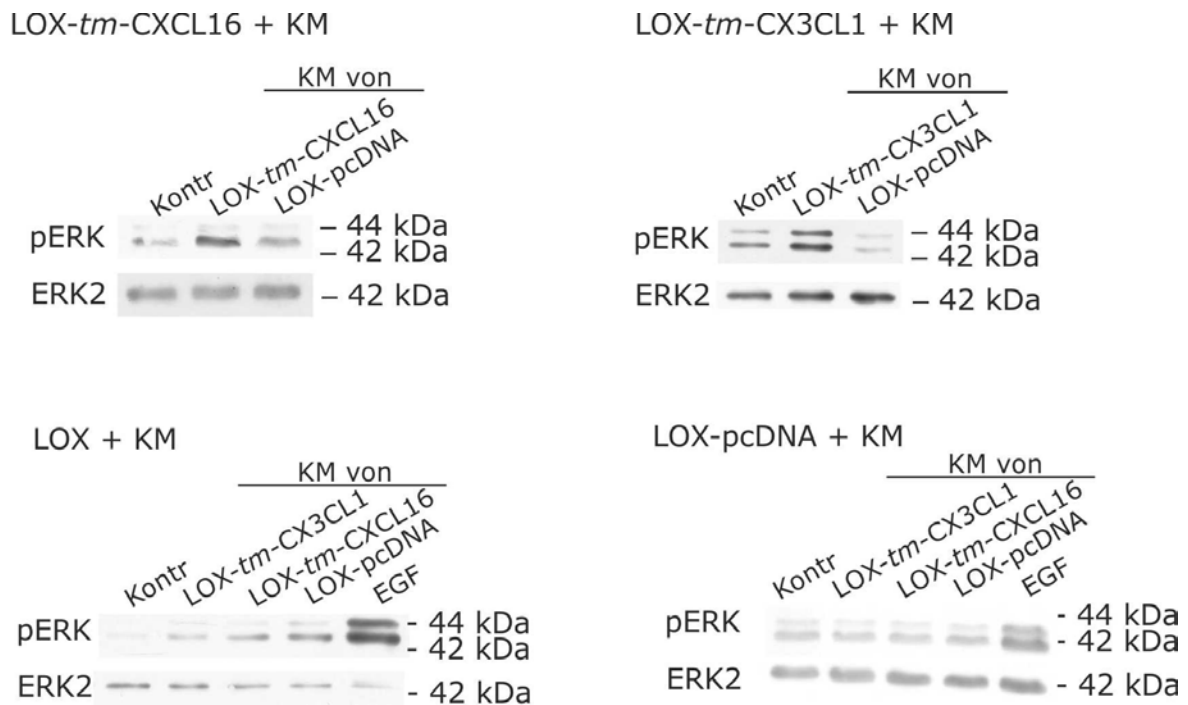


Abb. 3.30: Stimulation von humanen (transfizierten) LOX-Zellen mit konditionierten Medien. Die mit *tm*-CXCL16, *tm*-CX3CL1 oder dem Leervektor (pcDNA) transfizierten LOX-Zellen sowie untransfizierte LOX-Zellen, wurden für 20 min mit den verschiedenen konditionierten Medien stimuliert. Als Positivkontrolle wurde 10 min mit 2 nM EGF stimuliert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. In den mit *tm*-CXCL16- und *tm*-CX3CL1-transfizierten LOX-Zellen erzeugten die entsprechenden konditionierten Medien eine Aktivierung von ERK1/2. Konditioniertes Medium von den pcDNA-transfizierten LOX-Zellen führte nicht zu einer Aktivierung. Auf die pcDNA-Zellen und die untransfizierten LOX-Zellen hatte keines dieser konditionierten Medien einen stimulierenden Effekt (n=3).

LOX-Zellen, die mit *tm*-CXCL16 transfiziert waren, wurden mit den konditionierten Medien von LOX-*tm*-CXCL16 und LOX-pcDNA stimuliert. Eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 erzeugte aber nur die Stimulation mit LOX-CXCL16-konditioniertem Medium, für das Medium von LOX-pcDNA blieb der Phosphorylierungsgrad auf dem Ausgangsniveau (Abb. 3.30 oben links). Wurden *tm*-CX3CL1-transfizierte LOX-Zellen mit den entsprechenden Medien stimuliert, ergab sich ein äquivalentes Bild. Durch eine Stimulation mit dem konditionierten Medium von LOX-CX3CL1 wurde eine deutliche Aktivierung von ERK1/2 erreicht. Durch das Medium von LOX-pcDNA konnte dieser Effekt nicht erzeugt werden (Abb. 3.30 rechts oben). Untransfizierte LOX-Zellen und Kontrollvektor-transfizierte LOX-Zellen konnten durch die Zugabe von konditionierten Medien (LOX-*tm*-CXCL16, LOX-*tm*-CX3CL1 und LOX-pcDNA) nicht stimuliert werden. Das Phosphorylierungsniveau von ERK1/2 entsprach der unstimulierten Kontrolle. EGF diente als Positivkontrolle der Stimulierbarkeit (Abb. 3,30 unten).

Diese Experimente zeigen, dass nicht nur die kommerziellen löslichen, rekombinanten Peptide eine Signaltransduktion auslösen, sondern auch *in vitro* zellulär erzeugte Peptide, deren lösliche Komponente durch *Shedding* erzeugt wurde.

3.9 Stimulation von transfizierten LOX-Melanomzellen mit spezifischen Antikörpern gegen CX3CL1 und CXCL16

3.9.1 Stimulation von transfizierten LOX-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen die Chemokindomäne von CX3CL1 und CXCL16

Ein weiterer Beweis der Hypothese, dass die beobachteten Effekte durch die transmembranen Chemokine vermittelt wurden, wurde durch Antikörper-vermittelte Stimulation erbracht. Hierzu wurden transfizierte LOX-Melanomzellen mit spezifischen Antikörpern gegen die Chemokindomäne von CX3CL1 bzw. CXCL16 inkubiert. Als Negativkontrolle diente die IgG-Fraktion aus dem Serum der entsprechenden Spezies. EGF wurde als Positivkontrolle verwendet.



Abb. 3.31: Stimulation von transfizierten LOX-Zellen mit spezifischen Antikörpern. Die mit *tm*-CXCL16, *tm*-CX3CL1 oder dem Leervektor (pcDNA) transfizierten LOX-Zellen wurden für 20 min mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern gegen CX3CL1 und CXCL16 (0,1 µg/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle wurde mit der IgG-Fraktion der entsprechenden Spezies (Kontroll-IgG) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde 10 min mit 2 nM EGF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Im Western Blot wurden die Zelllysate auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der ERK2-Nachweis diente der Beladungskontrolle. In den mit *tm*-CXCL16- und *tm*-CX3CL1-transfizierten LOX-Zellen führten die spezifischen Antikörper zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK1/2. Die unspezifische Kontroll-IgG-Fraktion hatte keinen stimulatorischen Effekt. In den mit pcDNA-transfizierten LOX-Zellen wurde weder durch die spezifischen Antikörper gegen CXCL16 und CX3CL1 noch durch die Kontroll-IgG-Fraktion eine Aktivierung von ERK1/2 ausgelöst. Die Stimulation mit EGF zeigte, dass diese Zellen grundsätzlich stimulierbar waren (n=2).

Eine Stimulation mit einem Antikörper gegen die Chemokindomäne von CXCL16 bewirkte in den *tm*-CXCL16-transfizierten LOX-Zellen eine Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 verglichen mit der Stimulation durch die Kontroll-IgG-Fraktion (Abb. 3.31 links). Weiterhin wurde in den *tm*-CX3CL1-transfizierten LOX-Zellen durch die Stimulation mit einem CX3CL1-spezifischen Antikörper ein stimulierender Effekt nachgewiesen. Der Phosphorylierungsgrad von ERK1/2 war deutlich höher als nach der Inkubation mit der Kontroll-IgG-Fraktion (Abb. 3.31 Mitte). Wurden diese Stimulationen mit Kontroll-transfizierten LOX-Zellen durchgeführt, zeigten die spezifischen Antikörper keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2 im Vergleich zu den IgG-Fractionen der Seren. Die allgemeine Stimulierbarkeit der LOX-pcDNA-Zellen wurde mit EGF nachgewiesen (Abb. 3.31 rechts).

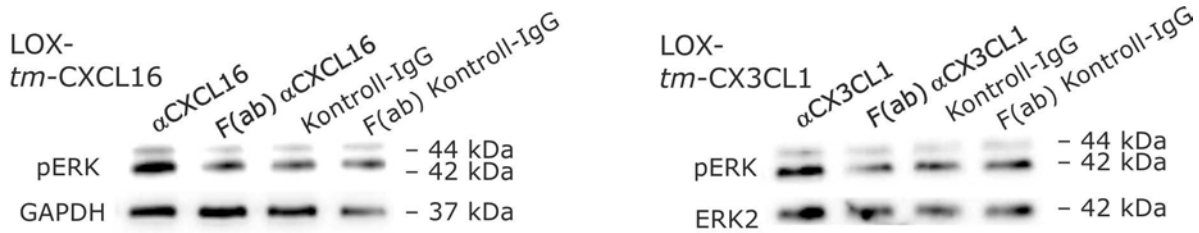


Abb. 3.32: Stimulation von transfizierten LOX-Zellen mit monovalenten F(ab)-Fragmenten. Die mit *tm*-CXCL16 und *tm*-CX3CL1 transfizierten LOX-Zellen wurden für 20 min mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern und monovalenten F(ab)-Fragmenten gegen CX3CL1 und CXCL16 (0,1 µg/ml) stimuliert. Als Negativkontrolle wurde mit der IgG-Fraktion der entsprechenden Spezies (Kontroll-IgG) und dem daraus resultierenden F(ab)-Fragment stimuliert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Zelllysate im Western Blot auf eine Phosphorylierung von ERK1/2 untersucht. Der Nachweis von ERK2 bzw. GAPDH diente der Beladungskontrolle. Die Stimulation mit dem spezifischen Antikörper gegen CXCL16 erzeugte in den LOX-*tm*-CXCL16-Zellen eine Aktivierung von ERK1/2. Bei der Stimulation mit dem monovalenten F(ab)-Fragment des CXCL16-Antikörpers blieb der stimulierende Effekt aus. Das Phosphorylierungsniveau entsprach dem der Kontroll-IgG-Stimulation. Der spezifische Antikörper gegen CX3CL1 führte in den mit *tm*-CX3CL1-transfizierten LOX-Zellen ebenfalls zu einer Aktivierung von ERK1/2. Das F(ab)-Fragment des CX3CL1-Antikörpers aktivierte ERK1/2 nicht. Ebenso erzeugte die Stimulation mit der Kontroll-IgG-Fraktion und dessen F(ab)-Fragment keine Aktivierung (n=3).

Wurde diese Stimulation mit monovalenten antigenbindenden Fragmenten (F(ab)-Fragmenten) durchgeführt, kam es nicht zu einem stimulierenden Effekt. Der Phosphorylierungsgrad nach der Stimulation mit den spezifischen F(ab)-Fragmenten der Antikörper entsprach dem der Stimulation mit der Kontroll-IgG-Fraktion (Abb. 3.32). Zusätzlich zum Western Blot wurden der stimulierende Effekt der spezifischen Antikörper und das Ausbleiben dieses Effekts bei Verwendung von monovalenten F(ab)-Fragmenten in einer Immunfluoreszenzfärbung auf die phosphorylierten MAP-Kinasen ERK1/2 verifiziert (Abb. 3.33).

Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass nicht die bloße Bindung (Fab) an die transmembranen Chemokine eine Signaltransduktion auslöst, sondern eine Multimerisierung an der Membran (divalenter Antikörper) nötig ist.

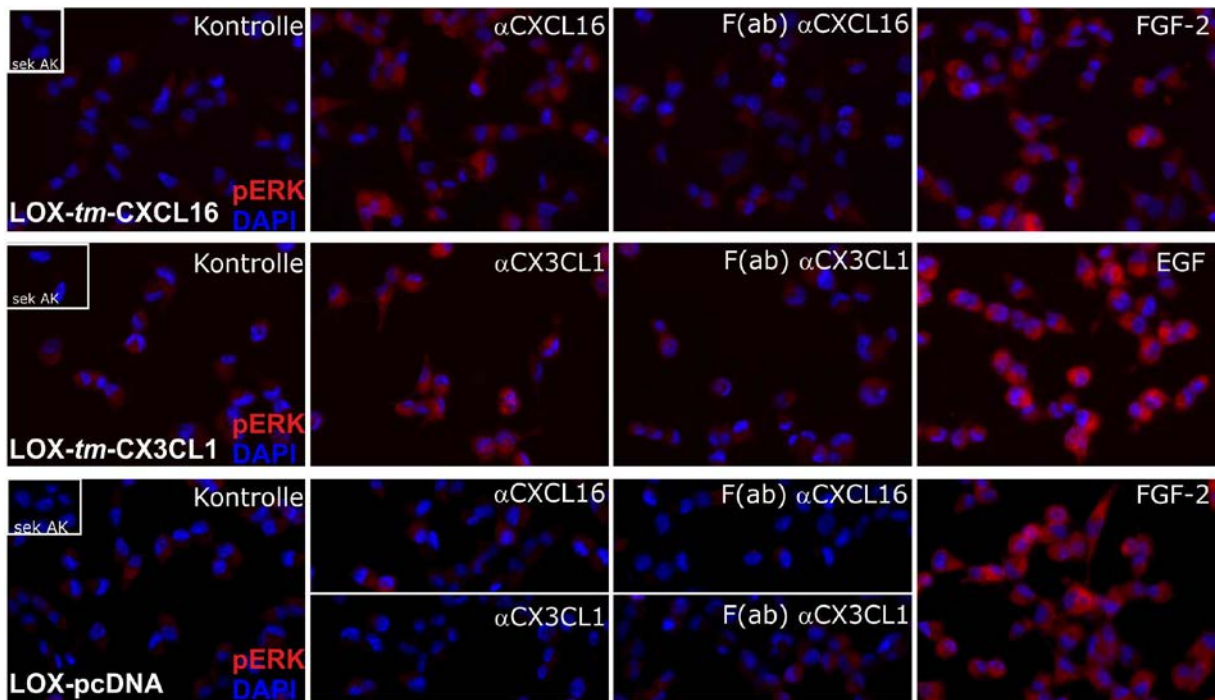


Abb. 3.33: Nachweis der Stimulation von transfizierten LOX-Zellen mit spezifischen Antikörpern und monovalenten F(ab)-Fragmenten mittels Immunfluoreszenzfärbung. Die mit *tm*-CXCL16, *tm*-CX3CL1 oder dem Leervektor (pcDNA) transfizierten LOX-Zellen wurden für 20 min mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern gegen CX3CL1 und CXCL16 (0,1 μ g/ml) bzw. den entsprechenden F(ab)-Fragmenten der Antikörper (0,1 μ g/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde 10 min mit 2 nM FGF-2 bzw. EGF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Aceton-Methanol fixiert und immunzytochemisch gegen die phosphorylierten Kinasen ERK1/2 gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor[®]555-anti-Kaninchen verwendet und die Kerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Anti-CXCL16 und Anti-CX3CL1 erzeugten in den entsprechend transfizierten LOX-Zellen eine Aktivierung von ERK1/2. In den pcDNA-transfizierten Zellen blieb der Phosphorylierungsgrad identisch zu der Kontrollprobe. Die F(ab)-Fragmente hatten in keiner der transfizierten LOX-Zellen einen stimulatorischen Effekt. Die Stimulation mit EGF bzw. FGF-2 führte zu einer deutlichen Aktivierung von ERK1/2.

4. Diskussion

Transmembrane Liganden können nicht nur durch Freisetzung ihrer Ligandendomäne Signale in rezeptortragende Zellen vermitteln, sondern auch selbst als Empfänger ein Signal in die Zelle weiterleiten. Bei der reversen Signaltransduktion handelt es sich um eine solche Variante der bidirektionalen Zell-Zell-Kommunikation, bei der nach Rezeptorbindung Signale über einen transmembranen Liganden in die Liganden-tragende Zelle vermittelt werden. Die reverse Signaltransduktion wurde zuerst für TNF α und später auch für weitere Mitglieder der TNF-Superfamilie beschrieben (Eissner et al. 2004). Mittlerweile ist sie auch für Ephrine und Semaphorine nachgewiesen (Toyofuku et al. 2004; Klein 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine neue Hypothese zur Signaltransduktion von transmembranen Liganden, genauer von transmembranen Chemokinen, untersucht werden. Hierbei sollte durch Bindung der löslichen Variante des Chemokins an die entsprechende transmembrane Form eine Signaltransduktion und daraus resultierende biologische Effekte in der Liganden-tragenden Zelle nachgewiesen werden. In Anlehnung an die reverse Signaltransduktion wurde diese Form der Zellkommunikation „inverse Signaltransduktion“ genannt.

4.1 Vorkommen der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 sowie der Chemokinrezeptoren CX3CR1 und CXCR6 in humanen Zellen

CXCL16 und CXCR6

Das transmembrane Chemokin CXCL16 wird in nicht-malignen Geweben von Makrophagen, Dendritischen Zellen, Endothelzellen sowie von Zellen der glatten Muskulatur exprimiert (Matloubian et al. 2000). Der einzig bekannte Rezeptor des CXCL16, CXCR6, wird von aktivierten T-Zellen und Plasmazellen des Knochenmarks exprimiert (Liao et al. 1997), weiterhin kommt CXCR6 auf glialen Vorläuferzellen vor (Hattermann et al. 2008). In malignen Geweben wurde CXCL16 auf Prostata- (Darash-Yahana et al. 2009), Pankreas- (Wente et al. 2008), Brust- (Matsumura et al. 2008) und Nierenzellen (Gutwein et al. 2009) nachgewiesen. Weiterhin wurde es in Gliomen (Ludwig et al. 2005b) und Schwannomen (Held-Feindt et al. 2008) gefunden. Über die Rolle, die CXCL16 in diesen Tumoren spielt, ist hingegen wenig bekannt. So wurden sowohl tumorfördernde als auch tumorinhibierende Wirkungen beschrieben (Hattermann et al. 2013). Eine mögliche Erklärung wäre die große Variation in der Verteilung von CXCR6 sogar innerhalb eines Tumors oder einer Tumorart. In Astrozytomen beispielsweise kommt CXCR6 nur auf einzelnen Subpopulationen von Tumorzellen vor (Hattermann et al. 2013). Weiterhin konnte CXCR6 in Prostatatumoren (Darash-Yahana et al. 2009) sowie auf Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (Oldham et al. 2012) nachgewiesen werden.

Übereinstimmend mit diesen Befunden wurde CXCL16 in der vorliegenden Arbeit in verschiedensten humanen Zelllinien nachgewiesen. Alle untersuchten Glioblastomzelllinien exprimierten deutlich CXCL16. Ebenso eine untersuchte Neuroblastomzelllinie (SH-SY5Y), eine Mammakarzinomzelllinie (MCF-7), die kolorektale Adenokarzinomzelllinie HT29 sowie die monozytäre Zelllinie THP-1. Weiterhin wurde CXCL16 in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) nachgewiesen. In Melanomen scheint CXCL16 keine Rolle zu spielen. So wurde weder die Expression in Tumorgewebe beschrieben, noch wies die untersuchte Melanomzelllinie LOX eine Expression von CXCL16 auf. Der Rezeptor CXCR6 hingegen wurde in den etablierten Zelllinien nicht nachgewiesen. Nur aktivierte T-Zellen wiesen eine Expression von CXCR6 auf. In Glioblastomgewebeproben wurde gezeigt, dass CXCR6 durch Kultivierung der Zellen verloren geht. Der solide Tumor exprimierte CXCR6, hingegen war nach Kultivierung des gleichen Tumormaterials als konventionelle Primärkultur (Zellkulturmedium mit 10% FCS) oder als Glioblastomspärenkultur (serumfreies Neurosphären-Medium, welches FGF-2 und EGF enthält) keine CXCR6-Expression mehr nachweisbar (Hattermann et al. 2013). Dieser Befund würde erklären, warum alle untersuchten Zelllinien keine CXCR6-Expression aufwiesen.

CX3CL1 und CX3CR1

Das transmembrane Chemokin CX3CL1 wird von vielen verschiedenen Zellen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Ursprungs exprimiert. So wurde die Expression unter anderem in Endothel- und Epithelzellen sowie in Lymphozyten, Neuronen, Mikroglia und Osteoblasten beschrieben (Corcione et al. 2012). Der Rezeptor CX3CR1 wird von verschiedenen Leukozyten sowie von Zellen der glatten Muskulatur exprimiert (Ferretti et al. 2014). Im zentralen Nervensystem wiesen Mikroglia und hippocampale Neurone eine Expression von CX3CR1 auf (Harrison et al. 1998; Erichsen et al. 2003). Weiterhin wurde in einer Vielzahl von Tumoren CX3CL1 gefunden, unter anderem in Gliomen, Neuroblastomen, Mamma-, Kolorektal- und Hepatozellulärkarzinomen sowie B-Zell- Lymphomen. In diesen Tumoren wurde zumeist auch der Rezeptor CX3CR1 nachgewiesen (Ferretti et al. 2014). Zudem spielt die CX3CL1/CX3CR1-Achse eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson (Bhaskar et al. 2010; Morganti et al. 2012).

Auch für CX3CL1 spiegeln sich die früheren Befunde in den Ergebnissen der vorliegenden Expressionsanalyse der humanen Zelllinie wieder. In den Glioblastomzelllinien war durchgehend eine hohe CX3CL1-Expression zu beobachten. Ebenso in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y und der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT29 sowie der monozytären Zelllinie THP-1 und in HUVEC-Zellen. In der Zelllinie eines kleinzelligen Lungenkarzinoms (OH3) fiel die Expression geringer aus, war aber auf RNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR immer noch deutlich detektierbar. Obwohl auch für den Rezeptor

CX3CR1 ein breites Vorkommen in verschiedenen Tumoren beschrieben wurde, konnte er nur in der monozytären Zelllinie THP-1 nachgewiesen werden. In Glioblastomen wurde zudem nachgewiesen, dass CX3CR1 ausschließlich in den Gliom-infiltrierenden Mikroglia/Makrophagen (GIMs) vorkommt (Held-Feindt et al. 2010).

4.2 Stimulation und biologische Effekte der Chemokine CX3CL1 und CXCL16 in humanen Zelllinien

Obwohl die untersuchten Glioblastomzelllinien die Rezeptoren CXCR6 und CX3CR1 nicht exprimierten, konnte durch Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 eine zeit- und dosisabhängige Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 erzeugt werden. Neben den gezeigten Glioblastomzelllinien war dies auch in der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie HT29, in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y (Daten nicht gezeigt) und in Glioblastom-Primärkulturen möglich. In der Melanomzelllinie LOX wurde keine Aktivierung beobachtet. Weiterhin wurden in den Glioblastomzelllinien biologische Effekte dieser Stimulationen nachgewiesen. So förderten sowohl CXCL16 als auch CX3CL1 die Proliferation und wirkten anti-apoptotisch. Die Gruppe um G. White zeigte, dass CX3CL1 eine anti-apoptotische sowie eine proliferationsfördernde Wirkung auf vaskuläre glatte Muskelzellen besitzt, obwohl an diesen Zellen kein klarer Nachweis des Rezeptors CX3CR1 gezeigt wurde (White et al. 2010). Die proliferationsfördernde Wirkung des CX3CL1 wurde weiterhin in epithelialen Ovarialtumoren (Gaudin et al. 2011) sowie in Prostatakrebs (Shulby et al. 2004) nachgewiesen. In letzterem zeigte sich zudem eine anti-apoptotische Wirkung. Ebenso wurde für CXCL16 eine proliferationsfördernde und anti-apoptotische Wirkung auf Prostatakrebszelllinien beobachtet (Darash-Yahana et al. 2009). Diese Befunde stimmen mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten überein.

Zusätzlich zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellen, konnten eine Aktivierung der Kinasen ERK1/2 und Akt sowie proliferationsfördernde und anti-apoptotische Effekte in primären Meningeomzellen (CXCR6-Expression negativ) nachgewiesen werden, nachdem diese mit CXCL16 stimuliert wurden (Hattermann et al. 2015b). Erste Befunde zeigten hier zudem eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NFκB) (unveröffentlichte Daten).

Schon dem Namen nach besitzen Chemokine eine chemotaktische Wirkung. So wurden für CX3CL1 unter anderem migratorische Effekte auf Endothelzellen (Volin et al. 2010), Dendritische Zellen (Johnson and Jackson 2014) und GIMs (Held-Feindt et al. 2010) beschrieben. Für CXCL16 wurden Einflüsse auf die Migration beispielsweise bei glialen Vorläuferzellen (Hattermann et al. 2008), T-Lymphozyten (Oldham et al. 2012), Schwannomen (Held-Feindt et al. 2008) und Prostatakrebszellen (Lu et al. 2008) gezeigt. Die Stimulation von rezeptornegativen Glioblastomzelllinien mit rekombinanten CXCL16 und

CX3CL1, die zwar einen anti-apoptischen sowie proliferationsfördernden Effekt erzeugte, beeinflusste allerdings nicht die Migration dieser Zellen. Die migrationsfördernden Einflüsse dieser Chemokine scheinen somit ausschließlich auf die Interaktion mit ihren klassischen Rezeptoren zurückzuführen sein (Imai et al. 1997; Matloubian et al. 2000).

4.3 Rezeptornachweis in den verwendeten Glioblastom- und Melanomzelllinien

CXCL16 und CX3CL1 binden jeweils nur an einen bekannten Chemokinrezeptor. Da die Glioblastomzelllinien weder CXCR6 noch CX3CR1 exprimierten, mussten die oben genannten Effekte über einen anderen Rezeptor vermittelt worden sein. Am naheliegendsten wäre ein anderer Chemokinrezeptor, da Chemokinrezeptoren in der Lage sind affinitätsspezifisch verschiedene Chemokine zu binden (Lazennec and Richmond 2010). Würde es sich um einen anderen typischen Chemokinrezeptor, also einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, handeln, wäre die beobachtete Stimulation der MAP-Kinasen ERK1/2 Pertussistoxin (PTX) sensitiv (Mangmool and Kurose 2011). Allerdings zeigte eine Inhibition mit PTX keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2. Als Positivkontrolle wurde die Stimulation mit der monozytären Zelllinie THP-1, die den Rezeptor CX3CR1 exprimierten, durchgeführt. Hier konnte die Aktivierung der Kinase Akt nach Stimulation mit CX3CL1 durch PTX unterbunden werden. Die Kinase Akt wurde aufgrund der besseren Aktivierbarkeit in der THP-1-Zelllinie im Vergleich zu den Kinasen ERK1/2 untersucht. Ein weiteres Indiz dafür, dass es sich nicht um den bekannten Rezeptor CX3CR1 handelt, wurde durch die Stimulation mit der veränderten CX3CL1-Variante F1 erbracht. Diese mutierte Variante besitzt einen modifizierten N-Terminus und ist dadurch nicht in der Lage Effekte über den Rezeptor CX3CR1 zu vermitteln, obwohl es an diesen binden kann (Dorgham et al. 2009). Auf die Glioblastomprimärkultur 76/12 besaß es allerdings eine aktivierende Wirkung.

Neben den typischen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren gibt es eine Reihe von *Decoy*-Rezeptoren, die eine Vielzahl verschiedener Chemokine mit hoher Affinität binden, allerdings keine Signaltransduktion in die Zelle vermitteln (Lazennec and Richmond 2010). Sie dienen möglicherweise der Regulation der Chemokinkonzentration in ihrer Umgebung oder haben eine bisher noch unbekannte Wirkung (Graham et al. 2012). Da aber das Expressionsprofil der *Decoy*-Rezeptoren *Duffy antigen receptor for chemokines* (DARC), D6 und CCX-CKR sowohl für die responsiven Glioblastomzelllinien als auch für die nicht-responsiven LOX-Zellen identisch ist, können diese ebenfalls als mögliche Rezeptoren ausgeschlossen werden. Ein weiterer Kandidat als Rezeptor wäre das vom humanen Cytomegalovirus codierte Chemokinrezeptor-ähnliche Molekül US28. Hierbei handelt es sich um einen funktionalen Chemokin-bindenden Rezeptor (Vomaske et al. 2009). Allerdings wurde dieser von keiner der Zelllinien exprimiert. Auch CD44, ein multifunktionaler Rezeptor, der unter anderem in der Zell-Zell-Interaktion involviert ist (Naor et al. 1997), kam für die

Signalvermittlung nicht in Frage, da er sowohl von den Glioblastomzelllinien als auch von der Melanomzelllinie LOX exprimiert wurde, die aber keine Effekte durch Stimulation mit CXCL16 und CX3CL1 aufwies. Der einzige Unterschied im untersuchten Expressionsprofil ergab sich beim atypischen Chemokinrezeptor CXCR7, der zwar von den Glioblastomzelllinien nicht aber von den LOX-Zellen exprimiert wurde. Weiterhin wurde für CXCR7 eine G-Protein-unabhängige Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 beschrieben (Kumar et al. 2012), was wiederum die Ergebnisse der PTX-Stimulation erklären würde. Sollte es sich bei CXCR7 um den gesuchten Rezeptor handeln, wäre die Aktivierung von ERK1/2 durch einen spezifischen CXCR7-Antagonisten inhibierbar. Dies war aber weder für die Stimulation mit CXCL16 noch mit CX3CL1 der Fall. Die grundsätzliche Spezifität des Inhibitors CCX733 konnte hier im Labor gezeigt werden (Hattermann et al. 2010).

4.4 Die Hypothese der inversen Signaltransduktion – „Proof of Principle“

Wie eingangs erwähnt, handelt es sich bei der reversen Signaltransduktion um eine Form der bidirektionalen Zell-Zell-Kommunikation, die für Mitglieder der TNF-Superfamilie, für Semaphorine und Ephrine beschrieben wurde (Eissner et al. 2004; Toyofuku et al. 2004; Klein 2009). Die biologischen Effekte der reversen Signaltransduktion im Fall der TNF-Superfamilie umfassen neben direkter Stimulation auch costimulatorische Einflüsse sowie Desensibilisierung und Migration, wodurch sich eine Möglichkeit der Feinabstimmung der adaptiven Immunität und eine regulatorische Rückkopplung der angeborenen Immunität ergibt (Eissner et al. 2004; Sun and Fink 2007). Die reverse Signaltransduktion der Semaphorine spielt vor allem im Nervensystem eine Rolle bei der Zielführung von Zellen und deren Abstoßung (Yu et al. 2010). Bei den Ephrinen steuert die reverse Signaltransduktion die Zelladhäsion und Differenzierung, insbesondere bei der Bildung von Synapsen, aber auch bei der Modellierung von Knochen (Klein 2009; Matsuo and Otaki 2012).

Sowohl für CX3CL1 als auch für CXCL16 existieren Berichte zu Effekten, die durch Stimulation mit den Chemokinen entstanden, obwohl die Beteiligung des jeweiligen Rezeptors ausgeschlossen werden konnte. So wurde für CXCL16 ein Einfluss auf die Proliferation, Chemotaxis und Röhrenbildung von HUVEC-Zellen beschrieben (Zhuge et al. 2005), wobei HUVEC-Zellen kein CXCR6 exprimieren (vgl. 3.1.1). In murinen Mikrogliazellen, die sowohl CX3CR1 als auch CX3CL1 exprimieren (Nishiyori et al. 1998), konnte durch CX3CL1-Stimulation die Anzahl an phagozytierenden Zellen signifikant reduziert werden. Hingegen hatte in Mäusen, denen der Ligand CX3CL1 fehlte (Cx3cl1^{-/-}-Mäuse), die aber weiterhin den Rezeptor CX3CR1 exprimierten, die Stimulation mit CX3CL1 keinen Einfluss auf das Phagozytoseverhalten der Mikrogliazellen. Die Zahl an phagozytierenden Zellen blieb unverändert (Cipriani et al. 2011). Somit scheint die

Phagozytoseaktivität, die durch die CX3CL1 Stimulation vermittelt wird, direkt abhängig von der Expression des transmembranen CX3CL1 und nicht von der des Rezeptors zu sein. Zudem konnten Hoover et al. zeigen, dass die lösliche Chemokindomäne von CX3CL1 über eine intermolekulare β -Faltblattstruktur dimerisiert, wodurch eine kompakte Quartärstruktur entsteht (Hoover et al. 2000). Vergleichbar mit der inversen Signaltransduktion ist die Signalvermittlung der Cadherine. Diese transmembranen Glykoproteine bilden ausschließlich Homodimere, sie binden somit nur an Moleküle des gleichen Subtyps (Radice et al. 1997). Der Unterschied zur inversen Signaltransduktion ist, dass beide Moleküle membranständig sind. Die Bindung von Cadherinen ist Calcium-abhängig und ist von großer Bedeutung bei der Zell-Zell-Adhäsion (Shapiro and Weis 2009). Zudem sind Cadherine in der Lage eine Signaltransduktion nach Bindung eines weiteren Cadherins zu vermitteln (Braga 2002; Yap and Kovacs 2003). Beispielsweise rekrutieren und aktivieren E-Cadherine die Phosphoinositid-3-Kinase (Kovacs et al. 2002), die über GTP-Austauschfaktoren verschiedene GTPasen, wie Rho, Rac und CDC42, aktiviert (Du et al. 2014). Dies verhindert die Endozytose von E-Cadherin, die erfolgen würde, wenn die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Verbindung getrennt wird (Izumi et al. 2004). Außerdem dienen E-Cadherine als negative Regulatoren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, da sie β -Catenin über ihre intrazelluläre Domäne sequestrieren (Du et al. 2014).

Zusammengenommen mit den Erkenntnissen über die reverse Signaltransduktion und den Berichten über rezeptorunabhängige Effekte entwickelten wir die Hypothese der inversen Signaltransduktion, bei der die Signalübertragung ebenfalls durch einen transmembranen Liganden vermittelt wird, allerdings nach Bindung seiner löslichen Variante (Abb. 4.1).

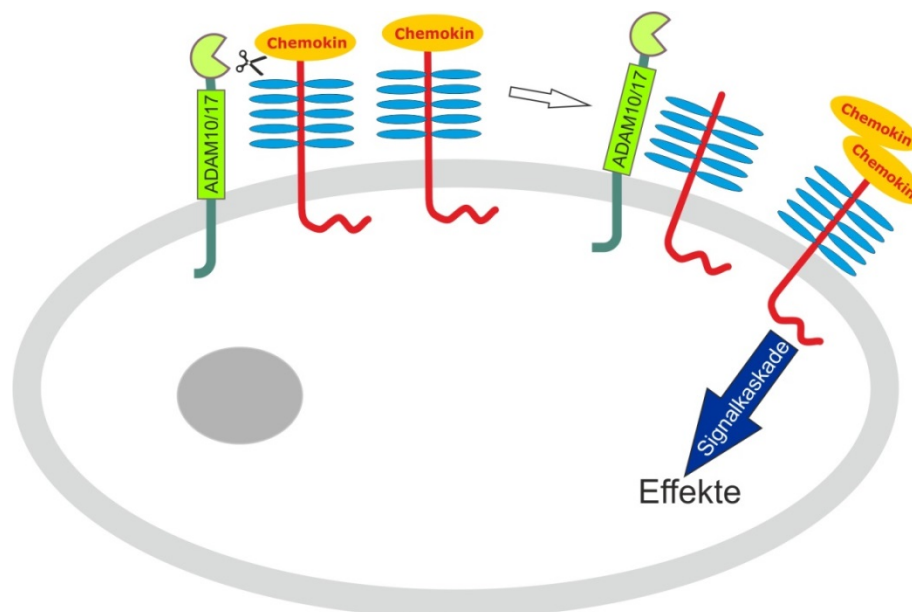


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der inversen Signaltransduktionshypothese. Nachdem die Chemokindomäne des transmembranen Chemokins durch eine Protease (ADAM10 oder ADAM17) abgespalten wurde, bindet das nun lösliche Chemokin an ein weiteres transmembranen Chemokin und löst dadurch eine Signalkaskade aus, die wiederum zu Effekten in der Zelle führt. Gezeigt ist hier das Beispiel einer autokrinen Signalübertragung.

Bindungsnachweis

Die Chemokine CXCL16 und CX3CL1 werden als Typ-I-Membranproteine exprimiert und können durch Freisetzung der Chemokindomäne in eine lösliche Form überführt werden. Die Chemokindomäne des CXCL16 enthält das für CXC-Chemokine typische Disulfidbrückenmuster, wobei eine Aminosäure zwischen den ersten zwei N-terminalen Cysteinresten liegt (Matloubian et al. 2000). In der Chemokindomäne von CX3CL1 liegen drei Aminosäuren zwischen diesen Cysteinresten (Bazan et al. 1997). Die Tertiärstruktur aller Chemokine ist trotz der unterschiedlichen Cysteinmuster gleich, Unterschiede entstehen nur in der Quartärstruktur (Fernandez and Lolis 2002).

Um die Hypothese der inversen Signaltransduktion zu beweisen, ist die grundlegende Bedingung, dass die lösliche Variante von CXCL16 und CX3CL1 an die entsprechende transmembrane Form bindet. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen methodischen Ansätzen gezeigt. Zum einen wurde die Bindung durch eine native Markierung mit fluoreszenzgekoppelten löslichen Chemokinen gezeigt. Weiterhin wurde ein Bindungsnachweis durch fluoreszenzmarkierte Chemokine in einer FACS-Analyse erbracht. Beide Ansätze wurden mit stabil transfizierten LOX-Zellen durchgeführt, wobei mit dem Leervektor transfizierte LOX-Zellen als Negativkontrolle dienten, um die Änderungen im Bindungsverhalten zweifelsfrei auf die transmembranen Chemokine zurückführen zu können. Zusätzlich wurde die Bindung über Immunogold-Elektronenmikroskopie nachgewiesen. Hierbei wurden neben den stabil transfizierten LOX-*tm*-CXCL16 Zellen auch die Glioblastomzelllinie A764 verwendet. Weiterhin wurde durch eine chemische Quervernetzung mittels Paraformaldehyd eine Bindung der löslichen Variante des Chemokins an die entsprechende transmembrane Form gezeigt. Zudem war es auf diese Weise möglich die Dimerisierung/Multimerisierung der Chemokine zu beobachten. Wurde die Quervernetzung nur mit löslichen Chemokinen, allerdings ohne Membranisolate, durchgeführt, ergab sich ein leiterartiges Bild nach der Gelelektrophorese (Daten nicht gezeigt). Unsere Arbeitsgruppe in Kooperation mit S. Krossa (Strukturbiologie/Zoologie, Universität Kiel) zeigte zudem mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie, dass die löslichen Varianten von CXCL16 und CX3CL1 an Membranisolaten von entsprechend transfizierten LOX-Zellen mit hoher Affinität banden (Hattermann et al. 2015a). Weiterhin wurde die Bindung von löslichem CXCL16 an CXCR6-negative Meningeomzellen beschrieben (Hattermann et al. 2015b).

Transfektion

Neben der Bindung der löslichen Chemokine an die entsprechende transmembrane Form, sollte durch Transfektionsexperimente gezeigt werden, dass die Expression eines transmembranen Chemokins entscheiden für die Signalvermittlung nach Stimulation mit dem

jeweiligen Chemokin ist. Hierzu wurden die zuvor nicht-responsiven LOX-Zellen mit CXCL16 oder CX3CL1 transfiziert, wodurch sie ein responsives Verhalten bezogen auf die Chemokinstimulation entwickelten. Die stabil transfizierten Zellen zeigten eine deutliche ERK1/2-Aktivierung nach Stimulation mit CXCL16 bzw. CX3CL1. Weiterhin wurden in diesen Zellen anti-apoptotische Effekte durch die Chemokine bewirkt. Die untransfizierten oder mit dem Leervektor transfizierten LOX-Zellen zeigten diese Effekte nicht, was wiederum die biologische Bedeutung dieser Signaltransduktion hervorhebt. Liu und Kollegen zeigten, dass in einem Gliommodell in *Cx3cr1^{-/-}*-Mäusen sowohl die Größe des Tumors als auch die Anzahl an Tumor-infiltrierenden Mikroglia und Lymphozyten unverändert ist im Vergleich zu *Cx3cr1^{+/-}*-Mäusen (Liu et al. 2008). Da auch ohne die Expression des Rezeptors die Tumorprogression sowie die Regulation der Immunzellen erhalten bleiben, könnte die inverse Signaltransduktion des CX3CL1 bei der Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle spielen.

Im Gegenzug zu den LOX-Zellen, die durch die Transfektion responsiv wurden, wurden die T98G-Glioblastomzellen durch Transfektion mit siRNA gegen die transmembranen Chemokine in nicht-responsive Zellen überführt. Gleiches konnte auch in Primärkulturen gezeigt werden. Diese Zellen zeigten nach der Transfektion mit siRNA keine Aktivierung von ERK1/2 auf Grund der Stimulation mit CXCL16 bzw. CX3CL1 mehr. Auch dies zeigt die essenzielle Bedeutung der Expression eines transmembranen Liganden für die inverse Signaltransduktion. Weiterführend konnten für CXCL16 die siRNA-Experimente in primären Meningeomzellen wiederholt werden (Hattermann et al. 2015b).

Intrazelluläre Domäne

Zusätzlich zu den in dieser Arbeit bewiesenen Annahmen, dass die lösliche Form von CX3CL1 und CXCL16 an die transmembrane Variante bindet und die Expression des transmembranen Chemokins essenziell für die Aktivierung der Zelle durch inverse Signaltransduktion ist, folgte der Beweis, dass die intrazelluläre Domäne der Chemokine die Signale nach Stimulation in die Zelle vermittelt.

Es ist bekannt, dass die intrazelluläre Domäne eine Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endozytose von CX3CL1 spielt (Huang et al. 2009). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass die intrazelluläre Domäne beider transmembraner Chemokine essenziell für die Signaltransduktion ist. Durch zielgerichtete Mutation wurde der Vektor so verändert, dass die Translation des Proteins nach der Transmembrandomäne auf Grund von zwei aufeinander folgenden Stopcodons abbrach. Daraus resultierte, dass LOX-Zellen, die mit der trunkierten Variante des Chemokins transfiziert wurden, nicht mehr responsiv auf eine Stimulation mit dem entsprechenden löslichen Chemokin reagierten. Bei der reversen Signaltransduktion der TNF Superfamilie erfolgt die Signalvermittlung über ein S/TXXS/T-

Motiv (Phosphorylierungsmotiv der Caseinkinase I) (Watts et al. 1999) sowie eine Prolin-reiche Region (FasL) (Eissner et al. 2004), durch die Adapterproteine gebunden und somit die Signale weitergegeben werden. Bei der reversen Signaltransduktion von Ephrinen und Semaphorinen vermitteln ebenfalls Prolin-reiche Regionen sowie PDZ-bindende Motive die Signale (Zhou et al. 2008; Klein 2009). Die exakte Identifikation von Kinasen und Adapterproteinen für die transmembranen Chemokine steht noch aus. Möglich wäre eine Signalvermittlung über ein SXXS-Motiv oder über eine SH2-Bindungsstelle (phosphorylierte Tyrosinreste (Liu et al. 2012)). Beide Motive wurden für das transmembrane CXCL16 in Primaten und wenigen Säugetieren nachgewiesen (Tab. 4.1, Hattermann et al. 2015a). Mutationsexperimente innerhalb der intrazellulären Domäne zeigten, dass durch Austausch der Serinreste zu Alaninresten im SXXS-Motiv die Signalweiterleitung nach Stimulation mit löslichem CXCL16 unterbrochen wurde. Wurde hingegen der Tyrosinrest der SH2-Bindestelle durch Phenylalanin ersetzt, hatte dies keinen Einfluss auf die Signaltransduktion. Somit scheint das Caseinkinase I-Motiv essenziell für die Signalvermittlung zu sein. In der intrazellulären Domäne von CX3CL1 liegen beide Motive hochkonserviert bei Monotremata über Beuteltiere bis hin zu den Säugetieren vor (Tab. 4.1, Hattermann et al. 2015a). Das exakte Sequenzmotiv ist hier aber noch nicht abschließend untersucht.

Für die reverse Signaltransduktion des TNF α wurde damit begonnen die Mechanismen der Signalkaskade genauer zu untersuchen. So wurde gezeigt, dass Serinreste in der intrazellulären Domäne durch die Caseinkinase I phosphoryliert werden (Watts et al. 1999) und es nach Interaktion mit dem löslichen Rezeptor zur Dephosphorylierung dieser Aminosäuren kommt (Pocsik et al. 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass im N-Terminus eine nukleare Lokalisationssequenz vorliegt, wodurch TNF α im Zellkern akkumulieren und dort die Transkription von Zytokinen regulieren kann (Domonkos et al. 2001). Auch die Beteiligung des MAP-Kinase-Wegs (über die Kinasen ERK1/2) und der Proteinkinase C wurden in der Literatur beschrieben (Kirchner et al. 2004). Zudem wurde die Interaktion von *Casein kinase 2-interacting protein-1* (CKIP-1) mit der intrazellulären Domäne von TNF α nachgewiesen (Juhasz et al. 2013). Die Vergleiche der bisherigen Befunde der Moleküle in Bezug auf die Signalübertragung, legen den Schluss nahe, dass es zwischen der reversen und inversen Signaltransduktion Analogien gibt.

Tab. 4.1: Aminosäuresequenzen der intrazellulären Domänen der transmembranen Chemokine in verschiedenen Spezies. Hervorgehoben sind die SH2-Bindungsdomäne (**YXPR/V**) und das Phosphorylierungsmotiv der Caseinkinase I (**SXXS/T**). Quelle: Hattermann et al. 2015

CX3CL1	
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	-QSLQGCPRK MAGEMA EGLR YIPRSCGS NSYVLVPV
<i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe)	-QSLQGCPRK MAGEM VEGLR YIPRSCGS NSYVLVPV
<i>Bos taurus</i> (Rind)	-QRLQSCPHKMVG DVVEGIC YVPRSCGS NSYVLVPV
<i>Canis familiaris</i> (Hund)	-YQSLQGCSR KMAGDMVEGLR YVPRSCGS N
<i>Mus musculus</i> (Maus)	-QSLQGCPRK MAGEM VEGLR YVPRSCGS NSY
<i>Sarcophilus harrisii</i> (Tasmanische Teufel)	-QSLQSCPRRMAGE VEGLR YIPRSCGS NSYVLVPV
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (Schnabeltier)	-QSLQSCPRRMAGE VEGLR YIPRSCGS NSYVLVPV
CXCL16	
<i>Homo sapiens</i> (Mensch)	-CKRRRG QSPQSS PDPVH YIPVAPDS NT
<i>Gorilla gorilla gorilla</i> (Flachlandgorilla)	-CKRRRG QSPQSS PGLPVH YIPVAPDS NT
<i>Macaca mulatta</i> (Rhesusaffe)	-CKRRG QSPQSS PDLQLH YIPVASDS NT
<i>Bos taurus</i> (Rind)	-CKRRKNQLLQHPPDLAASLYTCSRRT RAENGL T
<i>Mus musculus</i> (Maus)	-CNRRATQQNSAGLQLW YTPVEPR P
<i>Myotis lucifugus</i> (Mausohrenfledermaus)	-CKRRSKQSPQYSPDLQLQCIPVASYSNS
<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (Schnabeltier)	-CRRRGAPRNEMLYPQRPKGTSITVQANSPT

Konditioniertes Medium

Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Effekten um Verunreinigungen in den verwendeten rekombinanten Chemokinprodukten handelt, wurden die Stimulationsversuche mit konditioniertem Medium, das durch die Inkubation mit stabil transfizierten LOX-Zellen gewonnen wurde, wiederholt. So entstanden Medien, die sich nur in dem Gehalt von gelösten Chemokinen unterschieden. Alle anderen von den Zellen sezernierten Stoffe waren identisch. Da nur die Medien, die lösliches Chemokin enthielten, einen aktivierenden Effekt aufwiesen, können produktionsbedingte Einflüsse (Proteinfragmente, Verunreinigungen, Zusätze o.ä.) der rekombinanten Proteine auf den Beweis der inversen Signaltransduktion ausgeschlossen werden. Zudem wurde mit diesem Versuch eine physiologische Machbarkeit nachgewiesen, obwohl die CX3CL1-Konzentration des konditionierten Mediums mit ~700 ng/ml deutlich über der Serum-Konzentration von gesunden Menschen lag (~0,4 ng/ml) (Matsunawa et al. 2006; Njerve et al. 2012). Die Serumkonzentration für CXCL16 liegt mit ~1,3 ng/ml nur geringfügig oberhalb der CX3CL1-Konzentration (Sun et al. 2008; Wente et al. 2008). Allerdings bindet sowohl CX3CL1 als auch CXCL16 an Proteoglykane (Hoover et al. 2000; de Paz et al. 2007). Durch die Bindung von Chemokinen an Komponenten der Extrazellulären Matrix kann lokal eine deutlich höhere Konzentration als im Serum erreicht werden, die wiederum zur Zellaktivierung führt. Hierdurch wird verhindert, dass durch hohe Serumkonzentrationen systemisch die Homöostase des Immunsystems gestört wird (Proudfoot 2006). Dieser Unterschied zwischen der lokalen und systemischen Konzentration erklärt die physiologische Umsetzbarkeit.

Stöchiometrie

Die reverse Signaltransduktion wurde am TNF α durch Stimulation mit einem spezifischen TNF α -Antikörper entdeckt (Ferran et al. 1994). Dies legt nahe, dass bei der inversen Signaltransduktion ebenfalls durch spezifische Antikörper eine Signalvermittlung ausgelöst werden kann. Wurden die transfizierten LOX-Zellen mit einem Antikörper gegen das entsprechende Chemokin inkubiert, kam es zu einer Phosphorylierungssteigerung von ERK1/2. Die Inkubation mit einer IgG-Serumkontrolle sowie die Inkubation der pcDNA-transfizierten Kontrollzellen führten nicht zu einer Aktivierung. Auch die stimulierenden Effekte von spezifischen Antikörpern wurden für CXCL16 in primären Meningeomzellen bestätigt (Hattermann et al. 2015b). Zudem gaben Versuche mit monovalenten F(ab)-Fragmenten dieser Antikörper Aufschluss über das stöchiometrische Verhältnis der Bindung des löslichen Chemokins an die transmembrane Variante. Da diese monovalenten Fragmente im Gegensatz zu den intakten Antikörpern nicht mehr in der Lage waren einen stimulatorischen Effekt auszulösen, scheint die Bindung durch eine Di-/Oligomerisierung zu entstehen. Gestützt wird diese These durch die Befunde der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie. Diese ergab ein zweistufiges Bindungsmuster. Im ersten Schritt binden A:B und im zweiten Schritt (A:B):B, wobei letzteres die Dimerisierung mit einem weiteren *tm*-Chemokin oder einem zusätzlichen Interaktionspartner bedeuten könnte (Hattermann et al. 2015a). Für CXCL16 sind in der Literatur bisher keine Untersuchungen bezüglich einer Dimerisierung beschrieben. Wie aber bereits erwähnt, wurde für die lösliche Variante von CX3CL1 eine Dimerisierung durch eine Röntgenkristallstrukturanalyse nachgewiesen (Hoover et al. 2000). Zudem wurde mittels Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) und *homogeneous time-resolved fluorescence* (HTRF) eine räumliche Ansammlung und Cluster-Bildung des transmembranen CX3CL1 beschrieben (Hermand et al. 2008; Ostuni et al. 2014). Sowohl BRET als auch HTRF beruhen auf einer strahlungsfreien Energieübertragung, der das Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers zu Grunde liegt.

Regulation und Tumorprogression

Die sorgfältige Regulation von Signaltransduktionsprozessen ist essenziell für die physiologische Funktion von Organismen. Fehlregulationen dieser Prozesse können zu schwerwiegenden Erkrankungen wie Krebs, Autoimmunerkrankungen oder Typ 2 Diabetes führen. Beispielsweise ist in ca. 15% der Mammatumoren der EGF-Rezeptor Her2 mutiert, wodurch es zu einem aggressiveren Phänotyp und einer schlechteren Prognose kommt (Ross et al. 2009). Die Expression von CX3CL1 und CXCL16 wird durch die Entzündungsmediatoren IFN γ und TNF α reguliert (Imaizumi et al. 2000; Wuttge et al. 2004). In Bezug darauf wurde gezeigt, dass durch chronische Entzündungen die Expression von

CX3CL1 in Astrozyten hochreguliert ist (Hughes et al. 2002), wodurch eine Tumorprogression begünstigt wird. Durch die Hypothese der inverse Signaltransduktion ergibt sich eine positive, autokrine Rückkopplung, die auf die proliferationsfördernden und anti-apoptischen Effekte zurückzuführen ist. Diese tumorbegünstigenden Eigenschaften wurden durch die Apoptoseversuche mit transfizierten LOX-Zellen untermauert. Diese wiesen, im Gegensatz zu untransfizierten LOX-Zellen, eine signifikant verringerte Apoptoserate nach Camptothecinbehandlung auf. Zudem sind positive, autokrine Rückkopplungseffekte für einige Wachstumsfaktoren (bspw. *epidermal growth factor* (EGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF)) in verschiedensten Tumoren bekannt (Sauer et al. 2010; Yu et al. 2015).

Weiterhin spielen CXCL16 und insbesondere CX3CL1 eine wichtige Rolle beim Schutz der Neurone im zentralen Nervensystem (ZNS) (Mizuno et al. 2003; Rosito et al. 2014). Da die Rezeptoren CXCR6 und CX3CR1 aber nur verhältnismäßig gering im ZNS exprimiert werden, könnte die inverse Signaltransduktion auch neuroprotektiv von großer Bedeutung sein, zumal im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Stimulation mit CX3CL1 und CXCL16 zur Reduktion der Apoptoserate führte.

Neben der Regulation auf transkriptionaler Ebene, kann diese zusätzlich durch die Aktivität von Proteasen erfolgen. ADAM17 wurde als TNF α -konvertierendes Enzym (*TNF α -converting enzyme*; TACE) entdeckt, welches die transmembrane Form des Liganden in eine lösliche prozessiert (Black et al. 1997; Moss et al. 1997). Später wurden weitere ADAM-Proteasen identifiziert, die außerdem Rezeptoren, Adhäsionsmoleküle und intrazelluläre Signalmoleküle schneiden (Pruessmeyer and Ludwig 2009). Indem ADAMs die transmembranen Liganden von der Zellmembran abtrennen, beenden sie die reverse Signaltransduktion der Liganden der TNF-Superfamilie (Sun and Fink 2007). Weiterhin konnte für den EphA-Rezeptor gezeigt werden, dass ADAM10 konstitutiv mit diesem assoziiert ist und durch Bindung des Liganden Ephrin-A an den Rezeptor aktiviert wird. Somit befinden sich Protease und Ligand auf gegenüberliegenden Zellen, das *Shedding* erfolgt also in *trans*, und es wird dadurch sichergestellt, dass nur Rezeptor-gebundenes Ephrin-A erkannt wird (Janes et al. 2005). Transmembrane Chemokine werden durch die transmembranen Metalloproteasen ADAM10 (konstitutiv) und ADAM17 (Zytokin-induziert) von der Zelloberfläche abgeschnitten und so in die lösliche Variante überführt (Abel et al. 2004; Ludwig et al. 2005b). Zudem erfolgt eine weitere Degradation der verkürzten transmembranen Chemokine durch Gamma-Sekretasen (Schulte et al. 2007), sodass die intrazelluläre Domäne nicht mehr für eine Signalvermittlung zur Verfügung steht. Dies zeigten auch die Versuche zur Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie. Hierbei banden die löslichen Chemokine nur an frisch isolierte Membranen. An älteren Proben, in denen die proteolytische Zersetzung eingesetzt hatte, konnte keine Bindung nachgewiesen werden. Allgemein kann eine ähnliche

regulatorische und terminierende Funktion der ADAMs wie bei der reversen Signaltransduktion ebenso für die inverse Signaltransduktion angenommen werden. Insbesondere, da die Aktivität der ADAMs durch verschiedene physiologische und pathophysiologische Mediatoren oder durch Therapeutika reguliert wird (Reiss and Saftig 2009). So ergibt sich für die inverse Signaltransduktion eine unterschiedliche Regulation in Gesundheit und Krankheit.

Ausblick

Die inverse Signaltransduktion steht noch am Anfang ihrer Untersuchung. Grundlegende Beweise wie die Bindung des löslichen Chemokins an die entsprechende transmembrane Variante oder die Notwendigkeit der intrazellulären Domäne für die Signalvermittlung wurden in dieser Arbeit erbracht. Hieraus ergeben sich viele interessante Aspekte für zukünftige Untersuchungen. So sollte genauer untersucht werden, welches Phosphorylierungsmotiv in der intrazellulären Domäne von CX3CL1 für die Signalweitergabe verantwortlich ist. Auch die intrazellulären Aktionspartner beider Chemokine sollten weiter untersucht werden, um die Entstehung der Effekte in der Zelle zu verstehen. Derzeit ist nur die Beteiligung der MAP-Kinasen ERK1/2 zweifelsfrei nachgewiesen. Weiterhin sollte auch die Regulation der inversen Signaltransduktion durch ADAMs und andere Moleküle genauer betrachtet werden, da hierzu derzeit nur theoretische Erklärungen existieren. Ein weiterer wichtiger Nachweis wäre die Identifikation des Di-/Oligomerisierungspartners, dessen Existenz durch die F(ab)-Fragmente der spezifischen Antikörper sowie in der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (Hattermann et al. 2015a) bewiesen wurde. Hierbei kämen der transmembrane Ligand selbst, aber auch andere Adapterproteine in Frage. Weiterhin liegt es nahe die reverse Signaltransduktion durch die transmembranen Chemokinen nachzuweisen. Hierzu gibt es in der Arbeitsgruppe Mentlein erste vielversprechende Befunde (unveröffentlichte Daten). Umgekehrt wäre die Untersuchung der inversen Signaltransduktion an anderen transmembranen Liganden von großem Interesse. Insbesondere Liganden, für die eine reverse Signaltransduktion beschrieben ist, sollten hierbei in Betracht gezogen werden, da sie über Sequenzmotive in der intrazellulären Domäne verfügen, die eine Signaltransduktion vermitteln können. So ergibt sich beispielsweise aus der bidirektionalen Kommunikation über Fas und Fas Liganden (FasL) eine Balance zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Suzuki and Fink 2000). Die inverse Signaltransduktion über FasL würde hierbei eine weitere Feinabstimmung ermöglichen. Grundsätzlich würde dies nachweisen, dass es sich bei der inversen Signaltransduktion nicht nur um eine Randerscheinung der transmembranen Chemokine handelt, die ihrerseits unter den Chemokinen eine Ausnahme bilden, sondern um ein allgemeingültiges Prinzip. In

Abbildung 4.2 sind die Befunde zur inversen Signaltransduktion zusammengefasst sowie die noch zu untersuchenden Punkte für die inverse und reverse Signaltransduktion dargestellt.

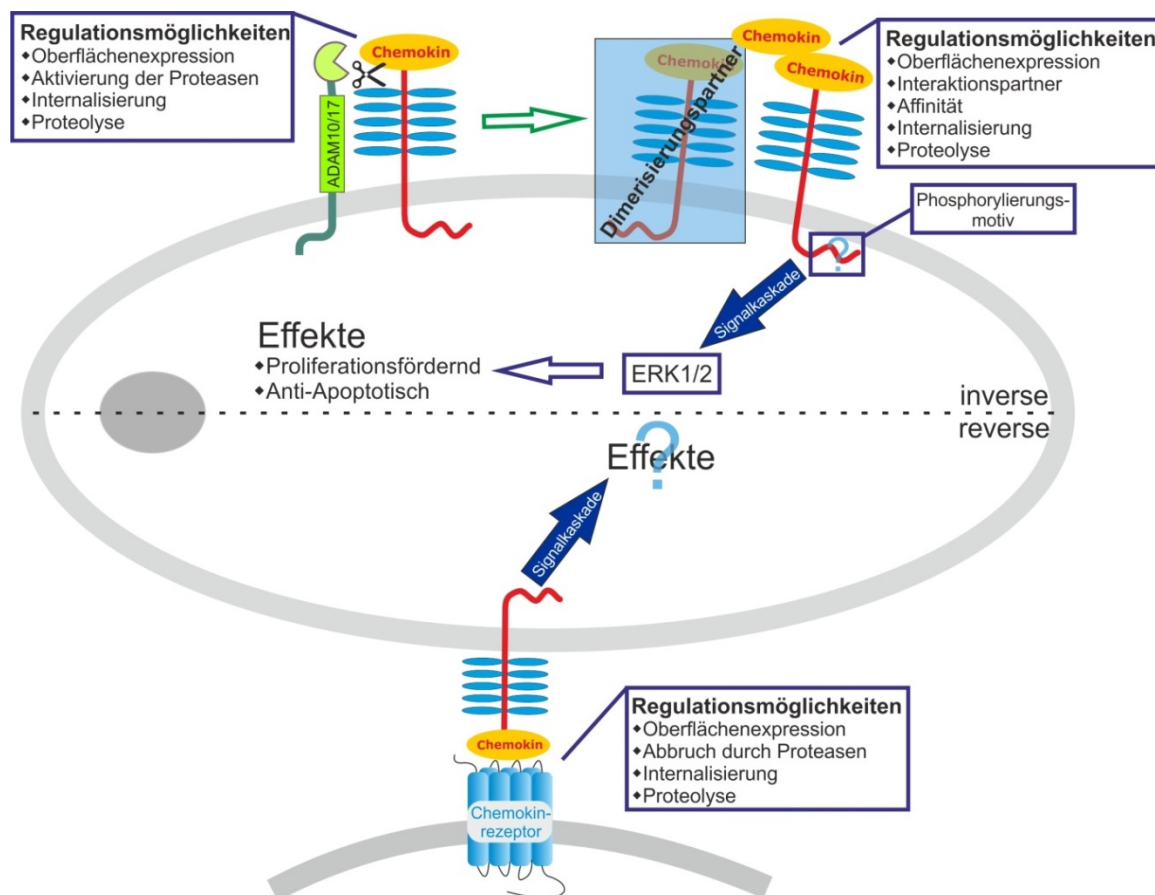


Abb. 4.2: Schematische Zusammenfassung der inversen und reversen Signaltransduktion. Darstellung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur inversen Signaltransduktion unter Berücksichtigung der noch offenen Punkte sowie der reversen Signaltransduktion. Das transmembrane Chemokin wird durch eine Protease in die lösliche Form überführt und bindet an ein weiteres transmembranes Chemokin sowie einen noch nicht genauer definierten Interaktionspartner. Über ein noch unbekanntes Phosphorylierungsmotiv in der intrazellulären Domäne wird eine Signalkaskade ausgelöst, die über die MAP-Kinasen ERK1/2 zu proliferationsfördernden und anti-apoptischen Effekten führt. Die reverse Signaltransduktion wird über eine Signalkaskade ebenfalls zu Effekten führen, die aber noch nicht abschließend untersucht wurden. Die Regulation des *Sheddings* der inversen sowie der reversen Signaltransduktion muss ebenfalls noch genauer untersucht werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass es sich bei der inversen Signaltransduktion um eine neue Variante der Zellkommunikation handelt, die eine Möglichkeit zur Feinregulation des Immun- und Nervensystems bietet, die aber auch als positiver Rückkopplungsmechanismus von Tumorzellen verwendet werden kann.

5. Zusammenfassung

Die Transduktion von Signalen ist essenziell für die Kommunikation zwischen Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Hypothese einer ligandenvermittelten Signaltransduktion bei transmembranen (*tm*) Chemokinen bewiesen werden. Über die sogenannte inversen Signaltransduktion soll durch Bindung des löslichen (*s*) Chemokins an die entsprechende transmembrane Form ein Signal in die Zelle vermittelt werden.

Expressionsanalysen zeigten, dass die Rezeptoren der zwei *tm*-Chemokine CXCR6 und CX3CR1 nur auf aktivierten T-Zellen (CXCR6) bzw. der monozytären Zelllinie THP-1 (CX3CR1) vorkamen. Die Liganden CXCL16 und CX3CL1 wurden hingegen von vielen verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert. Nur die Melanomzelllinie LOX wies keine Expression der *tm*-Chemokine auf. Wurden verschiedene rezeptornegative Glioblastomzelllinien mit löslichem rekombinanten CXCL16 bzw. CX3CL1 stimuliert, kam es zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2. Gleiches konnte auch in primären Glioblastomkulturen gezeigt werden, deren Expressionsprofil den Glioblastomzelllinien entsprach. In den sowohl liganden- als auch rezeptornegativen LOX-Zellen wurde keine Aktivierung nachgewiesen. In den Glioblastomzelllinien konnten weiterhin Einflüsse auf die Apoptose und die Proliferation durch die Stimulation mit *s*-CXCL16 und *s*-CX3CL1 beobachtet werden. Einflüsse auf die Migration hatte diese Stimulation nicht. Inhibitionsversuche (Pertussistoxin, CCX733) und Expressionsanalysen verschiedener Chemokin- und *Decoy*-Rezeptoren widerlegten, dass andere Rezeptoren für die Effekte verantwortlich waren. Um die Hypothese der inversen Signaltransduktion zu beweisen, wurde die Bindung des löslichen Chemokins an die entsprechende transmembrane Form durch verschiedene methodische Ansätze nachgewiesen. Zudem wurden die *tm*-Chemokine in die nicht-responsiven LOX-Zellen transfiziert, wodurch diese sowohl eine ERK1/2-Aktivierung als auch eine Resistenz gegen Apoptose zeigten. In den zuvor responsiven T98G-Glioblastomzellen konnte mittels siRNA die Aktivierung von ERK1/2 unterbunden werden. Weiterhin wurde durch Mutationsanalysen gezeigt, dass die intrazelluläre Domäne essentiell für die Signalvermittlung ist. Für CXCL16 wurde das Caseinkinase I-Motiv (SXXS) als notwendiges Sequenzmotiv identifiziert. Die Aktivierung von ERK1/2 konnte zudem durch konditioniertes Medium der transfizierten LOX-Zellen erreicht werden. Auch eine Stimulation mit spezifischen Antikörpern löste die Phosphorylierung der MAP-Kinasen aus. Monovalente F(ab)-Fragmente dieser Antikörper zeigten hingegen keine Wirkung. Dies deutet daraufhin, dass es stöchiometrisch zu einer Dimerisierung der *tm*-Chemokine kommen muss.

Zusammen genommen zeigen diese Befunde, dass die inverse Signaltransduktion bei *tm*-Chemokinen in Tumoren existiert und einen weiteren Feinregulationsmechanismus für das Immun- und Nervensystem darstellen kann.

6. Summary

The transduction of signals is essential for the communication of cells. This work should proof the hypothesis of a ligand-mediated signal transduction for transmembrane (*tm*) chemokines. In the so called inverse signaling a signal should be transferred in the cell by binding of a soluble (s) chemokine to its transmembrane counterpart.

The expression analysis of CXCR6 and CX3CR1, the receptors of the two *tm*-chemokines, showed that these receptors were only expressed on activated T-cells (CXCR6) or the monocytic cell line THP-1 (CX3CR1). In contrast, the ligands CXCL16 and CX3CL1 were expressed on many different tumor cell lines, however the melanoma cell line LOX lacked any expression of the *tm*-chemokines. When different receptor-negative glioma cell lines were stimulated with soluble recombinant CXCL16 or CX3CL1 the MAP-kinases ERK1/2 were activated. The stimulation of primary glioma cells, which also expressed the ligands but not the receptors, resulted in the same outcome. Only the receptor- and ligand-negative LOX cells showed no activation. Furthermore the stimulation with soluble CXCL16 and CX3CL1 influenced the apoptosis and proliferation but not the migration of the glioma cell lines. An inhibition assay (Pertussis toxin, CCX733) and an expression analysis for different chemokine and decoy receptors discounted the involvement of another receptor in this signal transduction. To proof the hypothesis of the inverse signaling, the binding of the soluble chemokine to its transmembrane counterpart was shown with different methodic approaches. In addition the *tm*-chemokines were transfected into the non-responsive LOX cells by what this cells showed an ERK1/2 activation after stimulation and became resistant against apoptosis. In the T98G cell line the activation of ERK1/2 was prevented after transfection with siRNA. Mutational analysis revealed that the intracellular domain was essential for the signal transduction. For CXCL16 the casein kinase I motive (SXXS) was identified to be required for mediating the signal. Furthermore, conditioned medium from the transfected LOX cells could activate ERK1/2. In addition, the stimulation with specific antibodies triggered the phosphorylation of the MAP kinases, whereas monovalent F(ab)-fragments were inefficacious. This portend a dimerization of the *tm*-chemokines is needed for the signal transduction.

Summarized these results suggested that the inverse signaling exists for transmembrane chemokines in tumors and that it might be a further fine tuning mechanism for the immune and nervous system.

7. Literaturverzeichnis

- Abel S., Hundhausen C., Mentlein R., Schulte A., Berkhout T. A., Broadway N., Hartmann D., Sedlacek R., Dietrich S., Muetze B., Schuster B., Kallen K. J., Saftig P., Rose-John S. and Ludwig A.** (2004). "The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10." *Journal of immunology* **172**(10): 6362-6372.
- Addison C. L., Belperio J. A., Burdick M. D. and Strieter R. M.** (2004). "Overexpression of the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) by NSCLC tumor cells results in increased tumor necrosis." *BMC cancer* **4**: 28.
- Adler M. W. and Rogers T. J.** (2005). "Are chemokines the third major system in the brain?" *Journal of leukocyte biology* **78**(6): 1204-1209.
- Ambrosini E. and Aloisi F.** (2004). "Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system." *Neurochemical research* **29**(5): 1017-1038.
- Andre F., Cabioglu N., Assi H., Sabourin J. C., Delaloge S., Sahin A., Broglio K., Spano J. P., Combadiere C., Bucana C., Soria J. C. and Cristofanilli M.** (2006). "Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **17**(6): 945-951.
- Ariztia E. V., Lee C. J., Gogoi R. and Fishman D. A.** (2006). "The tumor microenvironment: key to early detection." *Critical reviews in clinical laboratory sciences* **43**(5-6): 393-425.
- Badie B. and Schartner J. M.** (2000). "Flow cytometric characterization of tumor-associated macrophages in experimental gliomas." *Neurosurgery* **46**(4): 957-961; discussion 961-952.
- Balkwill F. and Mantovani A.** (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* **357**(9255): 539-545.
- Baluk P., Hashizume H. and McDonald D. M.** (2005). "Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer." *Current opinion in genetics & development* **15**(1): 102-111.
- Baram D., Vaday G. G., Salamon P., Drucker I., Hershkoviz R. and Mekori Y. A.** (2001). "Human mast cells release metalloproteinase-9 on contact with activated T cells: juxtacrine regulation by TNF-alpha." *Journal of immunology* **167**(7): 4008-4016.
- Bazan J. F., Bacon K. B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D. R., Zlotnik A. and Schall T. J.** (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." *Nature* **385**(6617): 640-644.
- Ben-Baruch A.** (2006). "The multifaceted roles of chemokines in malignancy." *Cancer metastasis reviews* **25**(3): 357-371.
- Benafif S. and Hall M.** (2015). "An update on PARP inhibitors for the treatment of cancer." *OncoTargets and therapy* **8**: 519-528.
- Bhaskar K., Konerth M., Kokiko-Cochran O. N., Cardona A., Ransohoff R. M. and Lamb B. T.** (2010). "Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor." *Neuron* **68**(1): 19-31.
- Black R. A., Rauch C. T., Kozlosky C. J., Peschon J. J., Slack J. L., Wolfson M. F., Castner B. J., Stocking K. L., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley K. A., Gerhart M., Davis R., Fitzner J. N., Johnson R. S., Paxton R. J., March C. J. and Cerretti D. P.** (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." *Nature* **385**(6618): 729-733.
- Boehme S. A., Lio F. M., Maciejewski-Lenoir D., Bacon K. B. and Conlon P. J.** (2000). "The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia." *Journal of immunology* **165**(1): 397-403.
- Braga V. M.** (2002). "Cell-cell adhesion and signalling." *Current opinion in cell biology* **14**(5): 546-556.
- Brauns S. C., Dealtry G., Milne P., Naude R. and Van de Venter M.** (2005). "Caspase-3 activation and induction of PARP cleavage by cyclic dipeptide cyclo(Phe-Pro) in HT-29 cells." *Anticancer research* **25**(6B): 4197-4202.
- Bremer E.** (2013). "Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy." *ISRN oncology* **2013**: 371854.
- Camacho D. F. and Pienta K. J.** (2012). "Disrupting the networks of cancer." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**(10): 2801-2808.
- Cardona A. E., Pioro E. P., Sasse M. E., Kostenko V., Cardona S. M., Dijkstra I. M., Huang D., Kidd G., Dombrowski S., Dutta R., Lee J. C., Cook D. N., Jung S., Lira S. A., Littman D. R. and Ransohoff R. M.** (2006). "Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor." *Nature neuroscience* **9**(7): 917-924.
- Catalano V., Turdo A., Di Franco S., Dieli F., Todaro M. and Stassi G.** (2013). "Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay." *Seminars in cancer biology* **23**(6 Pt B): 522-532.

- Chandrasekar B., Mummidi S., Perla R. P., Bysani S., Dulin N. O., Liu F. and Melby P. C.** (2003). "Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway." *The Biochemical journal* **373**(Pt 2): 547-558.
- Chandrasekar B., Bysani S. and Mummidi S.** (2004). "CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation." *The Journal of biological chemistry* **279**(5): 3188-3196.
- Chapman G. A., Moores K., Harrison D., Campbell C. A., Stewart B. R. and Strijbos P. J.** (2000). "Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**(15): RC87.
- Chatterjee S., Behnam Azad B. and Nimmagadda S.** (2014). "The intricate role of CXCR4 in cancer." *Advances in cancer research* **124**: 31-82.
- Chen S., Luo D., Streit W. J. and Harrison J. K.** (2002). "TGF-beta1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia." *Journal of neuroimmunology* **133**(1-2): 46-55.
- Cho S. H., Sun B., Zhou Y., Kauppinen T. M., Halabisky B., Wes P., Ransohoff R. M. and Gan L.** (2011). "CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease." *The Journal of biological chemistry* **286**(37): 32713-32722.
- Cipriani R., Villa P., Chece G., Lauro C., Paladini A., Micotti E., Perego C., De Simoni M. G., Fredholm B. B., Eusebi F. and Limatola C.** (2011). "CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**(45): 16327-16335.
- Clark A. K., Yip P. K., Grist J., Gentry C., Staniland A. A., Marchand F., Dehvari M., Wotherspoon G., Winter J., Ullah J., Bevan S. and Malcangio M.** (2007). "Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(25): 10655-10660.
- Cockwell P., Chakravorty S. J., Girdlestone J. and Savage C. O.** (2002). "Fractalkine expression in human renal inflammation." *The Journal of pathology* **196**(1): 85-90.
- Cook D. N., Chen S. C., Sullivan L. M., Manfra D. J., Wiekowski M. T., Prosser D. M., Vassileva G. and Lira S. A.** (2001). "Generation and analysis of mice lacking the chemokine fractalkine." *Molecular and cellular biology* **21**(9): 3159-3165.
- Corcione A., Ferretti E., Bertolotto M., Fais F., Raffaghello L., Gregorio A., Tenca C., Ottonello L., Gambini C., Furtado G., Lira S. and Pistoia V.** (2009). "CX3CR1 is expressed by human B lymphocytes and mediates [corrected] CX3CL1 driven chemotaxis of tonsil centrocytes." *PLoS one* **4**(12): e8485.
- Corcione A., Ferretti E. and Pistoia V.** (2012). "CX3CL1/fractalkine is a novel regulator of normal and malignant human B cell function." *Journal of leukocyte biology* **92**(1): 51-58.
- 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. and Farber J. M.** (2009). "The chemokine CXCL16 and its receptor, CXCR6, as markers and promoters of inflammation-associated cancers." *PLoS one* **4**(8): e6695.
- de Paz J. L., Moseman E. A., Noti C., Polito L., von Andrian U. H. and Seeberger P. H.** (2007). "Profiling heparin-chemokine interactions using synthetic tools." *ACS chemical biology* **2**(11): 735-744.
- Debnath B., Xu S., Grande F., Garofalo A. and Neamati N.** (2013). "Small molecule inhibitors of CXCR4." *Theranostics* **3**(1): 47-75.
- Deng H. K., Unutmaz D., KewalRamani V. N. and Littman D. R.** (1997). "Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses." *Nature* **388**(6639): 296-300.
- Deng L., Chen N., Li Y., Zheng H. and Lei Q.** (2010). "CXCR6/CXCL16 functions as a regulator in metastasis and progression of cancer." *Biochimica et biophysica acta* **1806**(1): 42-49.
- Dhillon A. S., Hagan S., Rath O. and Kolch W.** (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." *Oncogene* **26**(22): 3279-3290.
- Diegelmann J., Seiderer J., Niess J. H., Haller D., Goke B., Reinecker H. C. and Brand S.** (2010). "Expression and regulation of the chemokine CXCL16 in Crohn's disease and models of intestinal inflammation." *Inflammatory bowel diseases* **16**(11): 1871-1881.
- Domonkos A., Udvardy A., Laszlo L., Nagy T. and Duda E.** (2001). "Receptor-like properties of the 26 kDa transmembrane form of TNF." *European cytokine network* **12**(3): 411-419.

- Dorgham K., Ghadiri A., Hermand P., Rodero M., Poupel L., Iga M., Hartley O., Gorochov G., Combadiere C. and Deterre P. (2009). "An engineered CX3CR1 antagonist endowed with anti-inflammatory activity." *Journal of leukocyte biology* **86**(4): 903-911.
- Du W., Liu X., Fan G., Zhao X., Sun Y., Wang T., Zhao R., Wang G., Zhao C., Zhu Y., Ye F., Jin X., Zhang F., Zhong Z. and Li X. (2014). "From cell membrane to the nucleus: an emerging role of E-cadherin in gene transcriptional regulation." *Journal of cellular and molecular medicine* **18**(9): 1712-1719.
- Durkan A. M., Alexander R. T., Liu G. Y., Rui M., Femia G. and Robinson L. A. (2007). "Expression and targeting of CX3CL1 (fractalkine) in renal tubular epithelial cells." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **18**(1): 74-83.
- Dvorak H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." *The New England journal of medicine* **315**(26): 1650-1659.
- Efsen E., Grappone C., DeFranco R. M., Milani S., Romanelli R. G., Bonacchi A., Caligiuri A., Failli P., Annunziato F., Pagliai G., Pinzani M., Laffi G., Gentilini P. and Marra F. (2002). "Up-regulated expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 during liver injury in humans." *Journal of hepatology* **37**(1): 39-47.
- Eissner G., Kirchner S., Lindner H., Kolch W., Janosch P., Grell M., Scheurich P., Andreessen R. and Holler E. (2000). "Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages." *Journal of immunology* **164**(12): 6193-6198.
- Eissner G., Kolch W. and Scheurich P. (2004). "Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system." *Cytokine & growth factor reviews* **15**(5): 353-366.
- Erichsen D., Lopez A. L., Peng H., Niemann D., Williams C., Bauer M., Morgello S., Cotter R. L., Ryan L. A., Ghorpade A., Gendelman H. E. and Zheng J. (2003). "Neuronal injury regulates fractalkine: relevance for HIV-1 associated dementia." *Journal of neuroimmunology* **138**(1-2): 144-155.
- Fernandez E. J. and Lolis E. (2002). "Structure, function, and inhibition of chemokines." *Annual review of pharmacology and toxicology* **42**: 469-499.
- Ferran C., Dautry F., Merite S., Sheehan K., Schreiber R., Grau G., Bach J. F. and Chatenoud L. (1994). "Anti-tumor necrosis factor modulates anti-CD3-triggered T cell cytokine gene expression in vivo." *The Journal of clinical investigation* **93**(5): 2189-2196.
- Ferretti E., Pistoia V. and Corcione A. (2014). "Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases with emphasis on B cell malignancies." *Mediators of inflammation* **2014**: 480941.
- Fong A. M., Robinson L. A., Steeber D. A., Tedder T. F., Yoshie O., Imai T. and Patel D. D. (1998). "Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow." *The Journal of experimental medicine* **188**(8): 1413-1419.
- Fonovic U. P., Jevnikar Z. and Kos J. (2013). "Cathepsin S generates soluble CX3CL1 (fractalkine) in vascular smooth muscle cells." *Biological chemistry* **394**(10): 1349-1352.
- Foussat A., Coulomb-L'Hermine A., Gosling J., Krzysiek R., Durand-Gasselini I., Schall T., Balian A., Richard Y., Galanaud P. and Emilie D. (2000). "Fractalkine receptor expression by T lymphocyte subpopulations and in vivo production of fractalkine in human." *European journal of immunology* **30**(1): 87-97.
- Foussat A., Bouchet-Delbos L., Berrebi D., Durand-Gasselini I., Coulomb-L'Hermine A., Krzysiek R., Galanaud P., Levy Y. and Emilie D. (2001). "Deregulation of the expression of the fractalkine/fractalkine receptor complex in HIV-1-infected patients." *Blood* **98**(6): 1678-1686.
- Furuichi K., Wada T., Iwata Y., Sakai N., Yoshimoto K., Shimizu M., Kobayashi K., Takasawa K., Kida H., Takeda S., Matsushima K. and Yokoyama H. (2001). "Upregulation of fractalkine in human crescentic glomerulonephritis." *Nephron* **87**(4): 314-320.
- Garton K. J., Gough P. J., Blobel C. P., Murphy G., Greaves D. R., Dempsey P. J. and Raines E. W. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)." *The Journal of biological chemistry* **276**(41): 37993-38001.
- Gaudin F., Nasreddine S., Donnadiou A. C., Emilie D., Combadiere C., Prevot S., Machelon V. and Balabanian K. (2011). "Identification of the chemokine CX3CL1 as a new regulator of malignant cell proliferation in epithelial ovarian cancer." *PloS one* **6**(7): e21546.
- Geissmann F., Cameron T. O., Sidobre S., Manlongat N., Kronenberg M., Briskin M. J., Dustin M. L. and Littman D. R. (2005). "Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids." *PLoS biology* **3**(4): e113.
- Gerard C. and Rollins B. J. (2001). "Chemokines and disease." *Nature immunology* **2**(2): 108-115.

- Gough P. J., Garton K. J., Wille P. T., Rychlewski M., Dempsey P. J. and Raines E. W.** (2004). "A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16." *Journal of immunology* **172**(6): 3678-3685.
- Graham G. J., Locati M., Mantovani A., Rot A. and Thelen M.** (2012). "The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors." *Immunology letters* **145**(1-2): 30-38.
- Greaves D. R., Hakkinen T., Lucas A. D., Liddiard K., Jones E., Quinn C. M., Senaratne J., Green F. R., Tyson K., Boyle J., Shanahan C., Weissberg P. L., Gordon S. and Yla-Hertuala S.** (2001). "Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21**(6): 923-929.
- Grivennikov S. I., Greten F. R. and Karin M.** (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." *Cell* **140**(6): 883-899.
- Gursel M., Gursel I., Mostowski H. S. and Klinman D. M.** (2006). "CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation." *Journal of immunology* **177**(3): 1575-1580.
- Gutwein P., Schramme A., Sinke N., Abdel-Bakky M. S., Voss B., Obermuller N., Doberstein K., Koziolok M., Fritzsche F., Johannsen M., Jung K., Schaidler H., Altevogt P., Ludwig A., Pfeilschifter J. and Kristiansen G.** (2009). "Tumoural CXCL16 expression is a novel prognostic marker of longer survival times in renal cell cancer patients." *European journal of cancer* **45**(3): 478-489.
- Hanahan D. and Weinberg R. A.** (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Harashima S., Horiuchi T., Hatta N., Morita C., Higuchi M., Sawabe T., Tsukamoto H., Tahira T., Hayashi K., Fujita S. and Niho Y.** (2001). "Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells." *Journal of immunology* **166**(1): 130-136.
- Harrison J. K., Jiang Y., Chen S., Xia Y., Maciejewski D., McNamara R. K., Streit W. J., Salafra M. N., Adhikari S., Thompson D. A., Botti P., Bacon K. B. and Feng L.** (1998). "Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(18): 10896-10901.
- Harrison J. K., Fong A. M., Swain P. A., Chen S., Yu Y. R., Salafra M. N., Greenleaf W. B., Imai T. and Patel D. D.** (2001). "Mutational analysis of the fractalkine chemokine domain. Basic amino acid residues differentially contribute to CX3CR1 binding, signaling, and cell adhesion." *The Journal of biological chemistry* **276**(24): 21632-21641.
- Hase K., Murakami T., Takatsu H., Shimaoka T., Imura M., Hamura K., Kawano K., Ohshima S., Chihara R., Itoh K., Yonehara S. and Ohno H.** (2006). "The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT." *Journal of immunology* **176**(1): 43-51.
- Hatori K., Nagai A., Heisel R., Ryu J. K. and Kim S. U.** (2002). "Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells." *Journal of neuroscience research* **69**(3): 418-426.
- Hattermann K., Ludwig A., Gieselmann V., Held-Feindt J. and Mentlein R.** (2008). "The chemokine CXCL16 induces migration and invasion of glial precursor cells via its receptor CXCR6." *Molecular and cellular neurosciences* **39**(1): 133-141.
- Hattermann K., Held-Feindt J., Lucius R., Muerkoster S. S., Penfold M. E., Schall T. J. and Mentlein R.** (2010). "The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects." *Cancer research* **70**(8): 3299-3308.
- Hattermann K., Held-Feindt J., Ludwig A. and Mentlein R.** (2013). "The CXCL16-CXCR6 chemokine axis in glial tumors." *Journal of neuroimmunology* **260**(1-2): 47-54.
- Hattermann K., Gebhardt H., Krossa S., Ludwig A., Lucius R., Held-Feindt J., Mentlein R.** (2015a) When a ligand turns into its receptor: Inverse signaling of transmembrane chemokines. *eLife* (under review)
- Hattermann K., Bartsch K., Gebhardt H., Mehdorn H.M., Schmitt A.D., Mentlein R., Held-Feindt J.** (2015b) "Inverse signaling" of the transmembrane chemokine CXCL16 contributes to proliferative and anti-apoptotic effects in human meningiomas. (in preparation)
- Held-Feindt J., Rehmke B., Mentlein R., Hattermann K., Knerlich F., Hugo H. H., Ludwig A. and Mehdorn H. M.** (2008). "Overexpression of CXCL16 and its receptor CXCR6/Bonzo promotes growth of human schwannomas." *Glia* **56**(7): 764-774.
- Held-Feindt J., Hattermann K., Muerkoster S. S., Wedderkopp H., Knerlich-Lukoschus F., Ungefroren H., Mehdorn H. M. and Mentlein R.** (2010). "CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs)." *Experimental cell research* **316**(9): 1553-1566.

- Hernand P., Pincet F., Carvalho S., Ansanay H., Trinquet E., Daoudi M., Combadiere C. and Deterre P.** (2008). "Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain." *The Journal of biological chemistry* **283**(44): 30225-30234.
- Hoover D. M., Mizoue L. S., Handel T. M. and Lubkowski J.** (2000). "The crystal structure of the chemokine domain of fractalkine shows a novel quaternary arrangement." *The Journal of biological chemistry* **275**(30): 23187-23193.
- Huang Y. W., Su P., Liu G. Y., Crow M. R., Chaukos D., Yan H. and Robinson L. A.** (2009). "Constitutive endocytosis of the chemokine CX3CL1 prevents its degradation by cell surface metalloproteases." *The Journal of biological chemistry* **284**(43): 29644-29653.
- Hughes P. M., Botham M. S., Frenzel S., Mir A. and Perry V. H.** (2002). "Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS." *Glia* **37**(4): 314-327.
- Hulshof S., van Haastert E. S., Kuipers H. F., van den Elsen P. J., De Groot C. J., van der Valk P., Ravid R. and Biber K.** (2003). "CX3CL1 and CX3CR1 expression in human brain tissue: noninflammatory control versus multiple sclerosis." *Journal of neuropathology and experimental neurology* **62**(9): 899-907.
- Hundhausen C., Misztela D., Berkhout T. A., Broadway N., Saftig P., Reiss K., Hartmann D., Fahrenholz F., Postina R., Matthews V., Kallen K. J., Rose-John S. and Ludwig A.** (2003). "The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion." *Blood* **102**(4): 1186-1195.
- Hundhausen C., Schulte A., Schulz B., Andrzejewski M. G., Schwarz N., von Hundelshausen P., Winter U., Paliga K., Reiss K., Saftig P., Weber C. and Ludwig A.** (2007). "Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes." *Journal of immunology* **178**(12): 8064-8072.
- Imai T., Hieshima K., Haskell C., Baba M., Nagira M., Nishimura M., Kakizaki M., Takagi S., Nomiya H., Schall T. J. and Yoshie O.** (1997). "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion." *Cell* **91**(4): 521-530.
- Imaizumi T., Matsumiya T., Fujimoto K., Okamoto K., Cui X., Ohtaki U., Hidemi, Yoshida and Satoh K.** (2000). "Interferon-gamma stimulates the expression of CX3CL1/fractalkine in cultured human endothelial cells." *The Tohoku journal of experimental medicine* **192**(2): 127-139.
- Imaizumi T., Yoshida H. and Satoh K.** (2004). "Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells." *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **11**(1): 15-21.
- Izquierdo M. C., Martin-Cleary C., Fernandez-Fernandez B., Elewa U., Sanchez-Nino M. D., Carrero J. J. and Ortiz A.** (2014). "CXCL16 in kidney and cardiovascular injury." *Cytokine & growth factor reviews* **25**(3): 317-325.
- Izumi G., Sakisaka T., Baba T., Tanaka S., Morimoto K. and Takai Y.** (2004). "Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments." *The Journal of cell biology* **166**(2): 237-248.
- Janes P. W., Saha N., Barton W. A., Kolev M. V., Wimmer-Kleikamp S. H., Nievergall E., Blobel C. P., Himanen J. P., Lackmann M. and Nikolov D. B.** (2005). "Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans." *Cell* **123**(2): 291-304.
- Johnson L. A. and Jackson D. G.** (2014). "Control of dendritic cell trafficking in lymphatics by chemokines." *Angiogenesis* **17**(2): 335-345.
- Johnston B., Kim C. H., Soler D., Emoto M. and Butcher E. C.** (2003). "Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets." *Journal of immunology* **171**(6): 2960-2969.
- Juhász K., Zvara A., Lipp A. M., Nimmervoll B., Sonnleitner A., Balogi Z. and Duda E.** (2013). "Casein kinase 2-interacting protein-1, an inflammatory signaling molecule interferes with TNF reverse signaling in human model cells." *Immunology letters* **152**(1): 55-64.
- Jung S., Aliberti J., Graemmel P., Sunshine M. J., Kreutzberg G. W., Sher A. and Littman D. R.** (2000). "Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion." *Molecular and cellular biology* **20**(11): 4106-4114.
- Keating G. M.** (2011). "Plerixafor: a review of its use in stem-cell mobilization in patients with lymphoma or multiple myeloma." *Drugs* **71**(12): 1623-1647.
- Kerfoot S. M., Lord S. E., Bell R. B., Gill V., Robbins S. M. and Kubes P.** (2003). "Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment." *European journal of immunology* **33**(3): 729-739.
- Kim E. K. and Choi E. J.** (2010). "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases." *Biochimica et biophysica acta* **1802**(4): 396-405.

- Kirchner S., Boldt S., Kolch W., Haffner S., Kazak S., Janosch P., Holler E., Andreesen R. and Eissner G.** (2004). "LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway." *Journal of leukocyte biology* **75**(2): 324-331.
- Klein R.** (2009). "Bidirectional modulation of synaptic functions by Eph/ephrin signaling." *Nature neuroscience* **12**(1): 15-20.
- Kovacs E. M., Ali R. G., McCormack A. J. and Yap A. S.** (2002). "E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts." *The Journal of biological chemistry* **277**(8): 6708-6718.
- Kumar R., Tripathi V., Ahmad M., Nath N., Mir R. A., Chauhan S. S. and Luthra K.** (2012). "CXCR7 mediated Gialpha independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells." *Cellular immunology* **272**(2): 230-241.
- Landro L., Damas J. K., Halvorsen B., Fevang B., Ueland T., Otterdal K., Heggelund L., Froland S. S. and Aukrust P.** (2009). "CXCL16 in HIV infection - a link between inflammation and viral replication." *European journal of clinical investigation* **39**(11): 1017-1024.
- Lazar-Molnar E., Hegyesi H., Toth S. and Falus A.** (2000). "Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma." *Cytokine* **12**(6): 547-554.
- Lazennec G. and Richmond A.** (2010). "Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation." *Trends in molecular medicine* **16**(3): 133-144.
- Lee S., Varvel N. H., Konerth M. E., Xu G., Cardona A. E., Ransohoff R. M. and Lamb B. T.** (2010). "CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models." *The American journal of pathology* **177**(5): 2549-2562.
- Lee S. J., Namkoong S., Kim Y. M., Kim C. K., Lee H., Ha K. S., Chung H. T. and Kwon Y. G.** (2006). "Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **291**(6): H2836-2846.
- Lehrke M., Millington S. C., Lefterova M., Cumarantunge R. G., Szapary P., Wilensky R., Rader D. J., Lazar M. A. and Reilly M. P.** (2007). "CXCL16 is a marker of inflammation, atherosclerosis, and acute coronary syndromes in humans." *Journal of the American College of Cardiology* **49**(4): 442-449.
- Liao F., Alkhatib G., Peden K. W., Sharma G., Berger E. A. and Farber J. M.** (1997). "STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1." *The Journal of experimental medicine* **185**(11): 2015-2023.
- Limatola C., Lauro C., Catalano M., Ciotti M. T., Bertollini C., Di Angelantonio S., Ragozzino D. and Eusebi F.** (2005). "Chemokine CX3CL1 protects rat hippocampal neurons against glutamate-mediated excitotoxicity." *Journal of neuroimmunology* **166**(1-2): 19-28.
- Liu B. A., Engelmann B. W. and Nash P. D.** (2012). "The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction." *FEBS letters* **586**(17): 2597-2605.
- Liu C., Luo D., Streit W. J. and Harrison J. K.** (2008). "CX3CL1 and CX3CR1 in the GL261 murine model of glioma: CX3CR1 deficiency does not impact tumor growth or infiltration of microglia and lymphocytes." *Journal of neuroimmunology* **198**(1-2): 98-105.
- Löffler G., Petrides P. E., Heinrich P. C., Müller M. and Graeve L.** (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg, Springer.
- Lu Y., Wang J., Xu Y., Koch A. E., Cai Z., Chen X., Galson D. L., Taichman R. S. and Zhang J.** (2008). "CXCL16 functions as a novel chemotactic factor for prostate cancer cells in vitro." *Molecular cancer research : MCR* **6**(4): 546-554.
- Ludwig A., Berkhout T., Moores K., Groot P. and Chapman G.** (2002). "Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity." *Journal of immunology* **168**(2): 604-612.
- Ludwig A., Hundhausen C., Lambert M. H., Broadway N., Andrews R. C., Bickett D. M., Leesnitzer M. A. and Becherer J. D.** (2005a). "Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules." *Combinatorial chemistry & high throughput screening* **8**(2): 161-171.
- Ludwig A., Schulte A., Schnack C., Hundhausen C., Reiss K., Broadway N., Held-Feindt J. and Mentlein R.** (2005b). "Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells." *Journal of neurochemistry* **93**(5): 1293-1303.
- Ludwig A. and Weber C.** (2007). "Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation." *Thrombosis and haemostasis* **97**(5): 694-703.
- Mangmool S. and Kurose H.** (2011). "G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX)." *Toxins* **3**(7): 884-899.

- Matlaf L. A., Harkins L. E., Bezrookove V., Cobbs C. S. and Soroceanu L.** (2013). "Cytomegalovirus pp71 protein is expressed in human glioblastoma and promotes pro-angiogenic signaling by activation of stem cell factor." *PLoS one* **8**(7): e68176.
- Matloubian M., David A., Engel S., Ryan J. E. and Cyster J. G.** (2000). "A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo." *Nature immunology* **1**(4): 298-304.
- Matsumura S., Wang B., Kawashima N., Braunstein S., Badura M., Cameron T. O., Babb J. S., Schneider R. J., Formenti S. C., Dustin M. L. and Demaria S.** (2008). "Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells." *Journal of immunology* **181**(5): 3099-3107.
- Matsunawa M., Isozaki T., Odai T., Yajima N., Takeuchi H. T., Negishi M., Ide H., Adachi M. and Kasama T.** (2006). "Increased serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) correlate with disease activity in rheumatoid vasculitis." *Arthritis and rheumatism* **54**(11): 3408-3416.
- Matsuo K. and Otaki N.** (2012). "Bone cell interactions through Eph/ephrin: bone modeling, remodeling and associated diseases." *Cell adhesion & migration* **6**(2): 148-156.
- Mauri F. A., Pinato D. J., Trivedi P., Sharma R. and Shiner R. J.** (2012). "Isogeneic comparison of primary and metastatic lung cancer identifies CX3CR1 as a molecular determinant of site-specific metastatic diffusion." *Oncology reports* **28**(2): 647-653.
- McDermott D. H., Halcox J. P., Schenke W. H., Waclawiw M. A., Merrell M. N., Epstein N., Quyyumi A. A. and Murphy P. M.** (2001). "Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis." *Circulation research* **89**(5): 401-407.
- McDermott D. H., Fong A. M., Yang Q., Sechler J. M., Cupples L. A., Merrell M. N., Wilson P. W., D'Agostino R. B., O'Donnell C. J., Patel D. D. and Murphy P. M.** (2003). "Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans." *The Journal of clinical investigation* **111**(8): 1241-1250.
- Meucci O., Fatatis A., Simen A. A. and Miller R. J.** (2000). "Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(14): 8075-8080.
- Mizuno T., Kawanokuchi J., Numata K. and Suzumura A.** (2003). "Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system." *Brain research* **979**(1-2): 65-70.
- Moatti D., Faure S., Fumeron F., Amara Mel W., Seknadji P., McDermott D. H., Debre P., Aumont M. C., Murphy P. M., de Prost D. and Combadiere C.** (2001). "Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease." *Blood* **97**(7): 1925-1928.
- Morganti J. M., Nash K. R., Grimmig B. A., Ranjit S., Small B., Bickford P. C. and Gemma C.** (2012). "The soluble isoform of CX3CL1 is necessary for neuroprotection in a mouse model of Parkinson's disease." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**(42): 14592-14601.
- Moss M. L., Jin S. L., Milla M. E., Bickett D. M., Burkhart W., Carter H. L., Chen W. J., Clay W. C., Didsbury J. R., Hassler D., Hoffman C. R., Kost T. A., Lambert M. H., Leesnitzer M. A., McCauley P., McGeehan G., Mitchell J., Moyer M., Pahel G., Rocque W., Overton L. K., Schoenen F., Seaton T., Su J. L., Becherer J. D. and et al.** (1997). "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." *Nature* **385**(6618): 733-736.
- Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M. E., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S. N., Barrera J. L., Mohar A., Verastegui E. and Zlotnik A.** (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* **410**(6824): 50-56.
- Nakayama T., Hieshima K., Izawa D., Tatsumi Y., Kanamaru A. and Yoshie O.** (2003). "Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues." *Journal of immunology* **170**(3): 1136-1140.
- Nanki T., Shimaoka T., Hayashida K., Taniguchi K., Yonehara S. and Miyasaka N.** (2005). "Pathogenic role of the CXCL16-CXCR6 pathway in rheumatoid arthritis." *Arthritis and rheumatism* **52**(10): 3004-3014.
- Naor D., Sionov R. V. and Ish-Shalom D.** (1997). "CD44: structure, function, and association with the malignant process." *Advances in cancer research* **71**: 241-319.
- Neel N. F., Schutysse E., Sai J., Fan G. H. and Richmond A.** (2005). "Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking." *Cytokine & growth factor reviews* **16**(6): 637-658.
- Neptune E. R. and Bourne H. R.** (1997). "Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(26): 14489-14494.
- Nishiyori A., Minami M., Ohtani Y., Takami S., Yamamoto J., Kawaguchi N., Kume T., Akaike A. and Satoh M.** (1998). "Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia?" *FEBS letters* **429**(2): 167-172.

- Njerve I. U., Pettersen A. A., Opstad T. B., Arnesen H. and Seljeflot I.** (2012). "Fractalkine and its receptor (CX3CR1) in patients with stable coronary artery disease and diabetes mellitus." *Metabolic syndrome and related disorders* **10**(6): 400-406.
- Norgauer J., Metzner B. and Schraufstatter I.** (1996). "Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor beta in human melanoma cells." *Journal of immunology* **156**(3): 1132-1137.
- Oh S. T., Schramme A., Tilgen W., Gutwein P. and Reichrath J.** (2009). "Overexpression of CXCL16 in lesional psoriatic skin." *Dermato-endocrinology* **1**(2): 114-118.
- Oldham K. A., Parsonage G., Bhatt R. I., Wallace D. M., Deshmukh N., Chaudhri S., Adams D. H. and Lee S. P.** (2012). "T lymphocyte recruitment into renal cell carcinoma tissue: a role for chemokine receptors CXCR3, CXCR6, CCR5, and CCR6." *European urology* **61**(2): 385-394.
- Ostuni M. A., Guellec J., Hermand P., Durand P., Combadiere C., Pincet F. and Deterre P.** (2014). "CX3CL1, a chemokine finely tuned to adhesion: critical roles of the stalk glycosylation and the membrane domain." *Biology open* **3**(12): 1173-1182.
- Pan Y., Lloyd C., Zhou H., Dolich S., Deeds J., Gonzalo J. A., Vath J., Gosselin M., Ma J., Dussault B., Woolf E., Alperin G., Culpepper J., Gutierrez-Ramos J. C. and Gearing D.** (1997). "Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation." *Nature* **387**(6633): 611-617.
- Papadopoulos E. J., Sasseti C., Saeki H., Yamada N., Kawamura T., Fitzhugh D. J., Saraf M. A., Schall T., Blauvelt A., Rosen S. D. and Hwang S. T.** (1999). "Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation." *European journal of immunology* **29**(8): 2551-2559.
- Pizzolato J. F. and Saltz L. B.** (2003). "The camptothecins." *Lancet* **361**(9376): 2235-2242.
- Pocsik E., Duda E. and Wallach D.** (1995). "Phosphorylation of the 26 kDa TNF precursor in monocytic cells and in transfected HeLa cells." *Journal of inflammation* **45**(3): 152-160.
- Proudfoot A. E.** (2006). "The biological relevance of chemokine-proteoglycan interactions." *Biochemical Society transactions* **34**(Pt 3): 422-426.
- Pruessmeyer J. and Ludwig A.** (2009). "The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer." *Seminars in cell & developmental biology* **20**(2): 164-174.
- Qian B. Z. and Pollard J. W.** (2010). "Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis." *Cell* **141**(1): 39-51.
- Radice G. L., Rayburn H., Matsunami H., Knudsen K. A., Takeichi M. and Hynes R. O.** (1997). "Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin." *Developmental biology* **181**(1): 64-78.
- Raman D., Sobolik-Delmaire T. and Richmond A.** (2011). "Chemokines in health and disease." *Experimental cell research* **317**(5): 575-589.
- Raychaudhuri S. P., Jiang W. Y. and Farber E. M.** (2001). "Cellular localization of fractalkine at sites of inflammation: antigen-presenting cells in psoriasis express high levels of fractalkine." *The British journal of dermatology* **144**(6): 1105-1113.
- Reichel R. R. and Jacob S. T.** (1993). "Control of gene expression by lipophilic hormones." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**(5): 427-436.
- Reiss K. and Saftig P.** (2009). "The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions." *Seminars in cell & developmental biology* **20**(2): 126-137.
- Robinson L. A., Nataraj C., Thomas D. W., Howell D. N., Griffiths R., Bautch V., Patel D. D., Feng L. and Coffman T. M.** (2000). "A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection." *Journal of immunology* **165**(11): 6067-6072.
- Rosito M., Lauro C., Chece G., Porzia A., Monaco L., Mainiero F., Catalano M., Limatola C. and Trettel F.** (2014). "Transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 drive interplay between neurons, microglia and astrocytes to counteract pMCAO and excitotoxic neuronal death." *Frontiers in cellular neuroscience* **8**: 193.
- Ross J. S., Slodkowska E. A., Symmans W. F., Pusztai L., Ravdin P. M. and Hortobagyi G. N.** (2009). "The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine." *The oncologist* **14**(4): 320-368.
- Rostene W., Kitabgi P. and Parsadaniantz S. M.** (2007). "Chemokines: a new class of neuromodulator?" *Nature reviews. Neuroscience* **8**(11): 895-903.
- Ruan W. J. and Lai M. D.** (2004). "Autocrine stimulation in colorectal carcinoma (CRC): positive autocrine loops in human colorectal carcinoma and applicable significance of blocking the loops." *Medical oncology* **21**(1): 1-8.
- Ruth J. H., Volin M. V., Haines G. K., 3rd, Woodruff D. C., Katschke K. J., Jr., Woods J. M., Park C. C., Morel J. C. and Koch A. E.** (2001). "Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis." *Arthritis and rheumatism* **44**(7): 1568-1581.

- Salcedo R., Ponce M. L., Young H. A., Wasserman K., Ward J. M., Kleinman H. K., Oppenheim J. J. and Murphy W. J.** (2000). "Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression." *Blood* **96**(1): 34-40.
- Sarvaiya P. J., Guo D., Ulasov I., Gabikian P. and Lesniak M. S.** (2013). "Chemokines in tumor progression and metastasis." *Oncotarget* **4**(12): 2171-2185.
- Sauer L., Gitenay D., Vo C. and Baron V. T.** (2010). "Mutant p53 initiates a feedback loop that involves Egr-1/EGF receptor/ERK in prostate cancer cells." *Oncogene* **29**(18): 2628-2637.
- Schaeffer H. J. and Weber M. J.** (1999). "Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers." *Molecular and cellular biology* **19**(4): 2435-2444.
- Schafer M. and Werner S.** (2008). "Cancer as an overheating wound: an old hypothesis revisited." *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**(8): 628-638.
- Schulte A., Schulz B., Andrzejewski M. G., Hundhausen C., Mletzko S., Achilles J., Reiss K., Paliga K., Weber C., John S. R. and Ludwig A.** (2007). "Sequential processing of the transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 by alpha- and gamma-secretases." *Biochemical and biophysical research communications* **358**(1): 233-240.
- Sciume G., Santoni A. and Bernardini G.** (2010). "Chemokines and glioma: invasion and more." *Journal of neuroimmunology* **224**(1-2): 8-12.
- Sethi G., Shanmugam M. K., Ramachandran L., Kumar A. P. and Tergaonkar V.** (2012). "Multifaceted link between cancer and inflammation." *Bioscience reports* **32**(1): 1-15.
- Shapiro L. and Weis W. I.** (2009). "Structure and biochemistry of cadherins and catenins." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**(3): a003053.
- Shen H., Schuster R., Stringer K. F., Waltz S. E. and Lentsch A. B.** (2006). "The Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growth." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**(1): 59-64.
- Shimaoka T., Kume N., Minami M., Hayashida K., Kataoka H., Kita T. and Yonehara S.** (2000). "Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages." *The Journal of biological chemistry* **275**(52): 40663-40666.
- Shimaoka T., Nakayama T., Fukumoto N., Kume N., Takahashi S., Yamaguchi J., Minami M., Hayashida K., Kita T., Ohsumi J., Yoshie O. and Yonehara S.** (2004). "Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells." *Journal of leukocyte biology* **75**(2): 267-274.
- Shiraishi K., Fukuda S., Mori T., Matsuda K., Yamaguchi T., Tanikawa C., Ogawa M., Nakamura Y. and Arakawa H.** (2000). "Identification of fractalkine, a CX3C-type chemokine, as a direct target of p53." *Cancer research* **60**(14): 3722-3726.
- Shulby S. A., Dolloff N. G., Stearns M. E., Meucci O. and Fatatis A.** (2004). "CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells." *Cancer research* **64**(14): 4693-4698.
- Slot J. W. and Geuze H. J.** (1985). "A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry." *European journal of cell biology* **38**(1): 87-93.
- Smith D. R., Poverini P. J., Kunkel S. L., Orringer M. B., Whyte R. I., Burdick M. D., Wilke C. A. and Strieter R. M.** (1994). "Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma." *The Journal of experimental medicine* **179**(5): 1409-1415.
- Sokol C. L. and Luster A. D.** (2015). "The Chemokine System in Innate Immunity." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **7**(5).
- Struyf S., Salogni L., Burdick M. D., Vandercappellen J., Gouwy M., Noppen S., Proost P., Opdenakker G., Parmentier M., Gerard C., Sozzani S., Strieter R. M. and Van Damme J.** (2011). "Angiostatic and chemotactic activities of the CXC chemokine CXCL4L1 (platelet factor-4 variant) are mediated by CXCR3." *Blood* **117**(2): 480-488.
- Sun M. and Fink P. J.** (2007). "A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family." *Journal of immunology* **179**(7): 4307-4312.
- Sun Y., Chang Z. and Zhang S.** (2008). "Increased serum CXCL16 level is a marker for acute coronary syndromes." *Archives of medical research* **39**(3): 332-337.
- Suzuki I. and Fink P. J.** (2000). "The dual functions of fas ligand in the regulation of peripheral CD8+ and CD4+ T cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(4): 1707-1712.
- Thelen M. and Stein J. V.** (2008). "How chemokines invite leukocytes to dance." *Nature immunology* **9**(9): 953-959.

- Toyofuku T., Zhang H., Kumanogoh A., Takegahara N., Yabuki M., Harada K., Hori M. and Kikutani H.** (2004). "Guidance of myocardial patterning in cardiac development by *Sema6D* reverse signalling." *Nature cell biology* **6**(12): 1204-1211.
- Truman L. A., Ford C. A., Pasikowska M., Pound J. D., Wilkinson S. J., Dumitriu I. E., Melville L., Melrose L. A., Ogden C. A., Nibbs R., Graham G., Combadiere C. and Gregory C. D.** (2008). "CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis." *Blood* **112**(13): 5026-5036.
- Tsou C. L., Haskell C. A. and Charo I. F.** (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine." *The Journal of biological chemistry* **276**(48): 44622-44626.
- Umehara H., Goda S., Imai T., Nagano Y., Minami Y., Tanaka Y., Okazaki T., Bloom E. T. and Domae N.** (2001). "Fractalkine, a CX3C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1." *Immunology and cell biology* **79**(3): 298-302.
- Umehara H., Bloom E. T., Okazaki T., Nagano Y., Yoshie O. and Imai T.** (2004). "Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**(1): 34-40.
- Unutmaz D., Xiang W., Sunshine M. J., Campbell J., Butcher E. and Littman D. R.** (2000). "The primate lentiviral receptor *Bonzo*/STRL33 is coordinately regulated with *CCR5* and its expression pattern is conserved between human and mouse." *Journal of immunology* **165**(6): 3284-3292.
- Vela M., Aris M., Llorente M., Garcia-Sanz J. A. and Kremer L.** (2015). "Chemokine receptor-specific antibodies in cancer immunotherapy: achievements and challenges." *Frontiers in immunology* **6**: 12.
- Verbeke H., Struyf S., Laureys G. and Van Damme J.** (2011). "The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer." *Cytokine & growth factor reviews* **22**(5-6): 345-358.
- Viola A. and Luster A. D.** (2008). "Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation." *Annual review of pharmacology and toxicology* **48**: 171-197.
- Volin M. V., Huynh N., Klosowska K., Reyes R. D. and Woods J. M.** (2010). "Fractalkine-induced endothelial cell migration requires MAP kinase signaling." *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology* **77**(1): 7-16.
- Vomaske J., Nelson J. A. and Streblov D. N.** (2009). "Human Cytomegalovirus US28: a functionally selective chemokine binding receptor." *Infectious disorders drug targets* **9**(5): 548-556.
- Wang J., Ou Z. L., Hou Y. F., Luo J. M., Shen Z. Z., Ding J. and Shao Z. M.** (2006). "Enhanced expression of Duffy antigen receptor for chemokines by breast cancer cells attenuates growth and metastasis potential." *Oncogene* **25**(54): 7201-7211.
- Watts A. D., Hunt N. H., Wanigasekara Y., Bloomfield G., Wallach D., Roufogalis B. D. and Chaudhri G.** (1999). "A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'." *The EMBO journal* **18**(8): 2119-2126.
- Wehr A., Baeck C., Ulmer F., Gassler N., Hittatiya K., Luedde T., Neumann U. P., Trautwein C. and Tacke F.** (2014). "Pharmacological inhibition of the chemokine CXCL16 diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury." *PLoS one* **9**(11): e112327.
- Wente M. N., Gaida M. M., Mayer C., Michalski C. W., Haag N., Giese T., Felix K., Bergmann F., Giese N. A. and Friess H.** (2008). "Expression and potential function of the CXC chemokine CXCL16 in pancreatic ductal adenocarcinoma." *International journal of oncology* **33**(2): 297-308.
- White G. E., Tan T. C., John A. E., Whatling C., McPheat W. L. and Greaves D. R.** (2010). "Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signalling." *Cardiovascular research* **85**(4): 825-835.
- Wilbanks A., Zondlo S. C., Murphy K., Mak S., Soler D., Langdon P., Andrew D. P., Wu L. and Briskin M.** (2001). "Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTRligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines." *Journal of immunology* **166**(8): 5145-5154.
- Wong B. W., Wong D. and McManus B. M.** (2002). "Characterization of fractalkine (CX3CL1) and CX3CR1 in human coronary arteries with native atherosclerosis, diabetes mellitus, and transplant vascular disease." *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* **11**(6): 332-338.
- Wuttge D. M., Zhou X., Sheikine Y., Wagsater D., Stemme V., Hedin U., Stemme S., Hansson G. K. and Sirsjo A.** (2004). "CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**(4): 750-755.
- Yamaguchi K., Ogawa K., Katsube T., Shimao K., Konno S., Shimakawa T., Yoshimatsu K., Naritaka Y., Yagawa H. and Hirose K.** (2005). "Platelet factor 4 gene transfection into tumor cells inhibits angiogenesis, tumor growth and metastasis." *Anticancer research* **25**(2A): 847-851.

- Yap A. S. and Kovacs E. M.** (2003). "Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane." *The Journal of cell biology* **160**(1): 11-16.
- Yoneda O., Imai T., Goda S., Inoue H., Yamauchi A., Okazaki T., Imai H., Yoshie O., Bloom E. T., Domae N. and Umehara H.** (2000). "Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells." *Journal of immunology* **164**(8): 4055-4062.
- Yoneda O., Imai T., Nishimura M., Miyaji M., Mimori T., Okazaki T., Domae N., Fujimoto H., Minami Y., Kono T., Bloom E. T. and Umehara H.** (2003). "Membrane-bound form of fractalkine induces IFN-gamma production by NK cells." *European journal of immunology* **33**(1): 53-58.
- Yu G., Zhou A., Xue J., Huang C., Zhang X., Kang S. H., Chiu W. T., Tan C., Xie K., Wang J. and Huang S.** (2015). "FoxM1 promotes breast tumorigenesis by activating PDGF-A and forming a positive feedback loop with the PDGF/AKT signaling pathway." *Oncotarget*.
- Yu L., Zhou Y., Cheng S. and Rao Y.** (2010). "Plexin a-semaphorin-1a reverse signaling regulates photoreceptor axon guidance in *Drosophila*." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**(36): 12151-12156.
- Zhou Y., Gunput R. A. and Pasterkamp R. J.** (2008). "Semaphorin signaling: progress made and promises ahead." *Trends in biochemical sciences* **33**(4): 161-170.
- Zhuge X., Murayama T., Arai H., Yamauchi R., Tanaka M., Shimaoka T., Yonehara S., Kume N., Yokode M. and Kita T.** (2005). "CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells." *Biochemical and biophysical research communications* **331**(4): 1295-1300.
- Zlotnik A.** (2006). "Chemokines and cancer." *International journal of cancer. Journal international du cancer* **119**(9): 2026-2029.
- Zlotnik A., Burkhardt A. M. and Homey B.** (2011). "Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis." *Nature reviews. Immunology* **11**(9): 597-606.
- Zlotnik A. and Yoshie O.** (2012). "The chemokine superfamily revisited." *Immunity* **36**(5): 705-716.

8. Danksagung

Als Erstes danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Rolf Mentlein, für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und das interessante Thema. Des Weiteren möchte ich mich auch für die Unterstützung, die Anregungen sowie die vielen nützlichen Ratschläge und die Möglichkeit eine Zeit in einem Labor in Rio de Janeiro zu verbringen bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Manuela Dittmar möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken.

Den Direktoren des Anatomischen Instituts, Professor Dr. Sievers, Professor Dr. Dr. Schünke, Prof. Dr. Wedel und Professor Dr. Lucius danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Anatomischen Institut der Universität Kiel durchführen zu können sowie für die Übernahme der abschließenden Finanzierung für das letzte halbe Jahr.

Ein weiteres, großes Dankeschön gilt Frau PD. Dr. Kirsten Hattermann für die vielen Tipps, Ratschläge und die Betreuung während der Zeit im Labor und dem Schreiben dieser Arbeit und dafür, dass ich jederzeit meine Fragen stellen konnte.

Bei Frau Prof. Dr. Dr. Janka Held-Feindt möchte ich ebenfalls mich für die vielen Ratschläge und Anregungen zu meiner Arbeit bedanken.

Auch bei Judith Becker, Martina Burmester, Sonja Dahle und Miriam Lemmer möchte ich mich für die vielen schönen Stunden im Labor und die große Hilfsbereitschaft bei den Experimenten bedanken. Außerdem für die vielen großen und kleinen Dinge, durch die der Arbeitsalltag doch um einiges erleichtert wird. Ein weiteres Dankeschön gilt Otfried Fransen, der jederzeit bei Computerproblemen mit Rat und Tat zur Stelle war.

Meinem Freund Nils danke ich für die moralische Unterstützung und einfach dafür, dass du immer da bist.

Und nicht zuletzt geht ein großes Dankeschön an meine Eltern, die mich immer unterstützt haben.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Henrike Gebhardt
 Geburtsdaten : 17.08.1986
 Geburtsort : Uelzen, Niedersachsen
 Staatsangehörigkeit: : deutsch
 Privatanschrift : Am Oortensiek 3, 22335 Hamburg

Schulbildung

1993 – 1997 : Grund- und Hauptschule Wittingen
 1997 – 1999 : Orientierungsstufe Wittingen
 1999 – 2006 : Gymnasium Hankensbüttel
 Abschluss Abitur

Studium

10.2006 – 08.2011 : Studium der „Biochemie und Molekular Biologie“ an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 Nebenfächer : Medizinische Mikrobiologie
 Pharmazeutische Chemie
 Molekulare Onkologie
 11.2010 – 08.2011 : Diplomarbeit am Anatomischen Institut der CAU Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Rolf Mentlein
 „Liganden als Rezeptoren – Versuche zur inversen und reversen Signaltransduktion des transmembranen Chemokins CX3CL1/Fractalkine“
 August 2011 : Verleihung des Diploms; Gesamtnote „ausgezeichnet“

Arbeit

08.2011 – 11.2011 : Hilfswissenschaftler in der AG Mentlein auf freiwilliger Basis
 01.12. – 31.12.2011 : Aushilfe in der Buchhandlung Thalia in Kiel
 07.2012 – Herbst 2015 : Doktorarbeit am Anatomischen Institut der CAU Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Rolf Mentlein
 „Inverse Signaltransduktion - ein neues Konzept zur Wirkung von transmembranen Liganden“

Auslandsaufenthalt

08.2014 – 11.2014 : Forschungsaufenthalt im Labor („Laboratório de Morfogênese Celular“ (LMC)) von Herrn Prof. Vivaldo Moura Neto an der „Universidade Federal do Rio de Janeiro“ (UFRJ) in Brasilien
 Finanzierung : Stipendium der „FAPERJ“-Stiftung aus Rio de Janeiro, Brasilien

Publikationsverzeichnis

Originalartikel

- Hattermann K[#], **Gebhardt H[#]**, Krossa S, Ludwig A, Lucius R, Held-Feindt J^{*}, Mentlein R^{*} (2015) When a ligand turns into its receptor: Inverse signaling of transmembrane

chemokines. eLife (under review) ^{#*} authors contributed equally.

- Hattermann K, Bartsch K, **Gebhardt H**, Mehdorn HM, Schmitt AD, Mentlein R^{*}, Held-Feindt J^{*} (2015) "Inverse signaling" of the transmembrane chemokine CXCL16 contributes to proliferative and anti-apoptotic effects in human meningiomas. (in preparation) ^{*}authors contributed equally.

Poster und Vorträge

- Hattermann K, Bartsch K, **Gebhardt H**, Mehdorn HM, Meintlein R, Held-Feindt J (2015) Inverse signaling of the transmembrane Chemokine CXCL16 in human meningiomas as a new concept to favor tumor progression. Brain Tumor Meeting, Berlin-Buch, 28.-29. 05. 2015. Abstract-Band P27, S.15.
- Hattermann K, Schottelius M, Becker J, Schröter A, **Gebhardt H**, Wester HJ, Mentlein R (2014) In vitro investigation of CXCR4 and CXCR7 endocytosis upon stimulation with novel peptidic ligands. 109. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Salzburg, 24.-26. September 2014. P58. DOI 10.3337/anatges.2014.0022
- Ardabili S, Hattermann K, **Gebhardt H**, Held-Feindt J, Lange T, Schumacher U, Mentlein R (2013) Embryonic and neural stem cell markers in human ectoderm-derived tumors. Anatomische Gesellschaft 30. Arbeitstagung, Würzburg, 25.-27.09.2013. Abstract-Band P52. DOI 10.3337/anatges.2014.0018
- Bartsch K, Hattermann K, **Gebhardt H**, Mehdorn HM, Mentlein R, Held-Feindt J (2013) Inverse signaling of the transmembrane chemokines CXCL16 and CX3CL1 in human meningiomas. Anatomische Gesellschaft 30. Arbeitstagung, Würzburg, 25.-27.09.2013. Abstract-Band P53. DOI 10.3337/anatges.2014.0018
- Hattermann K, **Gebhardt H**, Ludwig A, Held-Feindt J, Mentlein R (2013) Bidirectional cellular communication: Reverse signaling of the transmembrane chemokines CXCL16 and CX3CL1. Anatomische Gesellschaft 30. Arbeitstagung, Würzburg, 25.-27.09.2013. V9. DOI 10.3337/anatges.2014.0018
- Meyer G, **Gebhardt H**, Held-Feindt J, Mentlein R, Hattermann K (2013) Differentiation of THP-1 monocytes regulates expression of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 and effects of ligands. Anatomische Gesellschaft 30. Arbeitstagung, Würzburg, 25.-27.09.2013. P54. DOI 10.3337/anatges.2014.0018
- Hattermann K, **Gebhardt H**, Ludwig A, Held-Feindt J, Mentlein R (2013) Functional role of transmembrane chemokines in gliomas. Brain Tumor Meeting, Berlin-Buch, 23.-24. 05. 2013. V6, Abstract-Band S.11.
- Hattermann K, Held-Feindt J, **Gebhardt H**, Ludwig A, Mentlein R (2012) Inverse signaling – a novel concept to understand transmembrane chemokine signaling. Anatomische Gesellschaft 29. Arbeitstagung, Würzburg, 26.-28. 09. 2012. V33. DOI 10.3337/anatges.2012.0017

10. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meinen Doktorvater, von mir selbständig verfasst wurde und keine anderen als die erlaubten und angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Diese Dissertation wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an anderer Stelle für ein Promotionsverfahren vorgelegt.

Ferner erkläre ich, dass ich noch kein früheres Promotionsvorhaben ohne Erfolg beendet habe.

Kiel, den

Henrike Gebhardt