

Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Chemokinrezeptoren	5
1.1.1	Der Chemokinrezeptor CCR7	6
1.1.2	<i>In vivo</i> Funktion der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5	8
1.1.2.1	Phänotyp der CCR7 <sup>-/-</sup> -Mäuse	8
1.1.2.2	Phänotyp der CXCR5 <sup>-/-</sup> -Mäuse	9
1.2	Chemokine	10
1.2.1	Die homöostatischen Chemokine CCL19 und CCL21	12
1.3	Modulatoren der Chemokin-induzierte Migration	13
1.4	Das immunmodulatorische Molekül FTY720	14
1.5	Metastasierung von soliden Brusttumoren	15
1.5.1	Tumorprogression bei Karzinomen	15
1.5.2	Dissoziation vom Tumorverband	16
1.5.2.1	Beeinflussung der Tumorprogression durch autokrin- und parakrin-wirkende Chemokine	17
1.5.3	Migration von Tumorzellen über das Endothel	19
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>22</b>
3.1	Bakterien	22
3.2	Vektoren	22
3.3	Zelllinien	22
3.4	Mäuse	23
3.5	Oligonukleotide	23
3.6	Enzyme	23
3.7	Antikörper und Konjugate	24
3.8	Chemikalien, Geräte und sonstige Materialien	25
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
4.1	Kultivierung von prokaryotischen Zellen	28
4.1.1	Bakterienkulturen auf Agarplatten	28
4.1.2	Flüssigkulturen	28
4.1.3	Lagerung und Reaktivierung der Bakterienkultur	28
4.1.4	Herstellung chemokompetenter Bakterien	28
4.1.5	Präparation elektrokompeter Bakterien	28
4.1.6	Transformation kompetenter Bakterien	29
4.2	Präparation und Analyse von DNA	29
4.2.1	Isolierung von Plasmiden aus Bakterien über alkalischen Schnellaufschluß	29

4.2.2 Anionenaustauscher-Chromatographie	30
4.2.3 Analytische Schnellpräparation in Mikrotiterplatten	30
4.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA über Agarosegele	30
4.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen durch Zentrifugation	31
4.2.6 Isolierung von RNA	31
4.2.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung	31
4.2.8 Synthese einzelsträngiger cDNA für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
4.2.9 Amplifizierung von DNA mittels der PCR	32
4.2.10 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	32
4.2.11 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	33
4.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten	33
4.2.13 Sequenzierung der Plasmid-DNA	33
4.2.14 Sequenzier-Gelelektrophorese	34
4.3 Kultur von Säugetierzellen	34
4.3.1 Kultivierung von Zelllinien	34
4.3.2 Zellzahlbestimmung	35
4.4 Proteinexpression in Säugetierzellen	35
4.4.1 Transfektion von Säugetierzellen	35
4.4.1.1 Kalziumphosphat-Methode	35
4.4.1.2 Transfektion von Suspensionszelllinien durch Elektroporation	35
4.4.2 Selektion stabil exprimierender Zelllinien	36
4.4.2.1 Selektion und Sortierung von Suspensionszellen	36
4.4.2.2 Selektion von adhärenenten Zellen	36
4.4.3 Durchflußzytometrie	36
4.4.4 Nachweis intrazellulärer Epitope	37
4.4.5 Isolierung membranständiger und intrazellulärer Proteine	37
4.4.6 Immunpräzipitation von Proteinen	37
4.4.7 Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen (Glycingele)	37
4.4.8 Transfer und Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	38
4.4.8.1 Transfer nach der Western Blot Methode	38
4.4.8.2 Nachweis von immobilisierten Proteinen auf PVDF-Membran mit Antikörper	39
4.4.8.3 Chemolumineszenz-Nachweis	39
4.4.9 Radioaktive <i>in vitro</i> Phosphorylierung	39
4.4.10 Tunicamycin-induzierte Inhibition der N-Glykosylierung	40
4.4.10.1 Metabolische Markierung mit <sup>35</sup> S-Met/-Cys	40
4.4.10.2 TCA-Fällung der Zellysate	40
4.5 Immunfluoreszenzfärbung	40
4.5.1 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten	41
4.5.2 Phalloidin-färbung	41
4.6 Herstellung von Organschnitten	41

4.6.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	42
4.7	Isolierung von Lymphozyten aus Organen	42
4.8	Messung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration	42
4.8.1	Spektralfluorometrische Bestimmung der zytosolischen Konzentration von Ca <sup>2+</sup> -Ionen	42
4.9	Liganden-induzierte Internalisierung von CCR7	43
4.10	Chemokin-induzierte Migration von MDA-MB435S1-Zellen im Migrations-Assay	44
4.11	MAPK-Assay	45
4.12	Orthotope Applikation von MDA-MB435S1-Zellen	46
4.13	Kurzzeitmigrationsexperiment	47
4.13.1	Berechnung des relativen Populationsanteils von CFSE-markierten Splenozyten in den Organen	48
4.13.2	Berechnung des relativen Populationsanteils von CFSE-markierten Tumorzellen	48
4.14	FTY720-Versuche	48
4.14.1	Kurzzeit-Depletion und -Infiltration von Lymphozyten in der Maus nach oraler Injektion von FTY720	48
4.14.2	Berechnung der Populationsanteile in den Organen	49
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
5.1	Klonierung und funktionelle Charakterisierung des Rezeptors CCR7 und dessen Liganden CCL19 und CCL21	50
5.1.1	Klonierung der CCR7 cDNA	50
5.1.2	Klonierung und Sequenzierung der CCL19 und CCL21 cDNA	51
5.1.3	Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs über die Stimulation von CCR7	53
5.1.4	PKC-abhängige Kontrolle der Expression von CCR7	55
5.2	Funktionelle Charakterisierung Chemokinrezeptor- und Chemokin-exprimierender Transfektanden der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB435S1	56
5.2.1	CCR7-exprimierende MDA-MB435S1-Zellen	57
5.2.2	N-Glykosylierung von CCR7 in MDA-MB4325S1-Zellen	59
5.2.3	Internalisierung des Rezeptors CCR7	60
5.2.4	Phosphorylierung des Rezeptors CCR7	63
5.3	Klonierung von CCR7 und CCL19- oder CCL21-koexprimierenden Zellen	64
5.4	Biologische Aktivität von CCR7- und CCL19- oder CCL21-koexprimierenden Zellen im Vergleich	68
5.4.1	Kalzium-Mobilisierung durch CCL19 oder CCL21	68
5.4.2	Internalisierung von CCR7 bei den CCL19- und CCL21-koexprimierenden Zellen nach exogener CCL19-Stimulation	69
5.4.3	Gerichtete Migration von CCR7-exprimierenden adhären Zellen	70
5.4.3.1	Untersuchung des Einflusses von Bisindolylmaleimid I und Chelerythrin Chlorid auf die CCR7-induzierte Migration	72

5.4.4	Charakterisierung der heterologen Koexpression von CCR7 und CCL19 oder CCL21 auf MDA-MB435S1-Zellen	73
5.4.5	Kurzzeitmigrationsexperimente in BALB/c-Mäusen	74
5.4.6	Analyse der MDA-MB435S1 Transfektanden im Metastasierungs-Assay	76
5.4.6.1	FACS-Analyse von unterschiedlichen Organen der Nacktmaus	76
5.4.6.2	Histologische Analyse von Tumor- und Lungengewebe der Nacktmäuse	78
5.5	Chemokinrezeptor-abhängige Mechanismen von FTY720	83
5.5.1	FTY720 und Chemokinrezeptor-Funktionen <i>in vitro</i>	84
5.5.1.1	Aktivierung des MAPK-Signalwegs über CCR7 oder CXCR5 in Zusammenhang mit FTY720	84
5.5.2	Internalisierung des heterologen Rezeptors CCR7 in Anwesenheit von FTY720	85
5.5.3	Migrationseffekte von stabil CCR7-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen nach Stimulation mit FTY720	86
5.5.4	Kurzzeitmigration von Splenozyten aus Wildtyp- und CCR7 <sup>-/-</sup> -Mäusen im Vergleich unter Zugabe von FTY720	86
5.6	Modulierte Lymphozyten-Migration in CXCR5 <sup>-/-</sup> - und CCR7 <sup>-/-</sup> -Maus nach oraler Behandlung mit FTY720	89
5.6.1	Lymphozyten- <i>homing</i> von peripheren Blutzellen, induziert durch FTY720 in Wildtyp-, den CXCR5 <sup>-/-</sup> - und CCR7 <sup>-/-</sup> -Mäusen	89
5.6.2	Veränderte Homöostase von T- und B-Zellen in sekundären lymphatischen Organen durch Injektion von FTY720	91
5.6.2.1	Homöostase der Milz verändert durch Behandlung mit FTY720	91
5.6.2.2	Veränderte FTY720-induzierte Homöostase in den Lymphknoten	92
5.6.2.3	Veränderte FTY720-induzierte Homöostase in den Peyer'schen Plaques	94
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>95</b>
6.1	Funktionalität des Rezeptors CCR7	95
6.2	Die Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR7 im Prozess der Metastasenbildung	104
6.3	Chemokinrezeptor-abhängige FTY720-Funktionen	111
6.3.1	FTY720-induzierte Lymphopenie in Wildtyp-, CXCR5 <sup>-/-</sup> - und CCR7 <sup>-/-</sup> -Mäusen	113
6.3.2	FTY720-Funktionen in CXCR5 <sup>-/-</sup> -Mäusen	114
6.3.3	FTY720-Effekte in CCR7 <sup>-/-</sup> -Mäusen	116
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>9</b>	<b>Literatur</b>	<b>127</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>145</b>
<b>11</b>	<b>Lebeneslauf</b>	<b>147</b>
<b>12</b>	<b>Publikation</b>	<b>149</b>
<b>13</b>	<b>Erklärung</b>	<b>151</b>