

Claudia Wendel

**Funktionelle Rolle der Chemokine und
Chemokinrezeptoren in der Tumorprogression und
Metastasierung**

2009

Biologie

**Funktionelle Rolle der Chemokine und
Chemokinrezeptoren in der Tumorprogression und
Metastasierung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Claudia Wendel

aus Wolfen

-2009-

Dekan: Prof. Dr. Christian Klämbt

Erster Gutachter: Prof. Dr. Jörg Haier

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Püschel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2009

Tag der Promotion: 17.07.2009

Inhaltsverzeichnis I.....	I
Abkürzungsverzeichnis II.....	II
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Das Mammakarzinom.....	2
1.2 Die organspezifische Metastasierung.....	3
1.3 Die Rolle der Chemokine bei der organspezifischen Metastasierung.....	5
1.3.1 Die Funktion von CXCR4/SDF1 α	6
1.3.2 Die Funktion von CCR7/MIP3 β	7
1.4 Die Rolle von Chemokinen und Integrinen bei der Tumorzellmigration.....	8
1.5 Die Extrazelluläre Matrix und Integrine.....	9
1.5.1 Integrine.....	10
1.6 Die Funktion der Extrazellulären Matrix bei der Tumorzellmigration.....	10
1.7 Die Familie der kleinen Rho-GTPasen.....	12
1.7.1 Rho-GTPasen und Krebs.....	16
1.8 Zielsetzung.....	17
2 Materialien und Methoden.....	19
2.1 Materialien.....	19
2.1.1 Chemikalien.....	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Geräte.....	22
2.1.4 Software.....	23
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	23
2.1.6 Mammakarzinom-Zelllinien.....	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Zellkultivierung.....	26
2.2.2 Statische Adhäsionen von Tumorzellen.....	26
2.2.3 Transmigration von Tumorzellen.....	27
2.2.4 Rho-GTPase-Aktivierungen/Western Blot.....	27
2.2.4.1 Zellyse.....	27
2.2.4.2 Probenvorbereitungen.....	28
2.2.4.3 SDS-Gelelektrophorese.....	28
2.2.4.4 Western Blot.....	29
2.2.5 Durchflusszytometrie.....	30
2.2.6 Immunfluoreszenzfärbungen.....	31
2.2.7 Zeitraffermikroskopie.....	31
2.2.8 Statistische Analyse.....	32
3 Ergebnisse.....	33
I. Die Rolle von CXCR4 beim Mammakarzinom.....	34
3.1 Die Zelloberflächenexpression von CXCR4.....	34
3.2 Überprüfungen der Funktionalität von CXCR4 durch Signaltransduktion der kleinen Rho-GTPasen.....	35
3.3 Zelloberflächenverteilung von CXCR4 in Abhängigkeit von der EZM.....	38
3.4 Die integrinvermittelte Adhäsion der SDF1 α -stimulierten Tumorzellen.....	43
3.5 Die SDF1 α -induzierte Migration der Mammakarzinomzellen.....	45
3.6 SDF1 α beeinflusst die Motilität der Mammakarzinomzellen.....	47
II. Die Rolle von CCR7 beim Mammakarzinom.....	49
3.7 Die Zelloberflächenexpression von CCR7.....	49
3.8 Überprüfungen der Funktionalität von CCR7 durch Signaltransduktion der kleinen Rho-GTPasen.....	50
3.9 Zelloberflächenverteilung von CCR7 in Abhängigkeit von der EZM.....	52
3.10 Die integrin-vermittelte Adhäsion der MIP3 β -stimulierten Tumorzellen.....	54
3.11 Die MIP3 β -induzierte Migration der Mammakarzinomzellen.....	55
3.12 MIP3 β beeinflusst die Motilität der Mammakarzinomzellen.....	58
III. Untersuchung beteiligter Signalwege bei der Chemokin-induzierten Zellmigration.....	59
3.13 Die Chemokin-induzierte Migration der Mammakarzinomzellen.....	60
3.14 Die Chemokin-induzierte Zellmotilität der Mammakarzinomzellen.....	61
4 Diskussion.....	64

4.1 Die Rolle von CXCR4/SDF1 α bei der Chemokin-induzierten Migration der Mammakarzinomzellen.....	64
4.2 Die Rolle von CCR7/MIP3 β bei der Chemokin-induzierten Migration der Mammakarzinomzellen.....	68
4.3 Untersuchungen von Signalwegen bei Interaktionen von Integrinen und Chemokinen.....	72
4.4 Schlussfolgerungen.....	75
4.5 Perspektiven.....	76
5. Literaturverzeichnis.....	77
Lebenslauf.....	87
Danksagung.....	89

Abkürzungsverzeichnis II

Abb.	Abkürzungen
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
A. dest	Aqua destillatum
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C I	Typ I Kollagen
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymimmunoassay (Enzyme-linked Immunosorbant Assay)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	fötales Kälberserum
FN	Fibronektin
FNIII	Fibronektin Typ III Domäne
g	Gramm
GAP	GTPase activating protein
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (hour)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse-radish-peroxidase)
IgG	Immunglobulin G

kg	Kilogramm
kDa	Kilodalton
l	Liter
LN	Laminin
M	Molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minute
MIP3 β	macrophage inflammatory protein 3 β
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
OD	Optische Dichte
PAK	p21-activating kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PBS/A	PBS mit BSA
PBT	PBS mit BSA und Triton-X 100
PE	Pycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus

PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PIP ₃ / (PtdIns(3,4,5)P ₃)	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PLL	Poly-L-Lysin
PTEN	Phosphatase Tensin Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
ROCK	Rho-Kinase
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds/revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDF1 α	stromal derived factor 1 α
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	sogenannte
Src	Src-Tyrosin-Kinase
Tab.	Tabelle
TE	Trypsin-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethsn
Tyr	Tyrosin
V	Volumen

Zusammenfassung

Ziel dieser Studie ist es, den Effekt der Chemokin-Stimulation auf Mammakarzinomzellen in Abhängigkeit von der extrazellulären Matrix (EZM) zu untersuchen. Die Adhäsion und Migration von Tumorzellen auf der EZM sind wichtige Schritte bei der organspezifischen Metastasierung. Es ist bekannt, dass die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 oft bei Mammakarzinomen überexprimiert werden und zusätzlich eine funktionelle Rolle bei der Lenkung der Tumorzellen zu ihren Metastasierungsorten wie z.B. der Leber spielen. Die Interaktion zwischen Integrinen und Chemokinen sollen aufgeklärt werden.

Das Adhäsions- und Migrationsverhalten zweier Mammakarzinomzelllinien (MDA MB 231 und -468) wurde in Abhängigkeit von der EZM mit Adhäsions- und Transwellassays in vitro analysiert. Die Oberflächenexpressionen der CXCR4- und CCR7-Rezeptoren wurden mittels Durchflusszytometrie und Immunzytochemie quantifiziert. Die Aktivierung der GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 durch die Liganden SDF1 α und MIP3 β wurde mit Pull-down-Assays (Western Blot) nachgewiesen. Die Zellmotilität der Tumorzellen auf den unterschiedlichen Matrixproteinen wurde mit Zeitraffermikroskopie beobachtet. Um beteiligte Signalwege zu untersuchen, wurden die Signalmoleküle Src, PI3K und ROCK mit chemischen Inhibitoren gehemmt und das Migrationsverhalten Chemokin-stimulierter Zellen getestet.

Um chemotaktische Effekte durch SDF1 α und MIP3 β zu validieren, wurden die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 mittels blockierender Antikörper gehemmt. Die Migrationen der Zellen wurden signifikant reduziert. Die Stimulation der Zellen mit den Chemokinliganden zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Zellen. Es wurden sowohl Matrix- als auch konzentrationsabhängige Migrationen beider Zelllinien beobachtet. Die Rho-GTPasen Rho A, Rac und Cdc42 wurden in einer konzentrations- und matrixabhängigen Weise aktiviert. Es wurden aber auch integrinunabhängige Aktivierungen der Rho-GTPasen beobachtet. Des Weiteren konnte durch Inhibition von Signalmolekülen wie Src, ROCK und PI3K festgestellt werden, dass die Interaktionen von Chemokinen und Integrinen durch mehrere verlinkte Signalwege vermittelt werden. Zudem zeigten die hochmetastatischen MDA MB 231-Zellen effizientere chemotaktische Antworten im Vergleich zu den niedrigmetastatischen Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Chemokine bei der metastatischen Tumorzellmigration und Motilität in einer organspezifischen Weise eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. Die Verfügbarkeit von Chemokinrezeptoren auf den Zelloberflächen, sowie die Expression der Chemokinliganden in potentiellen Zielorganen, und die Interaktion der Tumorzellen mit geeigneten Komponenten der EZM scheinen für eine erfolgreiche Tumorzellextravasation bei der Metastasierung entscheidend zu sein.

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Weltweit erkrankten nach Schätzungen der WHO im Jahr 2000 über 1 Millionen Frauen an einem Mammakarzinom, ca. 370 000 verstarben daran. In Europa ging man von 350 000 Neuerkrankungen und 130 000 Sterbefällen aus (1). Schätzungen der Dachdokumentation Krebs des Robert Koch Instituts gehen jährlich von 47 500 Brustkrebserkrankungen in Deutschland aus. Im Jahr 2003 verstarben in Deutschland allein 17173 Frauen am Mammakarzinom (2). Dies bedeutet, dass ca. 24 % der Krebserkrankungen das Mammakarzinom sind und zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen darstellt. Die Inzidenz ist in Asien und Afrika gegenüber dem westlichen Europa und der USA wesentlich geringer (3).

Das invasive duktales (vom Milchgang ausgehend) Mammakarzinom tritt mit 70-80% am häufigsten auf, gefolgt vom invasiven lobulären (vom Drüsenlappen ausgehend) Mammakarzinom mit 10-15%. Als nicht maligne Vorstufen treten das intraduktales als auch das lobuläre In-situ-Karzinom auf (4, 5).

Die meisten Erkrankungen treten sporadisch auf, aber auch erbliche und erworbene Risikofaktoren spielen eine Rolle. Etwa 5 % der Erkrankungen am Mammakarzinom sind erblich bedingt. Mutationen in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* stellen ein Beispiel für genetische Prädisposition dar. Frauen, die Mutationen in einem dieser Gene erben, haben ein ca. 85 % hohes Risiko bis zum 70. Lebensjahr am Mammakarzinom zu erkranken (6).

Mutationen der Tumorsuppressorgene *p53* und *PTEN*, sowie *STK11* und *CDH1* (E-Cadherin) stellen weitere Risikofaktoren für das Mammakarzinom dar. Die Überexpression von Onkogenen wie Her-2/neu werden als prognostische Faktoren benutzt (5). Hormonelle Faktoren wie die Einnahme von Östrogen- und Progesteronhaltigen Medikamenten als Hormonersatztherapie in den Wechseljahren erhöhen das Risiko um bis zu 45% (7). Auch eine frühe Menarche, d.h. die erste Regelblutung unter 12 Jahren, und eine späte Menopause erhöhen die Wahrscheinlichkeit am Mammakarzinom zu erkranken (8). Die Einnahme von Kontrazeptiva stellt ein geringes Risiko dar. Die Exposition mit ionisierenden Strahlen unter 40 Jahren, Adipositas, Rauchen, Alkoholmissbrauch und Vitamin-D-Mangel stellen weitere Faktoren dar, die eine Erkrankung fördern könnten (5, 9, 10, 11).

Um eine Prognose für die Tumorerkrankung abzuschätzen, werden Faktoren wie Tumorstadium, Tumorgröße, histologischer Grad, Anzahl befallener Lymphknoten,

Proliferationsrate, Expression von Hormonrezeptoren und Onkogenen, sowie die Funktion von Tumorsuppressoren bestimmt. Bei Auftreten von Lymphknotenmetastasen und anderen Fernmetastasen, wenig differenzierten Tumoren, hohen Proliferationsraten und Hormonrezeptor-negativen Tumoren ist die Prognose schlecht. Früherkannte Tumore haben hingegen gute Prognosen.

Mammakarzinome bilden zu 70% Metastasen in den Lymphknoten, zu 50-70% in der Leber, den Lungen und den Knochen, zu 30-50% in der Nebenniere und seltener zu 10-30 % in den Nieren, der Haut und dem Gehirn (12).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei humane Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial untersucht. Die organspezifische Metastasierung des Mammakarzinoms in die Leber wurde in den Fokus dieser Studie gestellt.

1.2 Die organspezifische Metastasierung

Die Metastasierung von Tumoren stellt in 90% der Fälle die Haupttodesursache krebserkrankter Patienten dar. Während Primärtumore meistens chirurgisch entfernbar sind, sind Metastasen schwer zu behandeln. Der Prozess der Metastasierung involviert eine Reihe komplexer Prozesse und Interaktionen zwischen Tumorzellen und deren Mikroumgebung. Primäre Tumorzellen proliferieren unaufhörlich und streuen in umgebendes Gewebe aus. Die Adhäsion und das Austreten maligner Zellen in Blut- oder Lymphgefäße werden als Intravasation bezeichnet. Ein weiterer Schritt ist dann das Überleben und Ausbreiten in den Blut- oder Lymphgefäßen, gefolgt von der Extravasation aus der Zirkulation ins Gewebe. Die Tumorzellen müssen fähig sein, zuvor an die Gefäßwand zu adhären und dann ins Gewebe einzutreten und dort zu invadieren. Zuletzt müssen Tumorzellen sich im Zielorgan durch Neovaskularisierung eine oxidative Versorgung, sowie Nutrition und Detoxifikation und eine eigene Mikrozirkulation ab einer bestimmten Tumorgöße aufbauen und mit der Mikroumgebung interagieren, um z. B. der Apoptosis und der Immunantwort entgehen zu können (13, 14, 15, 16). Erst wenn alle Prozesse erfolgreich durchschritten wurden, kann eine Tumorzelle erfolgreich metastasieren.

Die meisten malignen Tumore zeigen ein organspezifisches Metastasierungsmuster. Der englische Chirurg Stephen Paget postulierte 1889 seine „seed and soil“-Theorie, die

besagte, dass die organspezifische Metastasierung von Tumorzellen („the seed“) von der Mikroumgebung („the soil“) in bestimmten Organen abhängig ist. Dem nach erfolgte nur Metastasierung wenn die Tumorzellen mit der Mikroumgebung im Zielorgan interagieren konnten (17). Es wurde eine Reihe von Studien durchgeführt, um diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen. Der Metastasierungsprozess wird von einer Reihe verschiedener Faktoren beeinflusst, so z.B. von Zelloberflächen-Eigenschaften der Tumorzellen (18, 19, 20), von organspezifischen chemotaktischen Faktoren, von der Adhäsion der Tumorzellen mit der Mikroumgebung der Zielorgane und Antworten auf gewebsspezifische Wachstumsfaktoren (21). Andere Arbeitsgruppen fanden heraus, dass es präexistente Tumorsubpopulationen mit spezifischen metastatischen Eigenschaften gibt, die durch die Organumgebung an den Ort der Metastasenbildung gelenkt werden (22-23). Die Mikroumgebung beeinflusst das Tumorwachstum, des Weiteren exprimieren die Endothelzellen in den Organen verschiedene Zelloberflächenrezeptoren und Wachstumsfaktoren, die den metastatischen Phänotyp beeinflussen. Greene und Harvey (24) und die Arbeitsgruppe von Auerbach (25) fanden, dass verschiedene Tumore unterschiedliche Adhäsionseigenschaften an Endothelzellen und Präferenzen zu bestimmten Endothelzellen zeigten, die vom Ursprungs- und Zielorgan abstammten. James Ewing (1928) focht die Theorie von Paget an. Nach ihm würde sich die Organspezifität rein nach mechanischen Faktoren und der Struktur des Gefäßsystems richten (17). Nur Subpopulationen von Tumorzellen klonalen Ursprungs hätten die Fähigkeit den Scherkräften der Zirkulation zu überstehen. Fidler und Kripke (26) konnten wiederum die Theorie von Paget in ihren Experimenten mit murinen B16 Melanomzellen bestätigen. Die charakteristischen Eigenschaften der Tumorzellen plus die Mikroumgebung der Wirtsorgane bestimmten den Ort der Metastasierung. Betrachtet man die gesamte Tumorzellpopulation, so zeigt diese eine Heterogenität in der Genexpression, verursacht durch genomische Instabilität, Anhäufungen von Mutationen und anderen genetischen Aberrationen. Einige Arbeitsgruppen vermuten, dass genetische Veränderungen während der initialen Phase der Tumorentwicklung bereits die metastatische Entwicklung vordefinieren. Ein weiterer beobachteter Entwicklungsschritt ist die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Durch Herunterregulierung von E-Cadherin und der nukleären Lokalisation von β -Catenin kommt es zu veränderten Adhäsionseigenschaften und einer erhöhten Invasion und Motilität der Tumorzellen (17). Durch diesen Prozess sind Tumorzellen fähig auch ohne Matrix-Degradation das Gewebe zu invadieren. Die Mikroumgebung im Ursprungs- und Zielorgan, d.h. die Interaktion mit Fibroblasten, Endothelzellen, immunkompetenten Zellen und der Extrazellulären Matrix (EZM), kann, wenn verändert, die Tumorentwicklung fördern und zum Prozess der Metastasierung beitragen (27). Die Interaktion von Tumorzellen mit Makrophagen kann

die Tumorzell-Motilität und die vaskuläre Intravasation induzieren (28). Des Weiteren konnten Forscher feststellen, dass primäre Tumore die Mobilisierung von Knochenmarks-abstammenden Zellen in die Zielorgane induzierten und prämetastatische Nischen erzeugten (29). Durch Ausschüttung bestimmter Wachstumsfaktoren oder Zytokine werden Knochenmarksvorläuferzellen und myeloide Zellen in die Zielorgane angelockt und stellen wie auch Krebsstammzellen Nischen dar, wo ausgestreute Tumorzellen die Metastasenbildung induzieren können. Des Weiteren wurde eine besondere Rolle der Chemokine bei der Lenkung von Tumorzellen zu den Zielorganen gefunden.

1.3 Die Rolle der Chemokine bei der organspezifischen Metastasierung

Die organspezifische Metastasierung wird durch viele Faktoren bestimmt. Es hat sich gezeigt, dass Chemokine von den Tumorzellen genutzt werden, um zu ihren Zielorganen zu gelangen. Bei der Extravasation können die Tumorzellen hapto- und/oder chemotaktisch stimuliert werden. Chemotaktische Moleküle, wie Chemokine und deren Rezeptoren spielen bei diesem organspezifischen Schritt der Kolonisation eine wichtige Rolle (30, 31). Hierbei erfolgt die Regulation der Chemotaxis und der transendothelialen Migration vergleichbar zu Leukozyten während Immun- und Entzündungsreaktionen (32), wobei jedoch deutliche Unterschiede in den beteiligten Adhäsionsmolekülen bestehen.

Beim Mammakarzinom sind besonders häufig die Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4, CCR5, CCR6 und CCR7 überexprimiert. Diese Expressionsmuster korrelieren mit der Verfügbarkeit von Chemokinliganden in der Leber (33). Zum Beispiel weisen SDF1 α /CXCL12 und 6CKine/CCL21 ihre größten Expressionslevel in den Organen auf, die Hauptmetastasierungsorte beim Mammakarzinom darstellen. Diese sind vor allem Leber, Lunge, Knochenmark und Lymphknoten (34, 35). Organspezifische Endothelzellen und Gewebsmakrophagen, wie z. B. die Kupffer-Zellen der Leber, stellen wichtige Quellen der Chemokine in diesen Organen dar, um die metastatische Tumorzellextravasation zu vermitteln (36). So konnten die eigene und andere Arbeitsgruppen durch Inhibierung von CXCR4 mittels siRNA oder neutralisierenden Antikörpern eine reduzierte Migrationsrate verschiedener Karzinomzellen in vitro und in vivo in der Mikrozirkulation der Leber beobachten (35, 37, 38). Die Chemokine und ihre Rezeptoren spielen dabei eine wichtige Rolle bei der Tumorzelladhäsion an das Endothel, bei der Extravasation und Migration, beim Wachsen und Überleben sowie bei der Bildung von Mikrometastasen und bei der Angiogenese (39).

Die Familie der Chemokine besteht aus kleinen Molekülen, die von verschiedenen Zelltypen des Körpers gebildet werden. Zurzeit sind mehr als 50 Chemokine und 18

Chemokinrezeptoren identifiziert wurden, wobei mehrere Chemokine an einen Rezeptor binden können und Chemokinrezeptoren mit mehreren Chemokinen interagieren können (40). Bei den Chemokin-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Sieben-Transmembran-Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden (41). Die Chemokine werden strukturell und funktionell in verschiedene Subgruppen unterteilt. Strukturell werden sie in vier Klassen unterteilt: CXC, CC, C und CX₃C. Die Einteilung gründet auf das Vorhandensein von zwei konservierten am Amino-terminalen Ende des Proteins lokalisierten Cystein-Resten, die entweder direkt benachbart sind (CC) oder von einer oder mehreren anderen Aminosäuren getrennt werden (CXC, CX₃C). Bei den C-Chemokinen fehlt das erste und dritte Cystein (34). Die CXC-Chemokine werden weiterhin unterteilt in solche mit ELR-Motif (Glu-Leu-Arg) und solche ohne. Chemokine mit ELR-Motif fördern die Angiogenese, die ohne ELR-Motif nicht. Funktionell werden die Chemokine zu den Entzündungs- oder zu den homeostatischen Chemokinen zugeteilt (34). Inflammatorische Chemokine fördern hauptsächlich die Beförderung der Leukozyten zu Entzündungsorten, währenddessen die homeostatischen Chemokine dauerhaft in den Lymphorganen exprimiert werden und die Wanderung der Leukozyten zu den blutbildenden Organen vermitteln (42, 43, 44, 45). Des Weiteren haben Chemokine eine wichtige Funktion bei der Entwicklung, der Organisation und Funktion des Immunsystems und bei der Gewebeerneuerung (46).

1.3.1 Die Funktion von CXCR4/SDF1 α

Wissenschaftliches Interesse am CXCR4/SDF1 α -Paar wurde erweckt, als CXCR4 als Korezeptor für den Eintritt von HIV-Viren in CD4⁺ T-Zellen entdeckt wurde (46).

Der Chemokinrezeptor CXCR4 und dessen Ligand CXCL12/SDF1 α spielen des Weiteren eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Tumorzellen. Es konnte gezeigt werden, dass in einigen Tumortypen, epithelialen, mesenchymalen und hämopoietischen Ursprungs, Chemokinrezeptoren wie CXCR4 überexprimiert werden, hingegen in gesundem Gewebe konnte keine bzw. nur eine schwache Expression gefunden werden (39, 47). Besonders die Rolle von CXCR4/SDF1 α im Mammakarzinom wurde sehr intensiv untersucht. Es konnte in einigen Studien festgestellt werden, dass CXCR4/SDF1 α die Tumorzellmigration und Invasion fördern (30, 32, 35, 37, 48). Das Mammakarzinom metastasiert, wie bereits erwähnt, organspezifisch meist in die Lungen, Leber, Lymphknoten und das Knochenmark, Organe die SDF1 α hauptsächlich exprimieren (35, 41). In diesen wird SDF1 α von stromalen Fibroblasten sekretiert. Stroma-Fibroblasten

machen einen Großteil der zellulären Mikroumgebung im Mammakarzinom aus. Im normalen Brustgewebe können keine vergleichbaren SDF1 α -Levels nachgewiesen werden. Die Ausschüttung des Chemokinliganden fördert die Progression und das Tumorwachstum, sowie die Tumorangiogenese durch das Anlocken von Endothel-Vorläuferzellen (46). Bei der Chemokin-induzierten Zellmigration werden zelluläre Prozesse aktiviert wie die Kalzium-Mobilisierung, die Aktinpolymerisierung und chemotaktische Antworten von metastatischen Zellen (35). Zusätzlich werden multiple Signalkaskaden aktiviert, die das invasive Verhalten von Tumorzellen fördern wie z.B. der MAPK-Signalweg, der PI-3K/Akt-Signalweg und der Janus Tyrosinkinase 2 und 3 Signalweg (39).

1.3.2 Die Funktion von CCR7/MIP3 β

Ein weiterer wichtiger Vertreter der Chemokinfamilie bei der Tumormetastasierung ist CCR7 und die Liganden MIP3 β /CCL19 und 6CKine/CCL21, die konstitutiv von lymphatischen Endothelzellen gebildet werden (49, 50). CCR7 spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von aktivierten Dendritischen Zellen zu nahe liegenden Lymphknoten (51), des Weiteren wird CCR7 wie CXCR4 in Mammakarzinomzellen, Primärtumoren und Metastasen hoch exprimiert. Ligandenbindung an den Rezeptor führt zu chemotaktischen und invasiven Antworten wie z.B. der Aktinpolymerisierung und der Pseudopodienbildung (35, 52) sowie die Induktion eines Ca²⁺-Stroms, durch dem die Funktionalität des Rezeptors gemessen werden kann. Einige andere Tumortypen wie Ösophaguskrebs, nichtkleinzelligen Lungenkrebs, Kopf- und Nackentumore und Melanoma (52) zeigen ebenfalls hohe CCR7-Expressionslevel. Im Gegensatz zur organspezifischen Metastasierung durch CXCR4/SDF1 α , fördert die Überexpression von CCR7 auf den Tumorzellen und die Freisetzung von 6CKine/CCL21 und MIP3 β /CCL19 die Bildung von Lymphknotenmetastasen (35, 52, 53). SDF1 α und 6CKine mögen synergistische Effekte haben, da beide Chemokine in den Lymphknoten stark exprimiert werden und chemotaktische Wirkungen auf Tumorzellen haben (35). In MCL-B-Zellen (Mantel-Zell-Lymphoma) konnte durch SDF1 α eine chemotaktische Antwort und zusätzlich die Modellierung anderer Chemokinrezeptoren beobachtet werden, wie z.B. von CCR7 (54). Die Aktivierung des CCR7-Rezeptors führt zur Aktivierung weiterer Signalwege wie z.B. des PI3-Kinase/Akt Signalwegs (55, 56), der eine wichtige Rolle beim Zellwachstum, der Migration und Überleben spielt. Es konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden, dass die Stimulation von CCR7 zur Aktivierung von Akt/PKB in Tumorzellen führt und somit apoptotische Signalwege gehemmt wurden (57).

1.4 Die Rolle von Chemokinen und Integrinen bei der Tumorzellmigration

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Interaktionen zwischen Chemokinen und Integrinen während der chemotaktischen Tumorzellextravasation einen „outside-in“ Signalprozess induzieren, der eine stärkere Zellmotilität und folglich eine schnellere Extravasation zu bewirken scheint, was mit dem metastatischen Potenzial verschiedener Tumorzellen korreliert. Da die Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix (EZM) organspezifisch ist (58), scheinen Wechselwirkungen zwischen Integrinen und Chemokinrezeptoren eine entscheidende Rolle bei der organspezifischen Kolonisation durch metastasierende Tumorzellen zu spielen. In metastatischen Zielorganen werden Chemokine auf verschiedenen Wegen, aber auf organspezifischer Weise präsentiert.

Tumorzellinteraktionen mit dem Endothel und der subendothelialen EZM sind weitere entscheidende Faktoren, die die Organpräferenz bei der Metastasierung wesentlich bestimmen. Die Interaktionen der Tumorzellen mit der umgebenden EZM treten im gesamten Verlauf der Metastasierung auf, von der Invasion der Tumorzelle und deren Lösung vom Primärtumor bis zur Extravasation und Interaktion mit dem Mikromilieu im metastatischen Zielorgan (59). Da die Leber präferentielles Metastasierungsorgan zahlreicher Tumorentitäten, wie z. B. des Mammakarzinoms, ist, stehen diese Interaktionen im wissenschaftlichen Interesse dieser Arbeit. In Lebersinusoiden können zirkulierende Tumorzellen direkten Kontakt zur EZM des Dissé-Raumes haben, da die Mikrogefäße der Sinusoide durch eine diskontinuierliche Endothelzellschicht charakterisiert sind (60). Mittels Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie konnte die Arbeitsgruppe von J. Haier zeigen, dass die Bildung von Lebermetastasen durch direkte Integrin-vermittelte Interaktionen der Tumorzellen mit der stromalen EZM der Leber ermöglicht wird (61, 62). Fibronektin und Kollagen Typ IV scheinen in der Leber eine entscheidende Matrix für den initialen Tumorzellarrest zu sein, wohingegen Typ I Kollagen-Fasern vom Dissé-Raum zwischen die Hepatozyten ins Leberparenchym ziehen und die Extravasation von verschiedenen Tumorzellen zu lenken scheinen (36, 58).

1.5 Die Extrazelluläre Matrix und Integrine

Um leberspezifische Prozesse bei der Organmetastasierung zu untersuchen, wurden die Tumorzellen auf den Matrixproteinen Typ I Kollagen und Fibronektin, die bei der Tumorzelladhäsion und Extravasation in der Leber involviert sind, und zum Vergleich auf Laminin, welches nur in geringen Mengen in der Leber vorkommt, gesetzt. Aufgrund einer

fehlenden Basallamina in der Leber werden Laminin und Typ IV Kollagen nur in geringen Mengen exprimiert und scheinen daher nicht entscheidend bei der Organmetastasierung in der Leber zu sein.

Die EZM dient zur Formgebung von Geweben und schützt vor Druckkräften. Des Weiteren spielt die EZM eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, dem Zellüberleben, der Polarität und dem Zellverhalten. Die Matrix besteht aus Proteinfasern, die die Form bestimmen und als Substrat für adhärente Zellen dienen und aus Glykosaminoglykan-Ketten, die vor Druckkräften schützen. Zu den wichtigsten Proteinen gehören Kollagene, Fibronectin, Laminin und Elastin sowie Proteoglykane. Die Proteoglykane werden unterteilt in Hyalurone, Chondroitinsulfate und Dermatan-sulfate, in Heparan- und Keratansulfate (63).

Kollagene sind die Hauptgruppe der Proteine in der EZM. Sie machen bis zu 25% der Gesamtproteinmasse im Körper aus. Bisher wurden 20 verschiedene Kollagentypen gefunden, die Hauptvertreter sind die Typen I, II, III, V und XI. Sie werden im Bindegewebe, Haut und Knochen exprimiert. Typ I Kollagen stellt wiederum mit 90% aller Kollagene im Körper mengenmäßig den wichtigsten Kollagentyp dar. Kollagene sind dreisträngige helikale Moleküle, die zu Fibrillen angeordnet werden.

Fibronectin und Laminin sind große multidomäne Matrixglykoproteine. Laminine sind heterotrimere Moleküle aus einer α - β - und γ -Kette, die durch Disulfidbrücken zu einer asymmetrischen kreuzförmigen Struktur angeordnet sind. Aus der Kombination von fünf α -Polypeptidketten, drei β -Polypeptidketten und zwei γ -Polypeptidketten sind 11 Laminin-Isoformen (Laminine 1-11) bekannt. Laminine sind neben Typ IV Kollagen, Nidogen und Perlecan Hauptbestandteil der Basallamina, die von Tumorzellen infiltriert werden muss um ins Blut- oder Lymphgefäßsystem zu gelangen. Laminin-1 (α 1, β 1, γ 1) wird hauptsächlich in der epithelialen Basallamina exprimiert und wurde ursprünglich aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor isoliert (64, 65). Die Hauptfunktion ist das Kontrollieren des Zellverhaltens durch Interaktion mit Integrinen.

Fibronectin besteht aus zwei Molekülen, die an einem Ende durch eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden. Die Polypeptidketten bestehen aus mehreren Domänen, die wiederholt angeordnet werden. Über die Typ III Fibronectin (FN III)-Wiederholungen bindet Fibronectin an Integrine. Diese Domäne ist die am meisten gemeinsam auftretende Domäne in Vertebraten. Die Tripeptid-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) wurde in einer der FNIII-Wiederholungsdomänen gefunden und stellt eine wichtige Bindungsstelle zu Zellen dar. Die RGD-Sequenz wird auch von anderen Proteinen

exprimiert. Fibronectin ist ein wichtiges Adhäsionssubstrat und spielt eine wichtige Rolle bei der gerichteten Migration in der Embryonalentwicklung.

Typ I Kollagen, Laminin-1 und Fibronectin interagieren über verschiedene Integrine mit den Zellen und beeinflussen das Zytoskelett, das Zelladhärenzen, Zellspreading und Zellverhalten (63).

1.5.1 Integrine

Die Integrine gehören zur Familie transmembraner Heterodimere, die aus zwei nicht kovalent gebundenen Untereinheiten, der α - und β -Untereinheit, bestehen. Kombinationen aus 15 α - und 9 β -Untereinheiten bilden Integrinmoleküle, die ein breites Spektrum an Interaktionen zwischen Zellen und der EZM vermitteln (66). Sie leiten Signale von der EZM ins Zellinnere und umgekehrt (67). Jede Untereinheit besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembranregion und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Die Ausnahme besteht bei $\beta 4$, die eine lange intrazelluläre Domäne aufweist. Integrine werden von einer Vielzahl an Zelltypen exprimiert und agieren als Rezeptoren für EZM-Proteine wie z.B. Typ I Kollagen, Fibronectin, Laminin, Vitronectin und Fibrinogen durch das RGD-Motiv (68). Nach dem Binden eines Integrins an dessen Liganden in der Matrix, bindet der zytoplasmatische Teil der β -Untereinheit an bestimmte intrazelluläre Ankerproteine wie z.B. Talin, α -Actinin und Filamin. Diese Proteine stellen eine direkte Verbindung zu Aktinfilamenten her oder binden an andere Proteine wie Vinculin. Die Aktivierung von Integrinen führt zur Clusterung dieser und zur Bildung von Fokalen Adhäsionen (63) und Aktivierung von Signalkaskaden. Integrine sind des Weiteren involviert in Zellwachstum und Differenzierung, sowie in Zellmigration, Invasion und Intra- und Extravasation bei der Metastasierung (67). In Tumoren sind die Verteilung der Integrine und die Typexpression oft im Vergleich zum gesunden Gewebe verändert.

1.6 Die Funktion der Extrazellulären Matrix bei der Tumorzellmigration

Die Zellumgebung ist eine wichtige Quelle für verschiedene Signale, z.B. für die Reproduktion, die Zellteilung, den Zellzyklus-Arrest, die Apoptosis, die Migration bei der Wundheilung, bei der embryonalen Entwicklung, für Zell-Zell-Kontakte und bei der Adhäsion an die EZM (69, 70, 71). Die Interaktion von Zellen mit der EZM spielt eine wichtige Rolle bei der Migration in Normalgeweben und während der Tumorprogression.

Bei der Krebsentwicklung erhalten Tumorzellen eine erhöhte Fähigkeit zu wandern und durch die Basalmembran in umliegendes Gewebe zu invadieren. Dabei kommt es zu signifikanten Änderungen in der Zellmorphologie, den Interaktionen mit der EZM und strukturelle Umlagerungen (72-75). Sowohl Einzelzellmigration als auch kollektive Migration sind charakteristisch in vielen Tumortypen (76). Die Differenzierung vom epithelialen zum mesenchymalen Migrationstyp (EMT) stellt einen wichtigen Prozess bei der Tumorzellmigration dar. Die mesenchymale bzw. fibroblastenartige Migration bedeutet den Vorschub der Zellfrontseite durch Aktinpolymerisierung, die Bildung von Adhäsionskontakten, die Translokation des Zellkörpers via Kontraktion der Aktin-Myosin-Fibrillen und folgenden Abbau der Adhäsionen am Zellende und letztlich die Retraktion des Zellendes. Der Umbau des Zytoskeletts ist unter strenger Kontrolle externer Faktoren wie z. B. von Signalen der EZM, Wachstumsfaktoren und intrazellulären Regulatoren den Rho-GTPasen (77). Um die Ausbreitung von metastatischen Tumorzellen ins Gewebe der Zielorgane zu gewährleisten, sind Tumorzellen fähig die EZM umzubauen bzw. zu degradieren. Die erhöhte Expression von Metallomatrixproteasen im vorderen Bereich der Zelle, erleichtert das Durchwandern der Zelle (78, 79). Bei der Migration auf einem Substrat werden fokale Adhäsionen ausgebildet, dies sind hochspezialisierte Strukturen, die die Verbindung zwischen Zytoskelett und EZM darstellen (80). Es sind mehr als 50 Proteine bei der Adhäsion an die EZM assoziiert. Diese Proteine lassen sich in drei Gruppen unterteilen, zur ersten Gruppe gehören die Integrine, die die Verbindung zwischen Zytoskelett und EZM darstellen. Der zweiten Gruppen gehören Proteine an, die am zytoplasmatischen Teil der Adhäsionskomplexe lokalisiert sind. Dazu gehören z.B. Tensin, Vinculin, Paxillin, α -Actinin und andere Moleküle mit strukturellen und regulatorischen Funktionen. Die letzte Gruppe bilden die Tyrosinkinase, Serin/Threoninkinase, Tyrosinphosphatasen und Regulatoren der GTPasen, die die Signale ins Zellinnere weiterleiten und regulieren (81). Des Weiteren werden drei Adhäsionsstrukturen unterschieden. Fokale Komplexe sind kleine punktförmige und kurzlebige Adhäsionen an das Substrat von 0,5 – 1,0 μm . Deren Bildung ist abhängig von der Aktivität von Rac und Cdc42 und charakteristisch für hoch motile Zellen wie Keratozyten und Melanoma B16-Zellen (82-84). Diese Strukturen existieren einige Minuten und dissoziieren dann oder bilden sich zu den Fokalen Kontakten um. Diese sind ovale Strukturen von 3–10 μm und sind mit den Enden der Mikrofilamentbündel assoziiert. Reguliert werden Fokale Kontakte durch Rho, existieren ca. 10-120 min und sind typisch für langsame Zellbewegungen (82, 83, 85). Die Proteinzusammensetzung von Fokalen Komplexen und Fokalen Kontakten ist gleich, jedoch variieren die Level an Aktivierungen und Phosphorylierungen beteiligter Proteine. Bei Tumorzellen, aber auch Monozyten und Makrophagen, wurden sog. Podosomen entdeckt. Diese Strukturen fördern die Adhäsion

an die EZM, die Migration entlang der EZM und die Degradation dieser. Charakteristisch sind diese Strukturen für schnelle Migration (86) und weisen neben Integrinen Matrixmetalloproteinasen und den Arp2/3 Komplex auf, die die Migration fördern. Des Weiteren sind Podosomen kurzlebig und können in wenigen Minuten auf- und abgebaut werden (87). Während der Tumorprogression wurde *in vitro* beobachtet, dass das Zellspeading auf dem Substrat abnahm, Aktinstressfasern verschwanden und die Anzahl an Fokalen Kontakten abnahm, während die der Fokalen Komplexe zunahm. Bei der Tumorzellinvasion sind die Zellen fähig auch ohne Kontakt zur EZM zu überleben. Die Expression und Phosphorylierung der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) ist erhöht, was zu einem invasiveren Phänotyp führt. Eine Reihe anderer Proteine der Fokalen Adhäsionen werden überexprimiert wie z. B. Paxillin.

Der beschleunigte Auf- und Abbau der Fokalen Kontakte führen zu einer erhöhten Invasionseigenschaft von Tumorzellen. Ein weiterer Aspekt ist die Umwandlung vom fibroblasten-/mesenchymalartigen Migrationstyp zum amöboiden, genannt Mesenchymal-amöboide Transition (MAT). Die Zellen weisen eine runde oder elipsenartige Zellmorphologie auf, die Expression der Matrixmetalloproteinasen ist reduziert, es findet kein Umbau von fokalen Adhäsionen mehr statt und die Adhäsion ist reduziert (76). Die Zellen bewegen sich amöbenartig über die Matrix, wobei ein Abbau dieser nicht mehr nötig ist und somit die Migrationsgeschwindigkeit erheblich erhöht wird. Veränderungen des Abbaus der EZM und die veränderte Zusammensetzung dieser, führen zusätzlich zu einem bevorzugten Migrationstyp von Tumorzellen (74, 88). Hohe Mengen an Fibronectin wurden im Zusammenhang mit Lymphknotenmetastasierung beim Mammakarzinom gefunden (88) und eine erhöhte Expression von Laminin-8 förderte das Überleben von Tumorzellen nach Chemotherapie. Strukturelle Veränderungen der Zell-Matrix-Adhäsionen während der Krebsentstehung äußern sich in veränderten Zellmorphologien von Tumorzellen, veränderten Zytoskelettstrukturen und Veränderungen der Fokalen Kontakte, sowie einer veränderten EZM-Zusammensetzung. Diese Veränderungen des Zytoskeletts werden zum Teil von den kleinen Rho-GTPasen reguliert.

1.7 Die Familie der kleinen Rho-GTPasen

Die Familie der kleinen Rho-GTPasen besteht aus 20 Mitgliedern bei den Säugetieren, sieben bei *Drosophila melanogaster*, fünf bei *Caenorhabditis elegans* und 15 bei *Dictyostelium discoideum* (89). Sie sind verwandt mit den Ras-Proteinen, aber dem besonderen Interesse wird hier den GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 gewidmet. Es handelt sich dabei um 21 kDa große Proteine, die im aktivierten Zustand GTP binden

und im inaktiven Status GDP (90-92). Das Binden an GTP wird durch die Rho-Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktoren (Rho-GEFs) gefördert, währenddessen der Wechsel zum GDP-gebundenem Zustand durch Rho-GTPase-aktivierende Proteine (Rho-GAP) katalysiert wird (93). Zusätzlich werden die GTPasen durch das Binden an Rho-GDP-Dissoziierungs-Inhibitoren (Rho-GDI) reguliert, dabei werden GDP-gebundene Rho-Proteine ins Zytoplasma abgesondert und somit dem GTP-GDP-Zyklus ferngehalten (93-96). Durch den Zyklus zwischen GTP- und GDP-gebundenem Zustand werden zelluläre Prozesse kontrolliert und reguliert wie z.B. die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und Änderungen in der Gentranskription (90). Im aktiven Zustand können die Rho-Proteine mit einer Reihe von Effektorproteinen interagieren und deren Aktivität und/oder Lokalisation verändern. Durch ihre Funktion als Regulatoren des Aktinzytoskeletts spielen die Rho-GTPasen eine wichtige Rolle bei der Zellmigration. Während RhoA den Aufbau von kontraktile Aktinmyosinfilamenten reguliert, sind Rac und Cdc42 an der Regulation der Aktinpolymerisierung beteiligt, um periphere Lamellipodia und Filopodia auszubilden. Zusätzlich sind alle drei Rho-GTPasen am Aufbau von Integrin-vermittelten Matrixadhäsions-Komplexen beteiligt (97-99). Die Ausbildung von Lamellipodia, der Auf- und Abbau alter und neuer Adhäsionskomplexe sowie die Kontraktion der Zelle sind wichtige Mechanismen bei der Zellbewegung, die durch Rho, Rac und Cdc42 reguliert werden. Die Aktivierung von Rho führt zur Bündelung von Aktinfilamenten zu Stressfasern und zur Clusterbildung von Integrinen und anderen Proteinen in Fokalen Adhäsionskomplexen. Rho fördert weiterhin den Zusammenbau von kontraktile Aktinmyosinfilamenten, die Zellkontraktion und die Retraktion des Zellendes. An diesen Prozessen sind zwei Effektoren von Rho beteiligt, die Serin/Tyrosin-Kinase p160ROCK und mDia. Über Interaktionspartner von mDia, die zur Aktinpolymerisierung und der Stabilisierung von Mikrotubuli führen, ist wenig bekannt. Die Stabilisierung der Aktinfilamente in den Aktin-Myosin-Filamentbündeln wird durch p160ROCK vermittelt. Dies geschieht über die Aktivierung der LIM-Kinase und folgender Inaktivierung von Cofilin (100). Des Weiteren interagiert p160ROCK mit und phosphoryliert die Myosin-Binde-Untereinheit (MBS) der Myosin-Leichtketten-Phosphatase und inaktiviert dadurch diese (101). Die erhöhte Myosinphosphorylierung führt zur Kreuzverlinkung der Aktinfilamente und erzeugt somit kontraktile Kräfte, die zur Fortbewegung der Zelle nötig sind (102).

Rac hingegen fördert die Ausbildung von Lamellipodia und Membranruffles und Cdc42 reguliert die Bildung von Filopodia und sog. Microspikes. Des Weiteren ist Cdc42 für die Zellpolarität verantwortlich (90). Rac und Cdc42 regulieren die Aktinpolymerisierung durch WASp/Scar/WAVE Proteine, während Cdc42 WASp und N-Wasp direkt aktiviert, werden die Scar/Wave-Proteine indirekt durch Rac aktiviert. Beides führt zur Aktivierung des

Arp2/3-Komplexes und somit zur Initiierung der Aktinpolymerisierung (103, 104). Rac und Cdc42 aktivieren des Weiteren die Serin/Tyrosin-Kinase p65PAK, die beim Umbau Fokaler Adhäsionen involviert ist, um eine effiziente Migration zu fördern. Die aktivierte p65PAK phosphoryliert und aktiviert die LIM-Kinase, was zur Phosphorylierung und Inaktivierung von Cofilin führt, resultierend in der Aktin-Stabilisierung und Aktin-Polymerisierung (91). Bei der Zellmigration ist die höchste Rac-Konzentration im vorderen Bereich der Zelle lokalisiert, hingegen ist Rho im Zellkörper und am Zellende angereichert (105). Bisher wurden zwei Signalwege, bei denen die Rac-Aktivierung involviert ist, besonders intensiv untersucht. Die PI3-Kinase und deren Lipidprodukt PI(3, 4,5)P₃ sind verwickelt in Zellmigrationsprozesse (106). Die Produktion von Phosphoinositollipiden (PIP₃) führt zu einer erhöhten Rac-Aktivierung in vielen Zelltypen. Eine dauerhafte Aktivierung der PI3-Kinase in Fibroblasten erzeugte extensive Ausbildungen von Lamellipodia und Membranruffles durch Rac-Aktivierung. Es zeigte sich, dass die PI3-Kinase an Rho/Rac-vermittelten Zytoskelett-regulierenden Signalwegen beteiligt ist, nicht aber an Rho/Rac-vermittelten Gentranskriptions-Signalwegen (107). Die PI3-Kinase ist in der migrierenden Zelle an der Frontseite lokalisiert, wohingegen deren Antagonist PTEN an der Rückseite (108), was essentiell für die Chemotaxis ist. Die Bindung von Rac an GTP wird durch den Rac-GEF Faktor Vav gefördert, der an Phospholipide binden kann (109). Die Interaktion zwischen Lipidkinasen und Rho-GTPasen wird durch das Binden der Phospholipide an die PH (Pleckstrin Homologie)-Domänen der Rho-Familie GEF vermittelt (107). Eine Interaktion der PI3-Kinase mit Rac fördert zudem die Bildung von PIP₃, was auf einen positiven Feedback-Loop zwischen beiden Molekülen schließen lässt (110).

Ein weiterer Signalweg, der zur Rac-Aktivierung führt, involviert die Proteine DOCK180, Crk-p130Cas und ELMO, die durch Komplexbildung den GTP-gebundenem Zustand von Rac herbeiführen (111, 112). Die Arbeitsgruppe Gu et al. konnte eine erhöhte Komplexbildung von p130Cas und Crk zeigen, wenn Zellen auf Laminin 10/11 adhärten, nicht aber auf Fibronectin. Dies führte weiterhin zur erhöhten Assoziation von DOCK180, ein GEF für Rac, und erhöhten Rac-Aktivierung. Die Aktivierung von Rac hemmte hingegen die Rho-Aktivierung, die durch Adhäsion auf Fibronectin gefördert wurde (113). Rac fördert E-Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsionen und hemmt die Migration von Epithelzellen (114). Rho vermittelt eine fibroblastenartige Zellmorphologie und fördert die Zellmotilität (115). Wird Rho gehemmt, stellt sich wiederum eine epitheliale Zellmorphologie ein (116). Weiterhin konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass die Hemmung von ROCK, einen Effektor von Rho, zur Bildung von Membranruffles führte, d.h. Rac aktiviert wurde (117). Die Balance zwischen Rho- und Rac-Aktivierung scheint die Zellmorphologie und das Migrationsverhalten von Zellen zu bestimmen. Die

Arbeitsgruppe Tsubouchi et al. (118) konnte zeigen, dass die Phosphorylierung von Tyrosin 31/118 von Paxillin, ein Protein im Adhäsionskomplex, die Rho-Aktivität bei der Adhäsion und Migration hemmte und das Membranruffling förderte. Des Weiteren stellten sie fest, dass phosphoryliertes Paxillin an p120RasGAP bindet und dieses wiederum mit p190RhoGAP interagiert und die Rho-vermittelte Stressfaserbildung hemmt. In einer anderen Untersuchungsreihe konnte beobachtet werden, dass dieser Komplex aus Paxillin-p120RasGAP und p190RhoGAP an der Vorderseite der Zellen lokalisiert war und freie ungebundene p190RhoGAP-Moleküle die Rho-Aktivität stärker reduzieren konnten (119). Andere Arbeitsgruppen konnten zusätzlich die Rolle der Tyrosinkinase Src in diesem Prozess nachweisen. C-Src phosphoryliert p190GAP und führt so zur Inaktivierung von Rho (120). Nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor EGF (epithelial growth factor) bildeten Fibroblasten Membraneruffles innerhalb weniger Minuten aus. Dies führte zur Komplexbildung von RasGAP und p190RhoGAP und resultierender Inaktivierung von Rho mit folgendem Abbau der Aktinfilamente. Um den Rho-Signalweg genauer zu analysieren, wurde der Einfluss der Hemmung von Rho durch die C3 Transferase und die Hemmung des Effektors ROCK durch Y27632 auf LPA-stimulierte Zellen untersucht (121). Die Hemmung von ROCK führte zum Abbau von Stressfasern und Fokalen Adhäsionen, aber zur Ausbildung von Membraneruffles. Des Weiteren konnte eine Hemmung der Paxillin- und FAK-Phosphorylierung festgestellt werden, nicht aber der Cas-Phosphorylierung (117). Der Einsatz einer mDia-Mutante, ein weiterer Effektor von Rho, induzierte kein Membranruffling. Diese Ergebnisse weisen auf eine Rho-abhängige Rac-Aktivierung hin, die durch mDia vermittelt wird und antagonisiert durch ROCK. Ein weiterer Aspekt der Regulierung der Rho-Signalwege ist, dass hohe bzw. niedrige Level an Rho-GTP den einen oder anderen Signalweg aktivieren. Bei geringen Rho-GTP-Mengen wurde der mDia-Signalweg aktiviert, währenddessen bei hohen Rho-GTP-Mengen der ROCK-Signalweg (121, 122). Basale Rho-Aktivierung ist essentiell für die Zellmigration und für das Zellspreading (122). Die Aktivierung von Rho und Rac sind zeitlich und räumlich reguliert. Während mDia in Membraneruffles von motilen Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde ROCK im hinteren Teil der Zelle lokalisiert. Eine weitere Rolle des Rho-ROCK-Signalweges wurde bei der positiven Regulation der Aktivität der Lipidphosphatase PTEN, dem Antagonisten der PI3-Kinase, nachgewiesen (123, 124)

1.7.1 Rho-GTPasen und Krebs:

Studien haben gezeigt, dass die Rolle der Rho-GTPasen in der Tumorgenese nicht durch deren Mutationen erfolgen, sondern durch Veränderungen in der Expressions- und/oder Aktivierungslevel der Rho-GTPasen und deren Effektoren und Regulatoren (125). Abweichende Expressionen in humanen Tumoren wurden bei Rho A, B, C; Rac 1, 2, 3; Rho G; Cdc42 und Rnd3/Rho E gefunden. Eine Überexpression von Rho A wurden im Mammakarzinom, Kolon- und Lungenkarzinom (126) gefunden sowie in Tumortypen wie Magenkrebs (127), Kopf- und Nacken-Plattenepithelkarzinom (128), Blasen-(129) und Hodenkrebs (130). Eine erhöhte Expression von RhoA führte zur Lokalisation an die Plasmamembran, wo durch die Aktivierung von RhoA invasionsfördernde Signalwege in Gang gesetzt wurden.

Eine erhöhte Expression von Rac1 konnte ebenfalls in Mammakarzinomen nachgewiesen werden, die die Tumorentwicklung fördert. Rac 3 hingegen ist verantwortlich für die dauerhafte Aktivierung von PAK (p21-activated kinase), was zu einem proliferierenden Tumortyp führt (131). Mutationen oder veränderte Expressionslevel der Regulatoren der Rho-GTPasen können in tumorfördernde Antworten resultieren. GEFs, GAPs und GDIs, wenn überexprimiert oder deletiert, können in erhöhten Aktivierungen der Rho-GTPasen resultieren. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Rac-spezifische GEF-Faktor TIAM1 E-Cadherin-basierte Zell-Zell-Adhäsionen kontrolliert, das Fehlen von TIAM1 würde in der Epithelialen-mesenchymalen Transition enden (132). Der Rac/TIAM1-Komplex supprimiert des Weiteren die Ras-induzierte Apoptose während der Tumorinitiierung (125). Bei der Tumorprogression spielen die Rho-GTPasen in einigen Tumoren auch eine wichtige Rolle. RhoA und Rac1 kontrollieren Matrixmetalloproteinasen und regulieren sog. TIMPs (tissue inhibitors), die für den Abbau und Umbau der EZM verantwortlich sind (133). Ein erhöhter Abbau der EZM erleichtert den Tumorzellen die Invasion in benachbarte Gewebe. Des Weiteren kontrollieren die Rho-GTPasen die Aktinpolymerisierung, ein wichtiger Prozess bei der Zellmigration von Tumorzellen.

1.8 Zielsetzung

Die Tumorzellmigration ist ein wichtiger Prozess bei der organspezifischen Metastasierung. An verschiedenen Tumorentitäten konnte nachgewiesen werden, dass u. a. die Fähigkeit zur raschen Extravasation in das Leberparenchym deren metastatisches Potential wesentlich bestimmt. Die spezifische Integrin-vermittelte Interaktion der Tumorzellen mit der EZM scheint dabei eine wichtige Funktion zu haben. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass Chemokine eine wichtige Rolle bei der organspezifischen Metastasierung spielen. Besonders im Mammakarzinom werden die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 überexprimiert. Interaktionen zwischen Integrinen und Chemokinen scheinen einen weiteren wichtigen Punkt beim Metastasierungsprozess darzustellen. Um ein besseres Verständnis für die Chemokin-induzierte Tumorzellmigration bei der organspezifischen Metastasierung des Mammakarzinoms zu gewinnen, war es das Ziel dieser Studie die Adhäsions- und Migrationseigenschaften zweier Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichem metastatischem Potential in Abhängigkeit bestimmter Matrixkomponenten und unter Stimulation mit SDF1 α oder MIP3 β zu untersuchen.

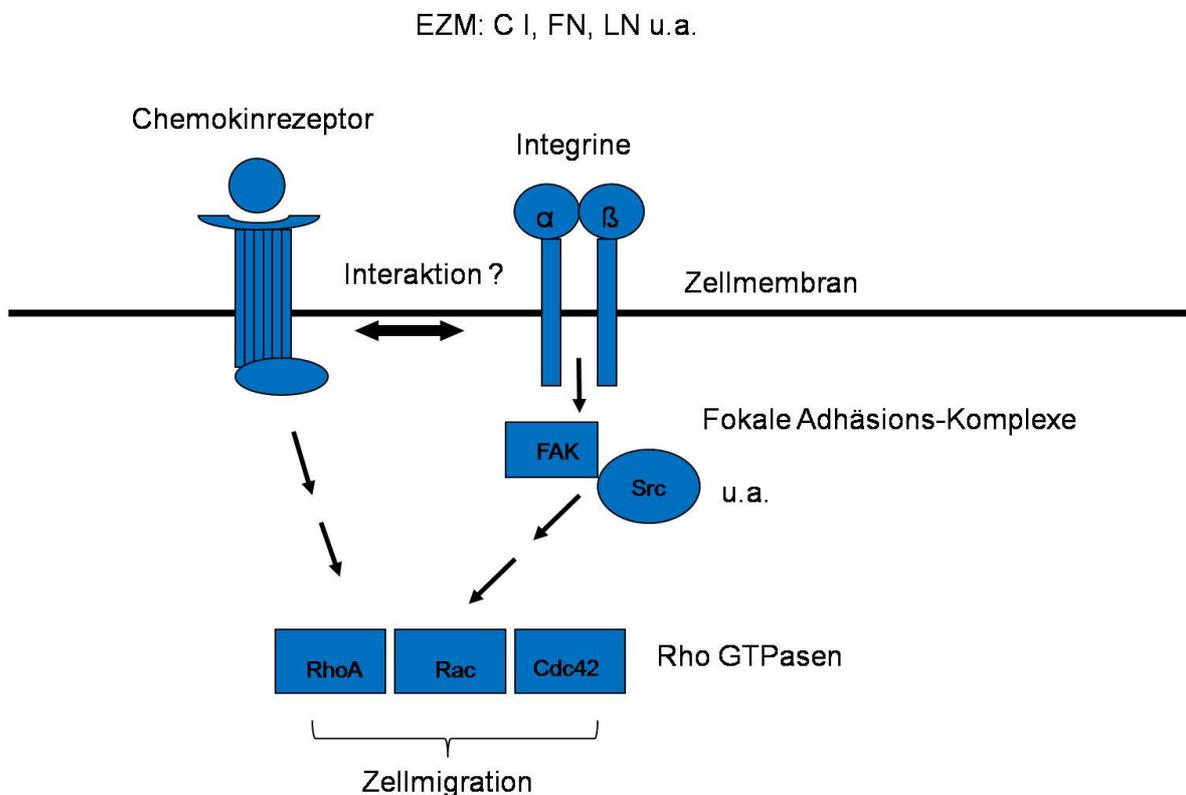


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Signalwege, die bei der Chemokin-induzierten Migration von Tumorzellen eine Rolle spielen. (Typ I Kollagen: C I; Fibronectin: FN; Laminin: LN).

- Welchen Einfluss hat die EZM auf die Chemokin-induzierte Migration von Tumorzellen in vitro?
- Reagieren hochmetastatische Tumorzellen und niedrigmetastatische ähnlich auf die Chemokinstimulation?
- Gibt es Unterschiede in Hinsicht auf die Reaktivität auf die Chemokine SDF1 α und MIP3 β zwischen den Tumorzelllinien?
- Ist die Chemokin-induzierte Aktivierung der Rho GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 matrixabhängig? Wenn ja, welche Unterschiede bestehen zu einer matrixunabhängigen Aktivierung der GTPasen?
- Bestehen Interaktionen zwischen Chemokinrezeptoren und Integrinen? Wenn ja, welche Signalwege sind bei diesen Prozessen involviert?

<p>Butanol-1 Chemilumineszenz-Substrat DDT Lösung Methanol Proteaseinhibitor-Cocktail Proteinmarker Page Ruler Puffer (Elektroden-, Blotting-, TBS-) Restore Western Blot stripping buffer Rho Assay Reagent Agarose Rac/Cdc42 Assay Reagent Agarose SDS 10% Lösung TEMED Tween 20</p>	<p>AppliChem (Darmstadt, Germany) Millipore (Schwalbach Ts, Germany) Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) Fluka (Buchs SG, Schweiz) Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) Fermentas (St. Leon-Rot, Germany) Apotheke, Münster Pierce/Thermo Scientific (Rockford, IL) Millipore (Eching, Germany) Millipore (Eching, Germany) BioRad (München, Germany) BioRad (München, Germany) Appllichem (Darmstadt, Germany)</p>
<p>Antikörper</p> <p>Erstantikörper</p> <p>Integrine Maus anti human Integrin αv Maus anti human Integrin α1 Maus anti human Integrin β4 Maus anti human CD49c Maus anti human CD49e Maus anti human CD49e</p> <p>Chemokinrezeptoren Maus anti human CCR1, PE conj. Maus anti human CCR2, PE conj. Maus anti human CCR3, PE conj. Maus anti human CCR5, PE conj. Maus anti human CCR6, PE conj. Maus anti human CCR7, PE conj. Maus anti human CXCR1, PE conj. Maus anti human CXCR2, PE conj. Maus anti human CXCR3, PE conj. Maus anti human CXCR4, PE conj. Maus anti human CXCR5, PE conj.</p> <p>Rho-GTPasen Kaninchen anti human Cdc42 Maus anti human Rac1 Kaninchen anti human RhoA</p>	<p>Calbiochem/Merck (Darmstadt, Germany) Millipore/upstate (Eching, Germany) Serotec (Düsseldorf, Germany) Serotec (Düsseldorf, Germany) Serotec (Düsseldorf, Germany) Millipore/Chemicon (Eching, Germany)</p> <p>R&D Systems (Wiesbaden, Germany) R&D Systems (Wiesbaden, Germany)</p> <p>Cell signalling (Danvers, MA) BD Pharmingen(San Jose, CA) Santa Cruz (Santa Cruz, CA)</p>
<p>Zweitantikörper</p> <p>Alexa Fluor Ziege anti Maus IgG 488 Alexa Fluor Ziege anti Maus IgG 546 Alexa Fluor Ziege anti Kaninchen 488</p>	<p>Invitrogen (Karlsruhe, Germany) Invitrogen (Karlsruhe, Germany) Invitrogen (Karlsruhe, Germany)</p>

<p>Alexa Fluor Ziege anti Kaninchen 546 Ziege anti Kaninchen IgG Peroxidase Anti-Maus IgG Peroxidase</p> <p>Isotyp Kontrollen</p> <p>Maus IgG1 PE konjugiert Maus IgG2a PE konjugiert Maus IgG2b PE konjugiert</p>	<p>Invitrogen (Karlsruhe, Germany) Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO)</p> <p>R&D Systems (Wiesbaden, Germany) R&D Systems (Wiesbaden, Germany) R&D Systems(Wiesbaden, Germany)</p>
<p>Fluoreszenzfarbstoffe</p> <p>Cell tracker rot und grün Calcein AM Hoechst 33342 Kernfarbstoff Alexa Fluor Phalloidin 488 und 546</p>	<p>Molecular Probes (Eugene, OR) Molecular Probes (Eugene, OR) Molecular Probes (Eugene, OR) Molecular Probes (Eugene, OR)</p>
<p>Sonstiges</p> <p>Gasgemisch (N₂, O₂, CO₂)</p>	<p>Air Liquid (Krefeld, Germany)</p>

Tab. 1: Auflistung der benötigten Chemikalien

<p>2.1.2 Verbrauchsmaterialien</p> <p>Zellkulturmaterialien</p> <p>Zellkulturflaschen T25 Zellkulturflaschen T75 Serologische Pipetten 5ml Serologische Pipetten 10ml Serologische Pipetten 25ml Röhrchen 15ml BD Falcon Röhrchen 50ml BD Falcon Pipettenspitzen 10,100, 1000 µl Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2,0 ml) Spritze Perfusor 50 ml Filter Millex 0,22 µm</p>	<p>Hersteller</p> <p>Sarstedt (Newton, NC) Sarstedt (Newton, NC) Costar (Corning, NY) Costar (Corning, NY) Costar (Corning, NY) Becton Dickinson (Franklin Lakes, NY) Becton Dickinson (Franklin Lakes, NY) Eppendorf (Hamburg, Germany) Eppendorf (Hamburg, Germany) Braun (Melsungen, Germany) Millipore (Bedford, MA)</p>
<p>Spezielle Materialien</p> <p>Gewebekulturschalen 35mm Gewebekulturschalen 100mm Multiwell Platten 96 Vertiefungen</p>	<p>Sarstedt (Newton, NC) Sarstedt (Newton, NC) Greiner One (Frickenhäusen, Germany)</p>

<p>Multiwell Platten 24 Vertiefungen Kulturobjektträger (4 Kammern) Zellschaber UVette Küvetten Gewebekultureinsätze 8,0 µm Poren Insulinspritzen Microlance 3 Kanülen 26G Parafilm „M“</p>	<p>Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL) BD Biosciences (Bedford, MA) BD Biosciences (Bedford, MA) Eppendorf (Hamburg, Germany) nunc A/S (Roskilde, Denmark) BD Biosciences (Bedford, MA) BD Biosciences (Bedford, MA) Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL)</p>
<p>Western Blot Materialien</p> <p>EP GELoader Pipettenspitzen Immobilon PVDF-Membran Fuji medizinische Röntgenfilme Gelblot-Filterpapier</p>	<p>Eppendorf (Hamburg, Germany) Millipore (Bedford, MA) Fuji Europe GmbH (Düsseldorf, Germany) Whatman/Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)</p>

Tab. 2: Auflistung der benötigten Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Geräte	Hersteller
<p>Sicherheitswerkbank Klasse II Hera safe</p> <p>Heraeus Instruments (Osterode, Germany)</p> <p>Zentrifuge Heraeus Sepatech Biofuge 28RS</p> <p>Casy Cell Counter</p> <p>Bio Photometer ELISA Leser Dynatech MR 5000</p> <p>Cytomics FC 500 Durchflusszytometer</p> <p>Inverses Fluoreszenzmikroskop TE2000-U</p> <p>Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE800</p> <p>Western Blot Geräte und Zubehör</p>	<p>Kendro Laboratory Products (Hanau, Germany)</p> <p>Heraeus Instruments (Osterode, Germany)</p> <p>Schärfe System/ Innovatis AG (Reutlingen, Germany)</p> <p>Eppendorf (Hamburg, Germany) Dynatech (Ashford, UK)</p> <p>Beckman Coulter (Krefeld, Germany)</p> <p>Nikon (Düsseldorf, Germany)</p> <p>Nikon (Düsseldorf, Germany)</p> <p>BioRad (München, Germany)</p>

Schüttler WT 16	Biometra biomedizinische Analytik GmbH (Göttingen, Germany)
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim, Germany)
Röntgenfilm-Entwickler Agfa	Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie (Köln, Germany)
Thermoblock Quik Pak	Nichols Institute Diagnostics (Bad Vilbel, Germany)
Wasserbad precitherm PFV	Clinicon International GmbH (Mannheim, Germany))
Minizentrifuge minispin	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Minishaker (Vortexer) MS I	IKA-works Inc. (Wilmington, NC)
Einschweißgerät vacuplus	Petra electric GmbH (Burgau, Germany)

Tab. 3: Auflistung der eingesetzten Geräte

2.1.4 Software	Hersteller
CXP Cytometer	Beckman Coulter (Krefeld, Germany)
Cell^D	Soft imaging system GmbH (Münster, Germany)
Micro Win 2000 V. 4.0	Mikrotek Laborsysteme GmbH (Overath, Germany)
NIS Elements BR 3.0	Nikon (Düsseldorf, Germany)
Image J Densitometrie Software	Version 1.6, NIH (Bethesda, MD)
SPSS V. 14 Statistik-Programm	SPSS Inc. (Chicago, IL)

Tab. 4: Auflistung der eingesetzten Software

2.1.5 Puffer und Lösungen	Zusammensetzungen
<p>Zellkultur</p> <p>Zellkulturmedium DMEM</p> <p>Zellkulturmedium RPMI 1640</p> <p>PBS-Puffer pH 7,4 steril</p> <p>TBS-Puffer pH 7, 4 steril</p> <p>Medium für Versuche</p>	<p>DMEM 4,5 g/l Glukose Fötale Kälberserum: 10% (v/v) Glutamin: 1% (v/v) (100mM)</p> <p>RPMI 1640 4,5g/l Glukose Fötale Kälberserum: 10% (v/v)</p> <p>NaCl: 8,0 g KCl: 0,2 g KH₂PO₄: 0,25 g Na₂HPO₄·2H₂O: 1,35 g Ad 1000 ml Aqua dest.</p> <p>Tris-Base: 50 mM NaCl: 150 mM MgCl₂: 2 mM Ad 50 ml Aqua dest.</p> <p>DMEM oder RPMI 1690 mit 1% BSA (w/v)</p>
<p>Immunzytochemie</p> <p>PBS/A</p> <p>PBT</p> <p>PFA</p>	<p>BSA in PBS: 1% (w/v)</p> <p>PBS +1% BSA + 0,1 % (v/v) Triton X-100</p> <p>Paraformaldehyd in PBS: 4% (w/v)</p>
<p>Western Blot</p> <p>RIPA-Lysispuffer</p> <p>Magnesiumhaltiger Lysispuffer</p>	<p>Tris-HCl pH 7,4: 50 mM NaCl: 150 mM NP40: 1% (v/v) Deoxycholat: 0,5% (w/v) SDS: 0,1% (w/v) EDTA: 5 mM Inhibitor-Cocktail (Sigma): 1µl per 1 ml</p> <p>HEPES pH 7,5: 25 mM NaCl: 150 mM</p>

<p>Elektrodenpuffer pH 8,3, 5fach</p> <p>Blottingpuffer 5fach</p> <p>TBS-Puffer pH 7, 4 10fach</p> <p>TBST-Puffer</p> <p>Blockier- und Antikörperlösung</p>	<p>Igepal CA-630: 1% (v/v) Glycerol: 10% (v/v) MgCl₂: 10 mM EDTA: 1 mM Inhibitor-Cocktail: 1µl per 1 ml</p> <p>Tris Base: 15g Glycin: 72 g SDS: 5 g Ad 1000 ml Aqua dest.</p> <p>Tris Base: 15 g Glycin: 72 g Ad 1000 ml Aqua dest.</p> <p>Tris HCl: 78,8 g NaCl: 87, 6 g Ad 1000 ml Aqua dest.</p> <p>TBS-Puffer +0, 5% (v/v) Tween 20</p> <p>TBST-Puffer + 3% (w/v) BSA</p>
<p>Migrationsversuch</p> <p>Kristallviolett</p> <p>Hämatoxylin</p>	<p>Kristallviolett: 0,05 g + 20% (v/v) Methanol Ad 50 ml Aqua dest.</p> <p>Hämatoxylin:1 g NaJO₃ :0,2 g Kalialaun (Kal (SO₄):50 g Chloralhydrat: 50 g kristalline Zitronensäure:1 g ad 1000 ml A.dest</p>

Tab. 5: Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen

2.1.6 Mammakarzinom-Zelllinien

Es wurden in dem beschriebenen Projekt drei humane Mammakarzinom-Zelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial untersucht.

Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde von einer Kooperationsgruppe in Australien zur Verfügung gestellt.

Diese Zellen stammen ursprünglich von einer 51-jährigen Patientin und zeigen ein invasives Migrationsverhalten. Des Weiteren sind die Zellen fähig im Tierexperiment Tumore in Nacktmäusen zu bilden.

Die MDA-MB-468 Zellen wurden bei der ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) käuflich erworben und stammen ursprünglich aus einer Pleuralen Effusion von einer 51-jährigen Frau mit metastatischen Adenokarzinom der Brust.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Die Zelllinie MDA-MB-231 wird in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS kultiviert. Die Zelllinie MDA-MB-468 wird in DMEM Medium mit 10% FKS und 1% L-Glutamin kultiviert. Die Kultivierung der Zellen im Inkubator findet bei 5,5% CO₂-Gehalt, 37°C und 99% Luftfeuchtigkeit statt.

Zum Passagieren werden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA kurz inkubiert und je nach Bedarf mit Kulturmedium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt.

Für die Versuche werden die Zellen über Nacht unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Dazu wird das Kulturmedium gegen FKS-freies Medium mit 1% BSA ausgetauscht. Nach dem Trypsinieren werden die Zellen zum Rekonstituieren der Zelloberflächenmoleküle für 45 min im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 Statische Adhäsion von Tumorzellen

Die Adhäsion von Tumorzellen an verschiedene Zelltypen oder an Moleküle, die als Substrat dienen, stellt einen wichtigen Prozess der Metastasierung dar. Unterschieden werden kann die Adhäsion unter dynamischen Bedingungen wie z.B. unter Scherkräften, die die Tumorzellen im Blutstrom ausgesetzt sind oder unter statischen Bedingungen wie die Adhäsion im Gewebe. In vitro lässt sich die statische Adhäsion von Tumorzellen in

Mikrotiterplatten untersuchen. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die Adhäsion der Mammakarzinomzellen an verschiedenen Molekülen der Extrazellulären Matrix untersucht, wie sie z.B. in der Leber vorkommen. Die Böden der Mikrotiterplatten (96 wells) werden mit Kollagen Typ I (C I)-, Fibronectin (FN)- und Laminin (LN)-Lösungen von 10µg/ml über Nacht bei 2-8°C beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS zum Entfernen der Reste der Matrixproteinlösungen, werden die freien Bindungsstellen mit einer 1%-BSA-Lösung in PBS für 30 min blockiert. Die Zellen werden währenddessen für 45 min im BSA-haltigen Medium rekonstituiert. Anschließend wird die Zelldichte mittels eines Casy Zellzählgerätes ermittelt. Die Zellen werden zu einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Um den Einfluss von SDF1α/CXCL12 und MIP3β/CCL19 auf die Adhäsion der Tumorzellen zu untersuchen, werden Chemokinkonzentrationen von 25, 50 und 100 ng/ml zu den Zellen gegeben. Nach 30 oder 60 min werden die nicht adhärenen Zellen durch Waschen entfernt und die adhärenen Zellen mit Formalin fixiert. Anschließend werden die Zellen mit Kristallviolett für 15 min gefärbt und für ca. 5 min unter laufendem Leitungswasser vorsichtig gespült. Nach Zugabe von je 100 µl HC erfolgt die Messung bei 630 nm in einem Spektrophotometer. Die Versuche wurden als Dreifachansätze durchgeführt und dreimal wiederholt.

2.2.3 Transmigration von Tumorzellen

Äquivalent zur Adhäsion der Tumorzellen an Proteine der EZM wurde das Migrationsverhalten der Brustkrebszellen untersucht. Polykarbonatmembranen mit einer Porengröße von 8,0 µm werden als Einsätze in 24-Kammerplatten gesetzt. Diese Membranen werden von beiden Seiten mit C I, FN oder LN beschichtet. Die Zellen werden mit einer Konzentration von $0,7 \cdot 10^5$ Zellen/ml in die Einsätze gegeben. Nach einer Stunde Adhärenzzeit werden SDF1α/CXCL12 oder MIP3β/CCL19 jeweils in die unteren Kammern gegeben, um über die Membranen einen Chemokingradienten zu erzeugen. Es werden Chemokinkonzentrationen von 25, 50 und 100 ng/ml getestet. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden werden die Zellen mit PBS gewaschen und die nicht durch die Membran gewanderten Zellen mit einem Q-Tipp von der Membran gewischt. Anschließend werden die an der Unterseite der Membran haftenden Zellen 15 min mit Formalin fixiert und danach für 15 min mit Kristallviolett und Hämatoxylin (5 min) gefärbt. Nach 5-minütigen Bläuen unter Leitungswasser werden die getrockneten Membranen auf Objektträgern eingedeckt.

Zur quantitativen Auswertung werden pro Membran 16 standardisierte Felder unter einem Durchlichtmikroskop mit einer Gesamtvergrößerung von 80x (20x Objektiv, 4x Okular)

ausgezählt. Die Versuche wurden als Dreifachansatz durchgeführt und dreimal wiederholt.

2.2.4 GTPase-Aktivierung / Western Blot

2.2.4.1 Zellyse

Um die Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 zu untersuchen, werden in Pull down assays die aktivierten Proteine, d.h. die GTP-gebundenen GTPasen, mittels Zugabe von Glutathione-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen, nach Anleitung des Herstellers präzipitiert und in anschließenden Western Blot Analysen detektiert. Die Zellen wurden in Suspension oder adhärent in Petrischalen lysiert. Vor der Zellyse werden die Zellen mit Chemokinen und/oder Inhibitoren behandelt und anschließend mit RIPA-Lysispuffer lysiert. Die Arbeiten werden alle auf Eis durchgeführt, damit die GTPasen nicht hydrolysieren und in den inaktiven Zustand übergehen können. Nach Zugabe des Lysispuffers zur Zellsuspension oder in die mit Matrixproteinen beschichteten Petrischalen werden die Zellysate in Reaktionsgefäße überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Homogenisierung der Lysate werden diese 2-3-mal mit einer Insulinspritze aufgezogen. Anschließend werden die Proben bei 14000xg und 4°C für 5 min abzentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile aus den Lysaten herauszulösen. Die Proben werden zunächst in flüssigen Stickstoff und anschließend bei -80°C eingefroren. Es werden jeweils 10 µl der Zellysate für die Proteinbestimmung abgenommen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde mit dem BCA Protein Assay Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.2 Probenvorbereitungen

Nach langsamem Auftauen der Proben auf Eis, werden diese für den Pull down Assay auf 500µg/ml Proteingehalt verdünnt. Für die RhoA-Aktivierung werden jeweils 30,8 µl der GST-C21-Fusionsprotein-Agarosebeads zu den Proben gegeben, für die Aktivierung von Rac/Cdc42 10 µl der GST-PAK-CD-Agarosebeads und für 45 min auf Eis unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Proben mit Magnesiumhaltigen Lysispuffer dreimal mit kurzen Zentrifugationsschritten bei 14000xg, 4°C und maximal 10 sec gewaschen. Als Ladekontrollen werden Gesamtlysate mit einer Konzentration von 10 µg Protein in 15 µl genommen. Die Proben werden dann mit vierfachem Probenpuffer versetzt, die „pull down“ Proben zusätzlich mit je 1 µl DDT, um das Ablösen der Proteine von den Agarosekügelchen zu vereinfachen. Die Proben werden dann für 10 min bei 95

°C denaturiert und nach kurzem Abzentrifugieren auf 12% SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen.

2.2.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der pull down Proben werden 12 % Polyacrylamidgele verwendet, da die kleinen Rho-GTPasen eine Größe von 21 kDa haben. Für größere Proteine wurden 10 % Gele verwendet. Das Sammelgel ist 4%.

Trenngel	10%	12%
A.dest	4,01 ml	3,40 ml
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	2,50 ml	2,50 ml
SDS 10%	0,10 ml	0,10 ml
Acrylamid 30%	3,33 ml	4,00 ml
TEMED	4,00 µl	2,50 µl
APS 10%	40,0 µl	25,0 µl
Sammelgel	4 %	
A.dest	3,05 ml	
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 ml	
SDS 10%	0,05 ml	
Acrylamid 30 %	0,65 ml	
TEMED	3,0 µl	
APS 10%	15 µl	

Tab.6: SDS-Gelzusammensetzung: Trenngele und Sammelgel

Nach Auftragung der Proben auf die Gele, erfolgte die Proteinauftrennung zunächst bei 70 V, um alle Proteine im Sammelgel gleichmäßig anzusammeln. Nach ca. 12 min wurde die Spannung auf 120 V gestellt und die Gelelektrophorese ca. 120 min laufen gelassen. Pro Gel werden jeweils 6 µl eines Standardmarkers mit aufgetragen, um die Proteingröße der Banden zuweisen zu können.

2.2.4.4 Western Blot

Diese Methode wird eingesetzt, um Proteine, die in der Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, auf eine PVDF-Membran zu transferieren. Eingesetzt wurde die Nassblot-Methode. PVDF-Membranen müssen vor dem Zusammenbau des sog. Blot-Sandwich zunächst für ca. 15 sec in Methanol äquilibriert werden. Das Blotverfahren wird bei 100 V für 45min für kleine Proteine durchgeführt. Bei größeren Proteinen wird für 60 min geblottet. Nach dem Blotvorgang werden die Membranen über Nacht getrocknet, um die Proteine besser zu fixieren. Bevor die Membranen dann weiter bearbeitet werden können, müssen diese zunächst wieder in Methanol äquilibriert werden. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer werden die Membranen für 30 min mit Blockierlösung bei 37°C blockiert. Anschließend werden die Erstantikörper für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Antikörperverdünnungen	RhoA	Rac1	Cdc42
Erstantikörper	1:250 bis 1:1000	1:1500	1:1000
Zweitantikörper	Kaninchen 1:13000	Maus 1:13000	Kaninchen 1:13000

Tab.7: Antikörperverdünnungen

Nach dreimaligem Waschen mit TBST werden die HRP-gekoppelten Zweitantikörper 1:13000 verdünnt für 45 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBST wird zum Schluss noch einmal mit TBS gewaschen und die Membranen für die Entwicklung vorbereitet. Die zwei Komponenten der Chemilumineszenzlösung werden 1:1 verdünnt und für 3-5 min auf den Membranen inkubiert. Die Entwicklung erfolgt mittels Röntgenfilme, die nach unterschiedlichen Belichtungszeiten im Röntgenfilmentwickler entwickelt werden. Zur Auswertung der Signalstärke der Signalbanden werden die Röntgenfilme eingescannt und mit der Image J Software densitometrisch ausgewertet.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Diese Methode erlaubt die Bestimmung der Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren auf den Tumorzellen. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz gibt die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche an und den Prozentsatz der positiven Zellen. Die Zellen werden nach dem 45-minütigen Rekonstituieren mit Formalin für 15 min fixiert und anschließend dreimal mit 0,5% BSA in PBS gewaschen. Danach werden die Zellen für 20 min mit 5% BSA/PBS blockiert. Die Zelldichte wird auf $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und 25 µl der Zellsuspension dann jeweils in die entsprechende Anzahl an

Messröhrchen aufgeteilt. Ungefärbte Zellen dienen als Negativkontrolle und werden als 1. Röhrchen gemessen. Je nach Isotyp des Antikörpers wird die entsprechende Isotypkontrolle in das 2. Röhrchen gegeben. In das dritte Röhrchen wird dann der PE-gekoppelte Antikörper gegeben. Von den Isotypkontrollen und Antikörpern werden jeweils 10µl zu den Zellen gegeben und für 45 min im Dunkeln und bei 2-8°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen zweimal gewaschen und die Zellen mit 500 µl PBS resuspendiert und in einem Durchflusszytometer FC 500 von Beckman Coulter gemessen. Die Auswertung erfolgt mittels der Analysesoftware des Gerätes. In sog. Plots werden die Intensitäten der Fluoreszenz dargestellt. Der x-Mean Wert gibt die Intensitätsstärke an und sagt etwas über die Rezeptorverteilung auf den Zellen aus. Hohe Werte bedeuten, dass pro Zelle viele Rezeptoren gebildet wurden.

2.2.6 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Indirekte Immunfluoreszenzfärbung dient zur Kennung der Lokalisation von Oberflächenproteinen oder zytoplasmatischen Proteinen in der Zelle. Die Zellen werden in Matrixbeschichteten (PLL, C I, FN, LN) Objektträgern mit Kammeraufsatz für 60 min inkubiert und anschließend gewaschen und für 20 min mit Paraformaldehyd (4%) fixiert. Für die CXCR4-Oberflächenmarkierung werden die Zellen nicht permeabilisiert und während des Versuchs mit 1%BSA in PBS (PBS/A) gewaschen. Für intrazelluläre Markierungen werden die Zellen mit 1% BSA in PBS und 0,1% Triton-X-100 permeabilisiert.

Die freien Bindungsstellen werden für 20 min mit 1% BSA/PBS blockiert. Der Maus-anti-human-CXCR4 Antikörper wird mit einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt und für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wird der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper Alexa Fluor Ziege-anti-Maus IgG 1:200 verdünnt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Kernmarkierung wird mit Hoechst 33342 1:10⁵ in PBS verdünnt durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen werden die Kammern von den Objektträgern entfernt und diese mit Glycerelgel Eindeckmedium eingedeckt.

2.2.7 Zeitraffermikroskopie

Die Zeitraffermikroskopie erlaubt die Beobachtung der Einzelzellmotilität. Die Zellen werden in beschichteten Petrischalen mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml für 20 min inkubiert und nach anschließendem Wegwaschen der nicht adhärenen Zellen mit Chemokinen diffus stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Petrischale wird in einer Inkubationskammer unter einem inversen Fluoreszenzmikroskop gestellt und Bilder in

Abständen von 30 sec aufgenommen. Die Auswertung der Spurenlängen erfolgt mithilfe der Cell[^]D Software, wobei pro Film zehn einzelne Zellen manuell verfolgt werden. Verwendet wurde ein inverses Fluoreszenz-Mikroskop TE2000U von Nikon mit einem Modul für Zeitraffermikroskopie.

2.2.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Versuche wurde mit dem Statistikprogramm SPSS durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung gezeigt. Zum Vergleich zwischen den Parametern zwischen den behandelten Gruppen wurden P-Werte mit dem Scheffé-Test (ANOVA post-hoc Test) kalkuliert, der für abhängige und abhängige Proben geeignet ist. Für andere Analysen wurde der Students-T-Test verwendet. Signifikante Differenzen wurden bei einem P-Wert von $p < 0,05$ akzeptiert.

3. Ergebnisse

Chemokine spielen in der organspezifischen Metastasierung in einer Reihe von Tumortypen eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden zwei Vertreter der Chemokinfamilie auf ihre Funktion in der Adhäsion und Migration von zwei Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichem Metastasierungspotenzial untersucht.

Es wurden die hochmetastatische Zelllinie MDA MB 231 und die niedrigmetastatische Zelllinie MDA MB 468 auf ihre Chemokinexpression getestet.

Getestet wurden die Chemokinrezeptoren CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 und CXCR5, sowie CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR6 und CCR7. Die Expressionsstärken wurden eingeteilt in hohe, moderate, schwache und kaum Expression.

Rezeptoren	MDA MB 231	MDA MB 468
CXCR1	+	++
CXCR2	+	*
CXCR3	+++	+++
CXCR4	+++	+++
CXCR5	++	++
CCR1	+	*
CCR2	+	*
CCR3	+	++
CCR5	+++	+++
CCR6	++	+++
CCR7	++	++

Tab.8: Expression der Chemokinrezeptoren. Es wurden die Werte der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Durchflusszytometrie-Analyse benutzt, um die Expressionsstärke abzuschätzen. (+++ hohe Expression, ++ moderate Expression, + schwache Expression, * kaum Expression)

Beide Zelllinien zeigten ein ähnliches Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren. Besonders stark wurden die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CXCR4, sowie CCR5, CCR6 und CCR7 exprimiert.

Für weitere Analysen wurden die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 in den Mammakarzinomzelllinien untersucht, da beide Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle bei der organspezifischen Metastasierung des Mammakarzinoms spielen.

I. Die Rolle von CXCR4 beim Mammakarzinom

3.1 Die Zelloberflächenexpression von CXCR4

Die Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 ist ein prognostischer Faktor des Mammakarzinoms und stellt einen wichtigen Angriffspunkt für Anti-Krebs-Therapien dar. Die Zelloberflächenexpression von CXCR4 wurde in zwei humanen Mammakarzinomzelllinien mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Beide Zelllinien sind CXCR4-positiv und zeigten ähnlich hohe Expressionswerte. Die Zelllinie MDA MB 231 wies eine etwas höhere CXCR4-Expression als die MDA MB 468-Zellen auf. Bei der Zelllinie MDA MB 231 waren 84,5% (MFI:1; Abb. 2a) der Zellen CXCR4-positiv und bei der Zelllinie MDA MB 468 78,7% (MFI: 0,793; Abb. 2b) der Zellpopulation.

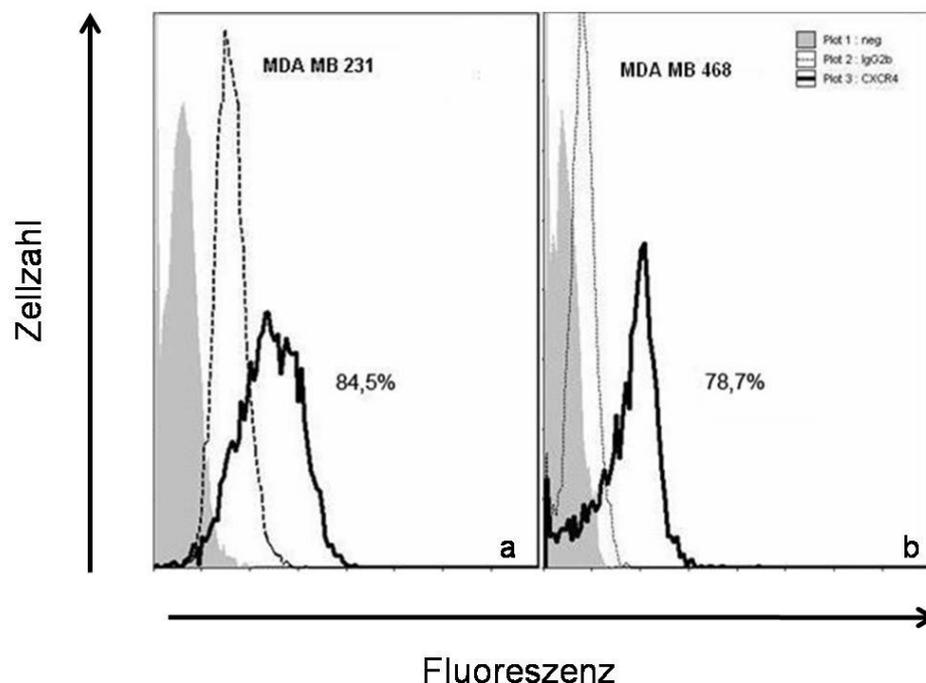


Abbildung 2: Die Zelloberflächenexpression von CXCR4 wurde in den Zelllinien MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Gezeigt sind die Überlagerungshistogramme der ungefärbten Zellen (grau ausgefüllt), der Isotypkontrolle (gestrichelt) und der CXCR4-Expression (schwarz). Die CXCR4-positiven Zellen sind in Prozent angegeben.

3.2 Überprüfungen der Funktionalität von CXCR4 durch Signaltransduktion der kleinen Rho-GTPasen

Um zu testen, ob der Chemokinrezeptor CXCR4 funktionell aktiv und fähig ist Signalwege zu aktivieren, wurde die Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen Rho A, Rac 1 und Cdc42 durch den Chemokinliganden SDF1 α /CXCL12 getestet. Da die Rho-GTPasen in ihrem aktiven Zustand an GTP binden und im inaktiven Zustand an GDP, eignen sich Analysen des Aktivierungszustands der GTPasen, um die Funktionalität von CXCR4 zu testen. Des Weiteren regulieren die aktivierten Rho-GTPasen das Aktinzytoskelett, was wichtig für die Zellmigration ist.

Als erstes wurde die Chemokin-induzierte Aktivierung der Rho-GTPasen in Zellsuspensionen der Mammakarzinomzellen getestet. Dabei wird eine Integrinaktivierung vermieden, um substratunabhängige Bedingungen zu haben. Die Aktivierungen der GTPasen wurden auf Proteinebene mittels sog. Pull down Assays und anschließenden Western Blots nachgewiesen. Zur besseren Übersicht, wurden die Signalstärken der Proteinbanden densitometrisch ausgewertet und die optischen Dichten der aktivierten Proben (GTP) mit denen der jeweiligen Kontrollproben (total) verglichen (GTP/total).

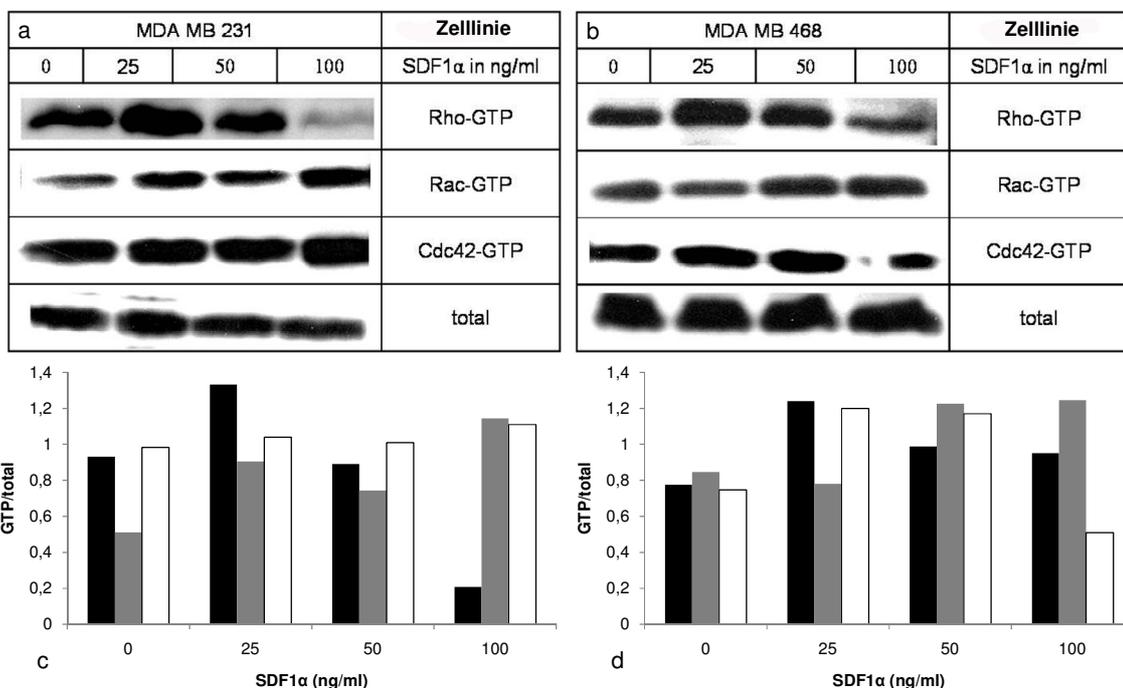


Abbildung 3: SDF1 α induziert eine konzentrationsabhängige Aktivierung der Rho-GTPasen in Zellsuspensionen der Zelllinien MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b). Die Aktivierungen der GTPasen wurden mittels Pull down Assays und anschließenden Western Blots nachgewiesen. Es wird beispielhaft ein Western Blot mit Gesamtzelllysat (total) als Kontrolle gezeigt.

Densitometrische Analysen der Western Blots für die Zelllinien MDA MB 231 (c) und MDA MB 468 (d) verdeutlichen die Ergebnisse. (Rho-schwarz; Rac-grau; Cdc42-weiß).

Es wurden Chemokin-Konzentrationen von 25, 50 und 100 ng/ml getestet und verglichen mit unstimulierten Zellen. SDF1 α induzierte eine konzentrationsabhängige Aktivierung von Rho A in beiden Zelllinien mit einem Maximum bei 25ng/ml. Bei 100 ng/ml nahm das Signal ab. Die Rac-Aktivierung wurde mit steigender Konzentration an SDF1 α erhöht. In den MDA MB 231-Zellen konnte keine deutliche Cdc42-Aktivierung nachgewiesen werden, bei den MDA MB 468-Zellen nur eine leichte Aktivierung von Cdc42.

Als nächstes wurde die Aktivierung der Rho-GTPasen in Abhängigkeit von der Extrazellulären Matrix (EZM) getestet, um Integrinvermittelte Aktivierungen zu untersuchen. Die Zellen adhärten für eine Stunde auf den Matrixkomponenten Kollagen Typ I (C I), Fibronektin (FN) und Laminin (LN). Rinderserumalbumin (BSA) und Poly-L-Lysin (PLL) dienten als Kontrollsubstrate, für integrinunabhängige Adhäsionen der Zellen.

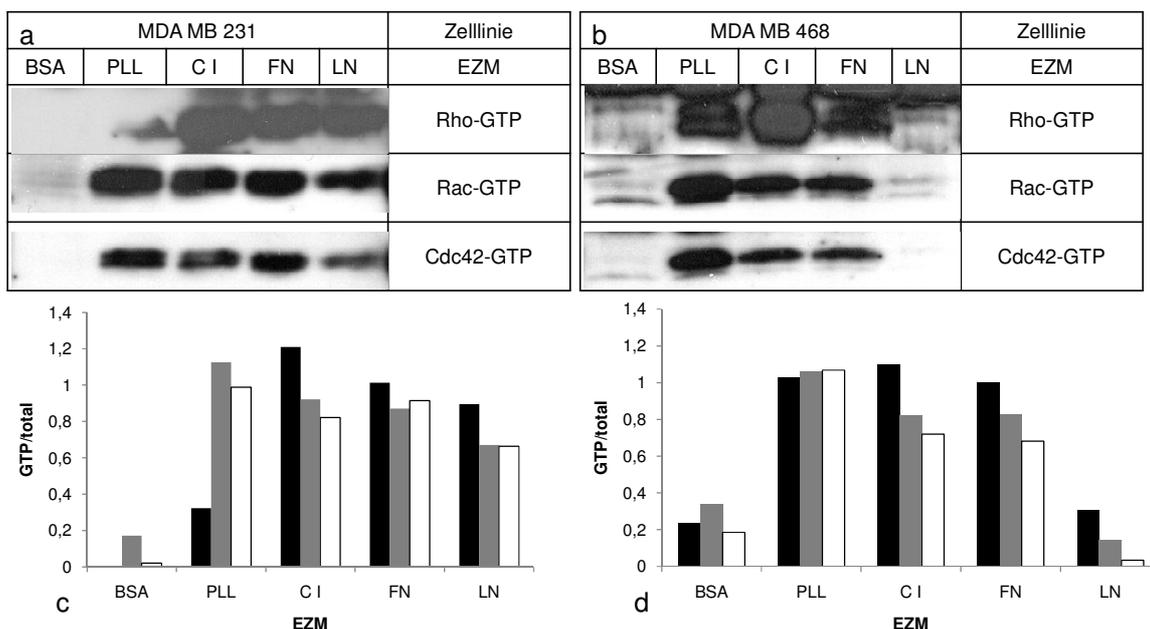


Abbildung 4: Die Aktivierung der GTPasen Rho A (schwarz), Rac 1 (grau) und Cdc42 (weiß) ist matrixabhängig und zeigt Unterschiede zwischen den Zelllinien MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b). Die densitometrischen Analysen für die Zelllinien MDA MB 231 (c) und MDA MB 468 (d) verdeutlichen die Unterschiede der Aktivierungen der GTPasen.

Beide Zelllinien zeigten keine bzw. nur ganz schwache Aktivierungen der GTPasen, wenn die Zellen auf BSA ausplattiert wurden. Die Zelllinie MDA MB 231 (a, c) zeigte sowohl auf den Matrixproteinen als auch auf PLL starke Aktivierungen von Rho A, Rac 1 und Cdc42.

Die Zelllinie MDA MB 468 (b, d) hingegen wies auf LN keine bzw. nur leichte Rho A und Rac 1-Aktivierungen auf. Auf den Substraten PLL, C I und FN wurden ähnlich starke Signale wie bei der Zelllinie MDA MB 231 nachgewiesen.

Um die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit zu testen, wurden MDA MB 468-Zellen auf CI I ausgesät und mit SDF1 α -Konzentrationen von 25, 50 und 100 ng/ml für 15 min und 30 min stimuliert. Die Rho A-Aktivierung wurde beispielhaft in diesem Zusammenhang getestet.

a					MDA MB 468	Zelllinie
0	25 ng 15 min	25ng 30 min	50ng 15 min	100ng 15min	Konzentration	Zeit
					Rho-GTP	
					Rho total	

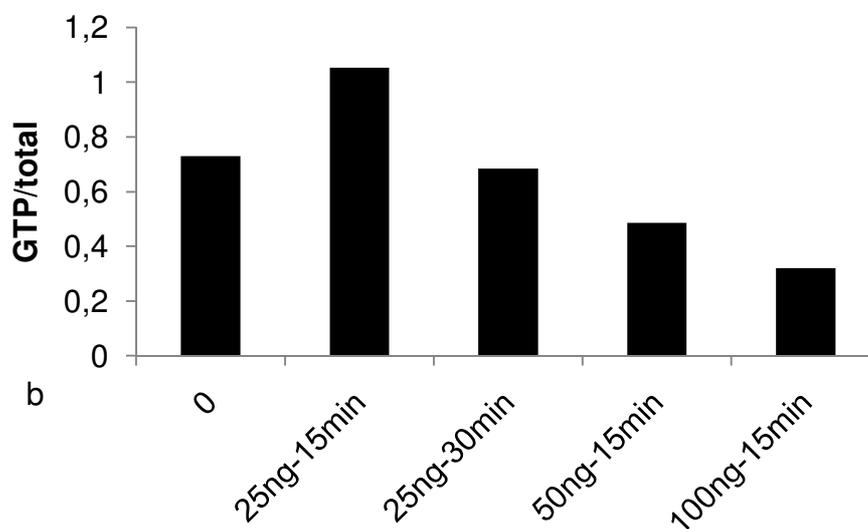


Abbildung 5: Die Aktivierung der Rho-GTPasen ist konzentrations- und zeitabhängig. Die Rho A-Aktivierung der Zelllinie MDA MB 468 (a) nimmt nach 30 min und/oder bei höheren Konzentrationen ab 25 ng/ml SDF1 α ab. Densitometrische Daten verdeutlichen dieses (b).

Die Rho A-Aktivierung der MDA MB 468-Zellen ist sowohl abhängig von der Chemokinkonzentration als auch abhängig von der Zeitdauer, die die Zellen mit SDF1 α stimuliert wurden. Bei einer Konzentration von 50 ng/ml SDF1 α nimmt die Rho A-Aktivierung ab, als auch bei einer Zeitdauer von 30 min.

3.3 Zelloberflächenverteilung von CXCR4 in Abhängigkeit von der EZM

Die Verteilung von CXCR4 auf der Zelloberfläche wurde mittels eines spezifischen Antikörpers immunzytologisch nachgewiesen. Da matrixabhängige und Chemokin-induzierte Aktivierungen der Rho-GTPasen festgestellt wurden, wurde als nächster Schritt die CXCR4-Rezeptorverteilung auf den Zelloberflächen in Abhängigkeit der EZM und der Zeit untersucht. Die Matrixproteine C I und FN spielen eine wichtige Rolle bei der metastatischen Adhäsion der Tumorzellen und/oder der Extravasation in die Leber. LN-1 hingegen kommt nur in geringen Mengen in den Lebersinusoiden vor. PLL diente als unspezifisches Substrat.

Zu Beginn wurden auf allen Substraten Clusterbildungen von CXCR4 ohne bestimmte Lokalisationen auf der Zelloberfläche gefunden. Auf den Substraten C I und FN bildeten die MDA MB 231-Zellen sehr schnell Lamellipodia aus (6a-d), währenddessen Filopodia auf LN erst langsam nach ca. 15 min ausgebildet wurden (6e, f). Auf PLL waren die Zellen nicht fähig Podien auszubilden (6g, h) und zeigten runde Zellmorphologien. Die CXCR4-Cluster waren hauptsächlich in den Lamellipodia der Zellen und an den führenden Frontseiten der Zellen lokalisiert. Die Stimulation der Zellen mit SDF1 α veränderte die Verteilung von CXCR4 auf den Zelloberflächen nicht (6b, d, f, h).

Beim Adhären der Zellen auf den Matrixkomponenten C I, FN und LN wurde eine Integrin-vermittelte Clusterbildung von CXCR4 beobachtet. Um die Größe der Cluster zu bestimmen, wurden diese mithilfe der Zelltracking-Software gemessen. Die Größe der Cluster stieg signifikant bei Zellen, die mit EZM-Komponenten interagierten, im Gegensatz zu Zellen, die unspezifisch auf PLL adhären (Abb. 7a). Diese Clusterbildung korrelierte mit dem Ausmaß des Zellsreadings auf dem jeweiligen adhäsiven Substrat.

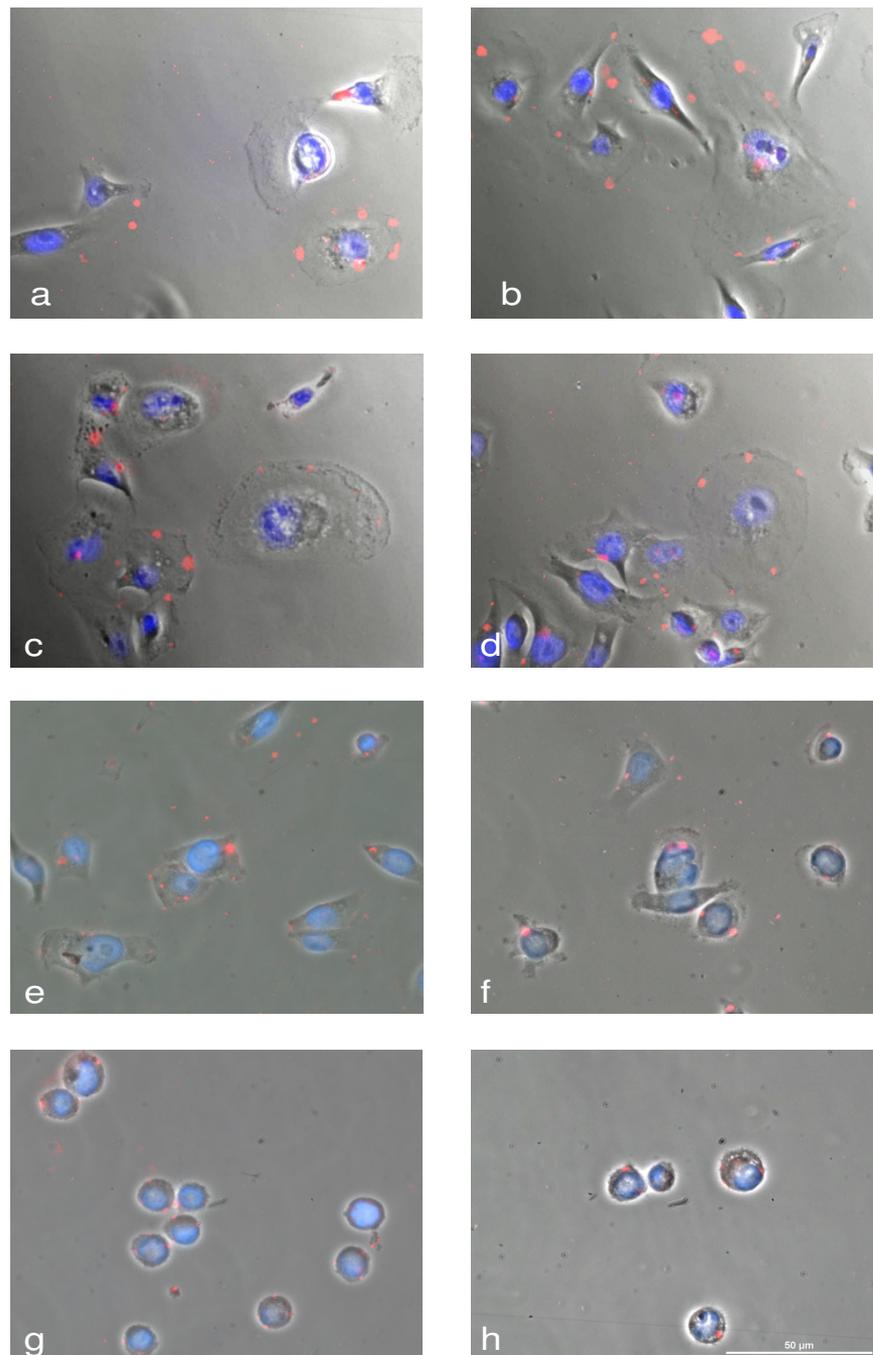


Abbildung 6: Clusterbildung von CXCR4 auf den Zelloberflächen: Die CXCR4-Markierung wurde mit einem Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper (rot) sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden blau gefärbt. Die Bilder wurden mit den Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen überlagert. Gezeigt sind MDA MB 231-Zellen auf den Substraten C I (a, b); FN (c, d); LN (e, f) und PLL (g, h). Die Stimulation mit 25 ng/ml SDF1 α (b, d, f, h) änderte die Verteilung von CXCR4 im Gegensatz zu unstimulierten Zellen nicht (a, c, e, g). Maßstab 50 μ m

Auf PLL wiesen die Tumorzellen die kleinsten Clusterbildungen auf. Bei den Matrixproteinen wurden auf LN die kleinsten und auf C I (Abb. 7c) die größten CXCR4-Cluster in Umfang und Fläche gemessen. Die Anwesenheit des Chemokinliganden SDF1 α zeigte dagegen keinen Einfluss auf die Verteilung des Rezeptors und das

Zellspreading. Eine 3D-Rekonstruktion der Zelloberfläche ermöglichte die Lokalisierung von CXCR4-Clusterbildungen mit unterschiedlichen Größen. Es wurde deutlich, dass große Cluster eher benachbart der Zellränder lokalisiert waren (Abb. 7b, c gelbe Pfeile), währenddessen kleine punktförmige Cluster von CXCR4 überwiegend an migrierenden Enden zu finden waren (Abb. 7b, weiße Pfeile).

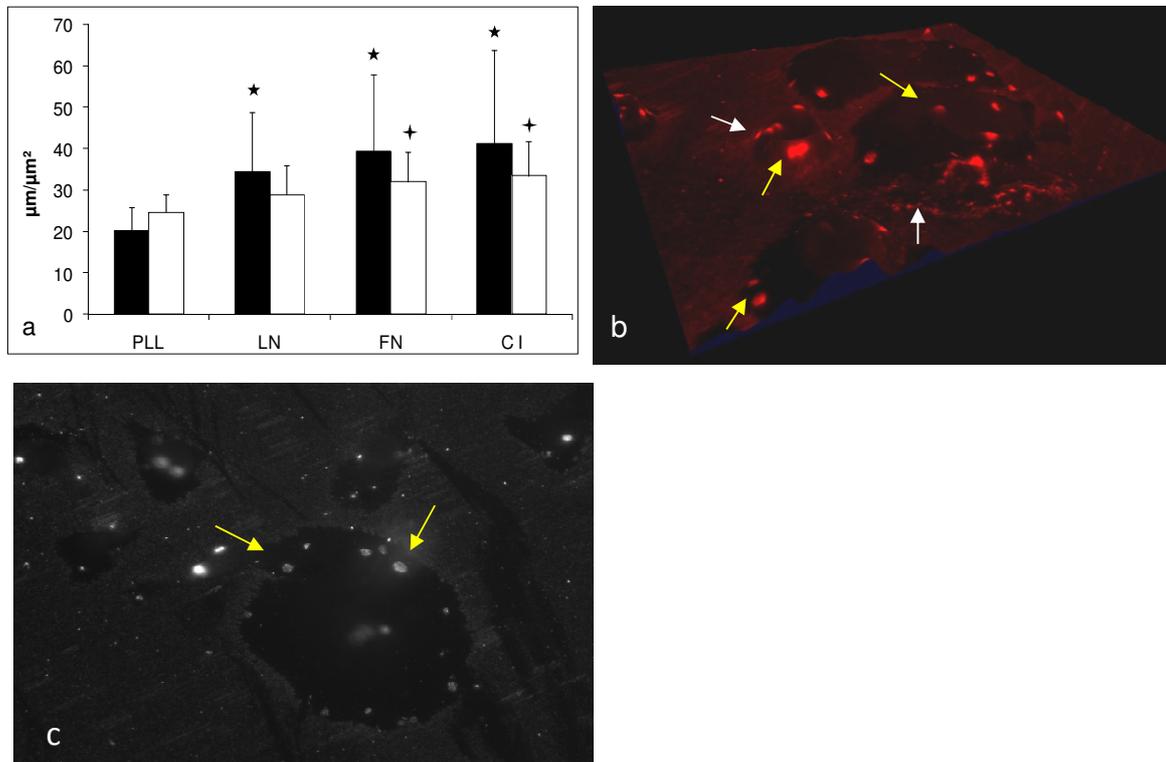


Abbildung 7: EZM-induzierte Vergrößerung von CXCR4-Clustern auf der Zelloberfläche. a) Spezifische Integrin-vermittelte Bindungen an EZM-Komponenten resultieren in einer signifikanten Zunahme von Größe (■) und Umfang (□) von CXCR4-Clustern auf MDA-MB-231 Zellen (* $p < 0,001$; + $p < 0,05$). b) Punktförmige Cluster sind überwiegend an migrierenden Enden (Leading edges, weiße Pfeile) zu finden. Wohingegen größere Cluster des CXCR4-Rezeptors eher benachbart der Zellränder liegen (gelbe Pfeile). c) CXCR4-Markierung von MDA MB 231-Zellen auf C I. Gelbe Pfeile verweisen auf große Cluster, deren Fläche und Umfang für die Analyse gemessen wurden.

Bei den Untersuchungen der Rho-GTPasen konnte eine zeitabhängige Aktivierung durch Chemokinbehandlung beobachtet werden (siehe Abb. 5). Daher wurde auch die Rezeptorverteilung auf den Zelloberflächen zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet. Die Zellen wurden für 5, 15 und 30 min mit SDF1 α inkubiert.

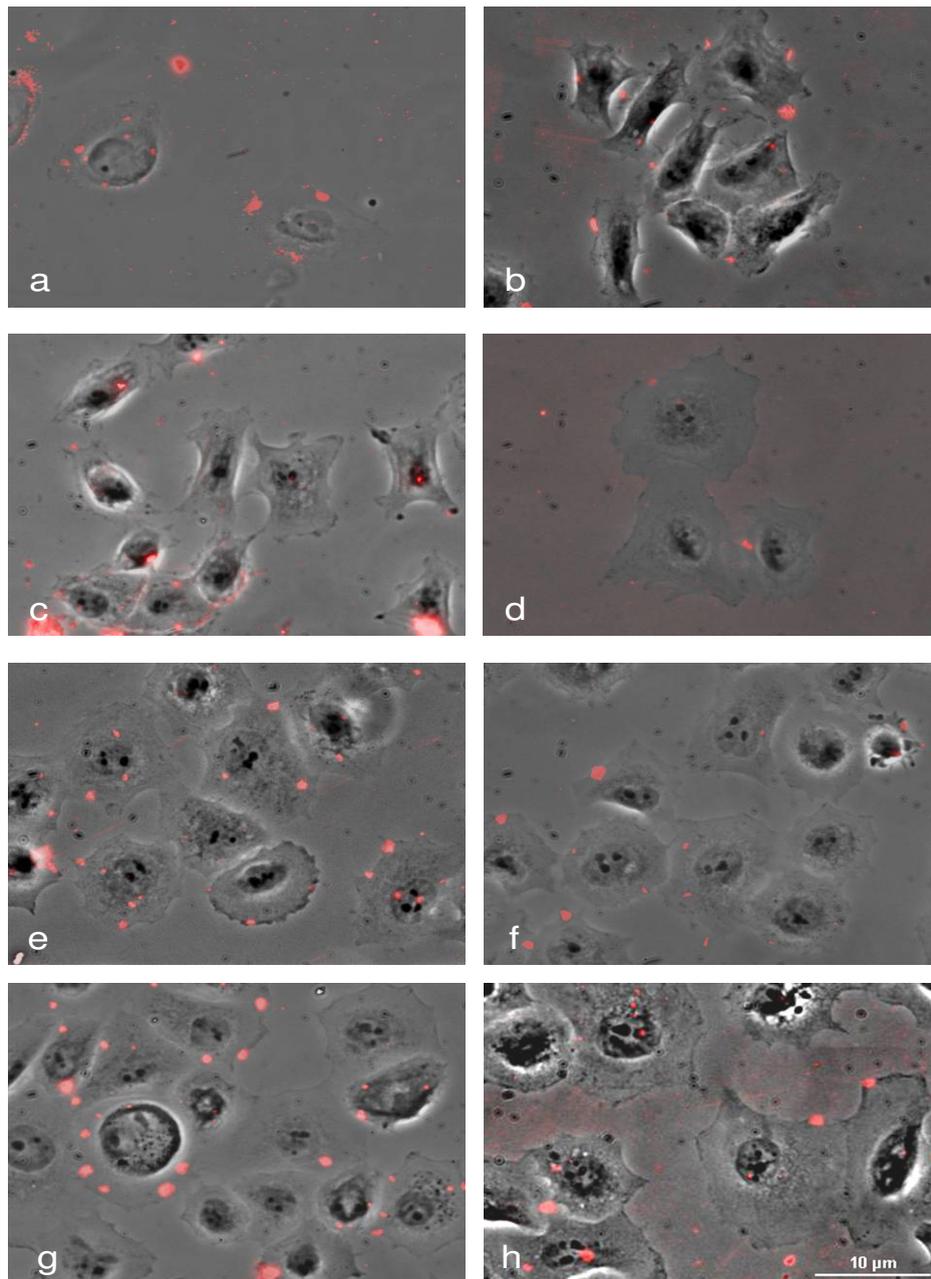


Abbildung 8: Rezeptor-Internalisierung von CXCR4: Nach einer Inkubationszeit von 30 min mit SDF1 α konnte die Internalisierung von CXCR4 und das teilweise Verschwinden von der Zelloberfläche in der Zelllinie MDA MB 231 beobachtet, wenn die Zellen auf C I (a-d) und auf FN gesetzt wurden (e-h). Die Zellen blieben unstimuliert (a+e) oder wurden nach 5 min (b+f); 15 min (c+g) und nach 30 min (d+h) Chemokinstimulation (25 ng/ml) gefärbt. Maßstab 10 μ m

Nach einer Inkubationszeit von 30 min mit SDF1 α konnte ein Beginn der Rezeptor-internalisierung und das teilweise Verschwinden von CXCR4 von der Zelloberfläche beobachtet werden. Bei 15 min Chemokinbehandlung schien die Aktivierung von CXCR4 am stärksten zu sein, da die Zellen dann die meisten CXCR4-Cluster auf ihren Zelloberflächen aufwiesen.

Bei der Zelllinie MDA MB 468 wurden die gleichen Färbemethoden und Chemokinbehandlungen angewandt, um das Verteilungsmuster von CXCR4 auf hoch- und niedrigmetastatischen Tumorzellen untersuchen zu können.

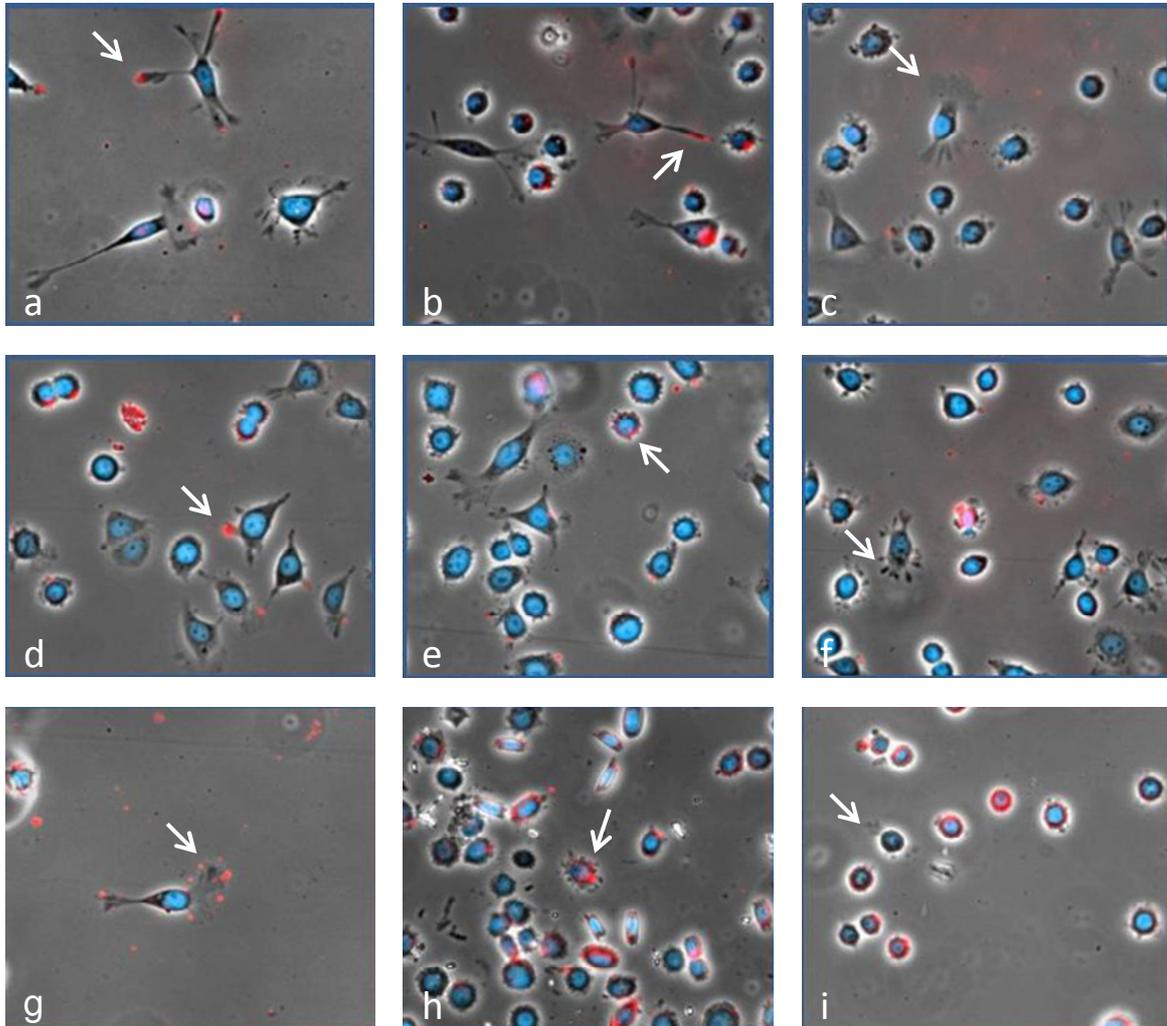


Abbildung 9: Die Verteilung von CXCR4 auf den Zelloberflächen der Zelllinie MDA MB 468. Die Zellen wurden auf den Matrixproteinen C I (a-c), FN (d-f) und LN (g-i) gesetzt und entweder unstimuliert (a, d, g) oder für 5 min (b, e, h) und 30 min (c, f, i) mit 25 ng/ml SDF1 α stimuliert. Die CXCR4-Markierung ist in Rot, die Kernfärbung in Blau gezeigt, überlagert mit den Phasenkontrastbildern. Vergrößerung 400x

Die Zellmorphologie der Zelllinie MDA MB 468 unterscheidet sich sehr von der Zelllinie MDA MB 231. Während MDA MB 231-Zellen auf den Substraten C I und FN ausgeprägte Lamellipodia und Pseudopodia ausbilden, weisen MDA MB 468-Zellen teilweise spindelförmige Formen oder wesentlich kleinere Ausläufer an gegenüberliegenden Zellpolen auf (Abb. 9a-f). Einige Zellen zeigten kleine Pseudopodia. Auf dem Matrixsubstrat LN waren bei den MDA MB 468-Zellen kaum Filopodia zu beobachten, die Zellen zeigten eher runde Zellformen auf (Abb. 9g-i). Aufgrund der Zellmorphologie der

MDA MB 468-Zellen, zeigte sich das Verteilungsmuster von CXCR4 nicht sehr ausgeprägt. Es konnten CXCR4-Cluster lokalisiert werden, jedoch nicht in Lamellipodia und nicht in deren Anzahl wie bei der Zelllinie MDA MB 231. Das Verteilungsmuster des Chemokinrezeptors wies Ähnlichkeiten mit dem von MDA MB 231-Zellen auf PLL und/oder LN auf. Bei der Zelllinie MDA MB 468 konnte jedoch ebenfalls nach 30 min ein Beginn der Rezeptorinternalisierung beobachtet werden (Abb. 9 c, f, i).

Eine Kolokalisation dieser CXCR4-Cluster mit der Fokalen Adhäsionskinase (FAK), ein Molekül in Integrin-abhängigen Fokalen Adhäsionen, wurde getestet, um eine direkte Funktion von CXCR4 bei Integrin-vermittelten Fokalen Adhäsionen zu untersuchen. Es konnte jedoch keine direkte Lokalisation beider Moleküle entdeckt werden. Des Weiteren konnte eine Kolokalisation von CXCR4 und Rho A nicht beobachtet werden.

3.4 Die integrinvermittelte Adhäsion der SDF1 α -stimulierten Tumorzellen

Da die Funktionalität von CXCR4 in beiden Zelllinien nachgewiesen werden konnte, und die Verteilung von CXCR4 auf den Zelloberflächen durch integrinabhängiges Zellspreading beeinflusst zu sein schien, wurde als nächstes untersucht, ob die Adhäsionseigenschaften der Zellen durch die Stimulation mit SDF1 α moduliert werden.

Die Adhäsion der Tumorzellen wurde unter statischen Bedingungen auf den Matrixproteinen C I, FN und LN für 30 und 60 min mit Konzentrationen von 25, 50 und 100 ng/ml SDF1 α oder unbehandelt untersucht. Beide Zelllinien zeigten die höchsten Adhäsionsraten auf C I und FN (Abb. 10a, b). Auf LN wurden bei der Zelllinie MDA MB 231 (Abb. 10a) nur moderate Zelladhäsionen beobachtet, währenddessen bei der Zelllinie MDA MB 468 nur schwache Adhäsionen auf LN gemessen werden konnten (Abb. 10b). Die Adhäsionseigenschaften beider Zelllinien waren auf C I und FN signifikant verschieden im Vergleich zu LN (* $p < 0,001$).

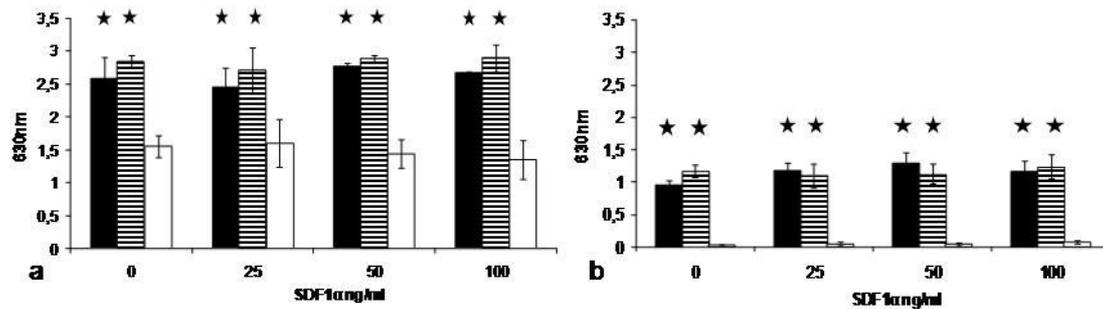


Abbildung 10: Adhäsionseigenschaften der Mammakarzinomzellen: MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b) -Zellen wurden auf C I (■), FN (≡) und LN (□) gesetzt und mit 25, 50 und 100 ng/ml SDF1α stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 30 min wurden die Absorptionen bei 630 nm gemessen. SDF1α modifizierte die Adhäsionseigenschaften beider Zelllinien nicht, jedoch zeigten sich signifikante matrixabhängige Unterschiede (* $p < 0,001$). Die Werte zeigen Mittelwerte \pm STABW für drei unabhängige Experimente.

Die Stimulation mit SDF1α zeigte bei beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die Adhäsion. Die Zelllinie MDA MB 231 wies im Gegensatz zur Zelllinie MDA MB 468 wesentlich stärkere Adhäsionseigenschaften zu den Matrixproteinen auf. Eine Veränderung der Adhäsionsraten nach 60 min konnte im Vergleich zu 30 min nicht festgestellt werden.

Aufgrund der unterschiedlichen matrixabhängigen Adhäsionseigenschaften wurden die Expressionen einiger Integrine der Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Obwohl beide Zelllinien die gleichen Integrin-Untereinheiten exprimierten, zeigten sich Unterschiede in den Expressionslevel. Die Zelllinie MDA MB 231 wies hohe Expressionen von $\alpha 3$, $\alpha 6$ und $\beta 4$ für Adhäsionen an LN auf, hingegen zeigte die Zelllinie MDA MB 468 nur schwache Expressionen dieser Integrin-Untereinheiten. Beide Zelllinien exprimierten stark $\alpha 1$ -Integrine. Die Zelllinie MDA MB 231 exprimierte zusätzlich $\alpha 5$, wohingegen die Zelllinie MDA MB 468 αv -Integrine für Interaktionen mit FN exprimierten. Die Stimulation mit 25 ng/ml SDF1α für 15 min in Einzelzellsuspensionen beider Zelllinien beeinflusste die Integrinexpression nicht.

Integrin-Untereinheit	MDA MB 231	MDA MB 468	Liganden
$\alpha 1$	**	**	C I, LN
$\alpha 2$	*	+	C I, LN
$\alpha 3$	***	*	LN 5+10
$\alpha 5$	*	*	FN
$\alpha 6$	**	*	LN 1+5
αv	**	***	FN
$\beta 4$	*	+	LN

Tab. 9: Die Integrinexpression der Mammakarzinomzellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurden die MFI-Werte der Durchflusszytometrie-Analyse benutzt, um die Expressionsstärke abzuschätzen. (+++ hohe Expression, ++ moderate Expression, + schwache Expression, * kaum Expression)

Die Expressionen der Integrinuntereinheiten korrelierten mit dem Adhäsionsverhalten der Zellen auf den Matrixkomponenten C I, FN und LN. Die Zelllinie MDA MB 468 wies nur schwache Adhäsionen auf LN auf, was mit dem geringen Expressionslevel der Integrinuntereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 6$ korreliert. Die Zelllinie MDA MB 231 hingegen zeigte stärkere Adhäsionen auf LN, was sich durch die höhere Expression der LN-Rezeptoren bestätigen lässt. Die Rezeptoren für C I und FN wurden von beiden Zelllinien moderat bis stark exprimiert und spiegelte sich auch in deren Adhäsionsverhalten auf diesen Matrixkomponenten wider.

3.5 Die SDF1 α -induzierte Migration der Mammakarzinomzellen

Um einen chemotaktischen Einfluss auf die Zellmigration der Tumorzellen zu testen, wurden die Zellen auf matrixbeschichtete Transmigrationsmembranen gesetzt und mit SDF1 α -Konzentrationen von 25, 50 und 100 ng/ml oder unstimuliert Chemokingradienten erzeugt, indem die Zellen durch die Membranen zu der Chemokinquelle wandern mussten. Nach einer 16-stündigen Migrationsdauer wurden die Zellen, die durch die Membranen hindurch gewandert waren, fixiert und gefärbt und anschließend in standardisierten Gesichtsfeldern am Mikroskop ausgezählt.

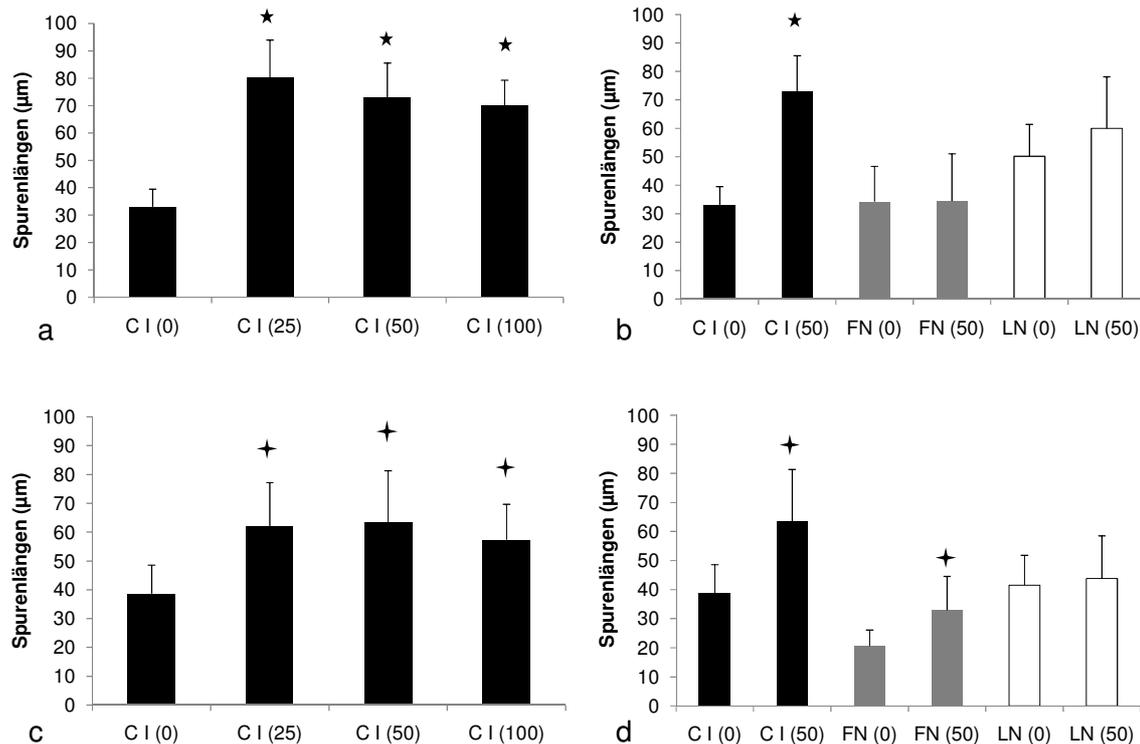


Abbildung 11: In Transmigrationsversuchen zeigten beide Zelllinien MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b) unterschiedliche signifikante chemotaktische Migrationsraten in Abhängigkeit von der EZM und der Chemokinstimulation nach 16 h. Verglichen wurden unstimulierte Zellen (0) mit 50 ng/ml SDF1α behandelten Zellen (50). SDF1α induzierte eine konzentrationsabhängige Migration der MDA MB 231-Zellen (c) auf C I und dieser Effekt wurde durch einen blockierenden CXCR4-Antikörper innerhalb von 4 h gehemmt (d). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± STABW für drei unabhängige Experimente. (* $p < 0,001$).

Eine spontane Migration ohne chemotaktischen Gradienten konnte in beiden Zelllinien MDA MB 231 (Abb. 11a) und MDA MB 468 (Abb. 11b) beobachtet werden. Die Stimulation mit 50 ng/ml SDF1α führte auf allen Matrixproteinen zu einer signifikant erhöhten Migrationsrate der MDA MB 231-Zellen (a). Die Stimulation mit 25 bis 100 ng/ml SDF1α zeigte einen kurvenförmigen Verlauf der Migrationsrate auf C I mit einem Maximum bei 25 ng/ml (c). Höhere Konzentrationen bei 100 ng/ml SDF1α senkten das Migrationspotential der Zellen auf dem Level unbehandelter Zellen (c). Bei der Zelllinie MDA MB 468 (b) zeigte sich eine signifikante chemotaktische Antwort auf SDF1α, wenn die Zellen auf C I ausplattiert wurden. Die Zelllinie MDA MB 468 zeigte im Vergleich zur Zelllinie MDA MB 231 nur geringe Migrationsraten und keine chemotaktische Reaktion auf LN (b), was sich durch schwache Adhäsionen auf LN aufgrund einer geringen Expression der spezifischen Integrinuntereinheiten begründen lässt. Um eine spezifische chemotaktische Antwort auf SDF1α-Gradienten zu bestätigen, wurde ein blockierender CXCR4-Antikörper direkt zu den Zellen gegeben, der die Migrationsrate signifikant innerhalb von vier Stunden zu senken vermochte (d). Des Weiteren zeigten

Transmigrationsversuche mit diffuser Stimulation beider Zelllinien, dass die Migrationsraten sich im Vergleich zu unstimulierten Zellen kaum erhöhten.

3.6 SDF1 α beeinflusst die Motilität der Mammakarzinomzellen

Da Transmigrationsversuche nur die Untersuchungen von Summendaten großer Zellanzahlen über lange Beobachtungsdauern von bis zu 16 h erlauben, bietet die Zeitraffermikroskopie die Möglichkeit die Motilität einzelner Zellen über kurze Zeitdauern von z.B. einer Stunde zu beobachten. Des Weiteren kann der Einfluss diffuser Chemokinstimulation auf die Zellbewegungen direkt beobachtet werden.

Die Zellen wurden über eine Stunde in Intervallen von 30 sec photographiert. Die Auswertung der Filme erfolgte mithilfe einer Zelltracking-Software, mit der es möglich ist zurückgelegte Spurenlängen einzelner Zellen zu bestimmen (Abb. 12 a).

Die Zelllinie MDA MB 231 bildete auf C I ausgeprägte Lamellipodia aus und die Zellen wurden durch Stimulation mit SDF1 α motiler und zeigten gerichtete Zellbewegungen (Abb. 12 a). Auf FN bildeten die Zellen dieser Zelllinie kleinere Lamellipodia, aber Zellfortsätze besonders bei 25 ng/ml SDF1 α aus. Hingegen zeigte sich auf LN eine veränderte Zellmorphologie. Die Zellen nahmen spindelförmige Zellformen an und bildeten Filopodia aus (Abb. 13a). Auf C I und LN waren die MDA MB 231-Zellen signifikant motiler als auf FN (* $p < 0,001$).

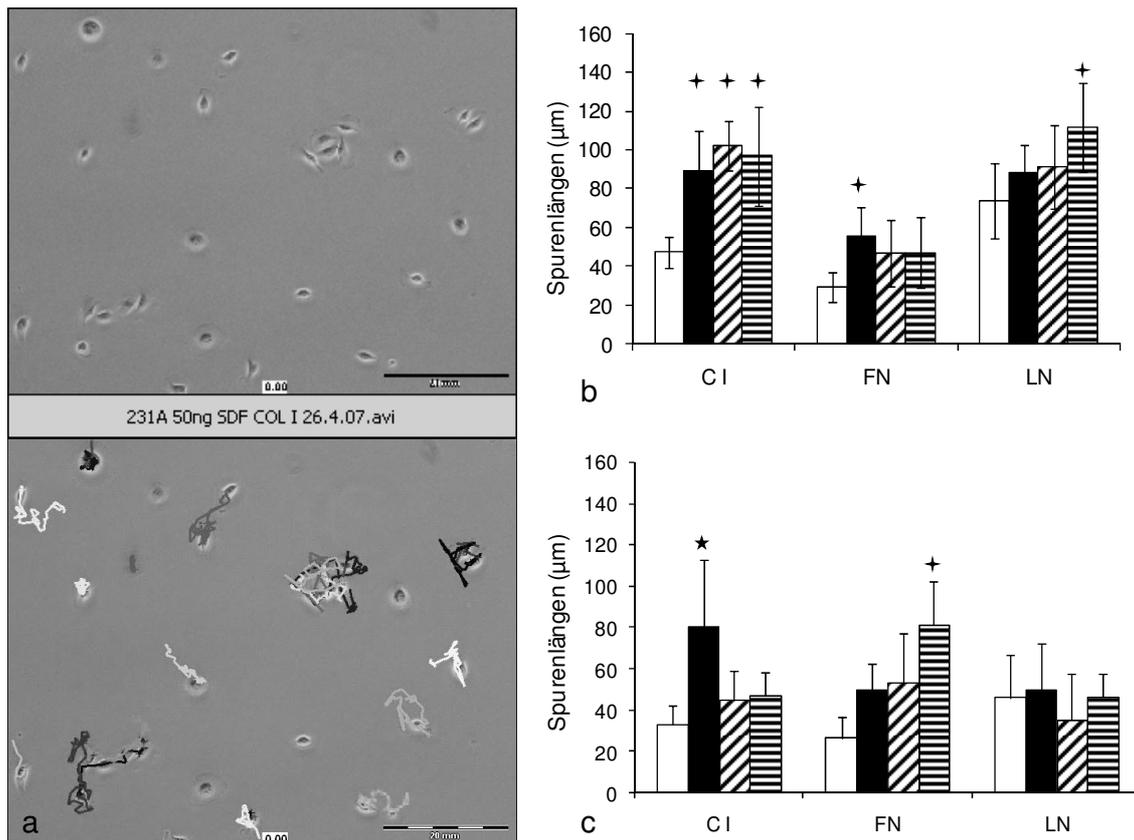


Abbildung 12: Mit Zeitraffermikroskopie wurden die Zellen lebend für eine Stunde beobachtet und deren Spurenlängen wurden mithilfe einer Zelltracking-Software (Cell-D®) bestimmt (a). MDA MB 231 (b) und MDA MB 468 (c) –Zellen zeigten unterschiedliche Motilitäten in Abhängigkeit von SDF1 α und der EZM. (□ unstimuliert, ■ 25ng/ml, /// 50ng/ml und ≡ 100ng/ml SDF1 α ; +p < 0,05; *p < 0,001). Diese Ergebnisse zeigen Mittelwerte \pm STABW für drei unabhängige Experimente. Für die statistische Analyse wurde die konzentrationsabhängige Migration mit unstimulierten Zellen verglichen.

Die niedrigmetastatischen MDA MB 468-Zellen entwickelten auf C I und FN nur kleine Filopodia, sog. Microspikes aus. Auf C I bildeten sie keine Lamellipodia aus und auf FN konnte eine Elongation der Zellen beobachtet werden. Bei einer Stimulation von 100 ng/ml SDF1 α konnte jedoch eine beginnende Lamellipodia-Ausbildung beobachtet werden. Im Gegensatz zur Zelllinie MDA MB 231 fand kein Zellspreading auf LN statt (Abb. 13b).

In Vorversuchen der Arbeitsgruppe wurden zur Quantifizierung zunächst die Zelloberflächen, Umfänge der Zellen, verschiedene Zelldurchmesser, Spurenlängen und Anzahl der Membranruffles im Vergleich stimulierter und unstimulierter Zellen bestimmt. All diese Parameter zeigten jedoch hohe Variabilitäten zwischen den einzelnen Zellen, so dass nur die Spurenlängen als einziger reproduzierbarer Parameter zur weiteren Analyse bestimmt wurden.

Beide Zelllinien zeigten ohne Chemokinstimulation ähnliche Grundmotilitäten, jedoch wies die Zelllinie MDA MB 231 bei Chemokinstimulation eine höhere Zellmotilität mit längeren Spurenlängen in der Beobachtungsperiode gegenüber der Zelllinie MDA MB 468 auf. Mit Chemokinstimulation, zeigten beide Zelllinien auf C I ähnliche Erhöhungen der Motilität, jedoch mit unterschiedlichen Konzentrationsabhängigkeiten (Abb. 12b, c). Auf LN reagierten nur die MDA MB 231-Zellen auf SDF1 α , während MDA MB 468-Zellen nur auf FN eine stimulierte Motilität erkennen ließen. Ähnliche Beobachtungen wurden in den Transmigrationsversuchen gemacht.

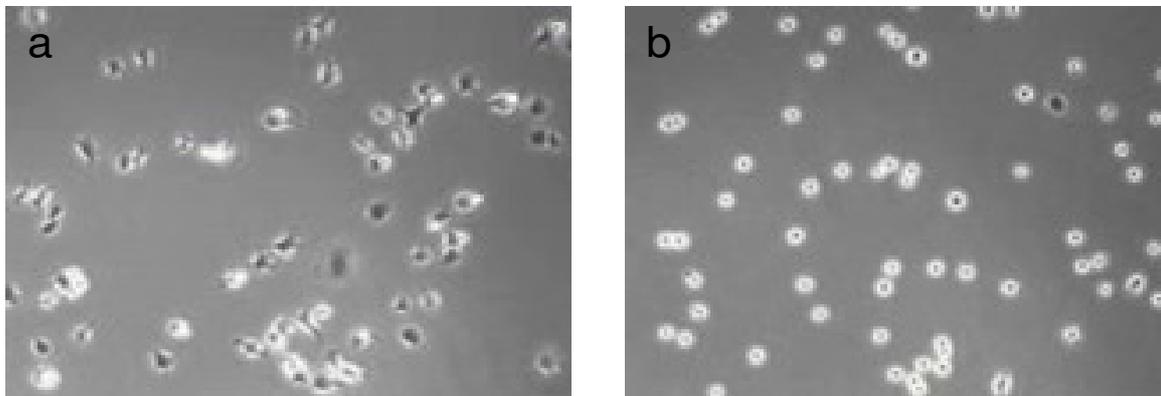


Abbildung 13: Zeitrafferaufnahmen der Zelllinien MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b) für eine Stunde. Die Zellen wurden auf LN ausplattiert und mit 50 ng/ml SDF1 α stimuliert. Gezeigt sind Bilder der Videoaufnahmen. Deutlich sind die unterschiedlichen Zellmorphologien zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen.

II. Die Rolle von CCR7 beim Mammakarzinom

Neben CXCR4 und dessen Liganden SDF1 α , spielen auch CCR7 und die Liganden MIP3 β und 6CKine eine wichtige Rolle bei der organspezifischen Metastasierung des Mammakarzinoms. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Chemokinliganden MIP3 β auf die Adhäsion und Migration zweier Mammakarzinomzelllinien untersucht, da der Einfluss von MIP3 β auf die Tumorzellmigration und –adhäsion nur wenig bisher untersucht worden ist.

3.7 Die Zelloberflächenexpression von CCR7

Zunächst wurde die Zelloberflächenexpression des Chemokinrezeptor CCR7 in den Zelllinien MDA MB 231 (Abb. 14a) und MDA MB 468 (Abb. 14b) mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

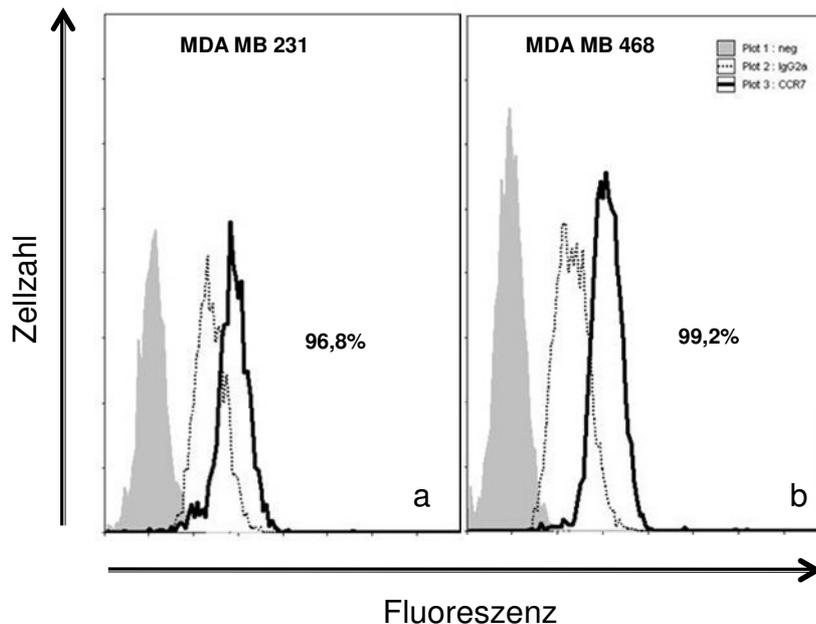


Abbildung 14: Die Zelloberflächenexpression von CCR7 wurde in den Zelllinien MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Gezeigt sind die Überlagerungshistogramme der ungefärbten Zellen (grau ausgefüllt), der Isotypkontrolle (gestrichelt) und der CCR7-Expression (schwarz). Die CCR7-positiven Zellen sind in Prozent angegeben.

Beide Zelllinien zeigten eine hohe Expression von CCR7 auf der Zelloberfläche. Die Zelllinie MDA MB 231 wies 96,8 % CCR7-positive Zellen (MFI: 3,0) auf. Bei der Zelllinie MDA MB 468 waren 99,2 % der Zellen CCR7-positiv (MFI: 3,75).

3.8 Überprüfungen der Funktionalität von CCR7 durch Signaltransduktion der kleinen Rho-GTPasen

Zur Überprüfung der Funktionalität von CCR7 wurden die Aktivierungen der Rho-GTPasen Rho A, Rac1 und Cdc42 in Abhängigkeit von der Stimulation mit MIP3 β untersucht. Zuerst wurden Zellsuspensionen mit MIP3 β -Konzentrationen von 25, 50 und 100 ng/ml für 15 min behandelt und anschließend Zelllysate hergestellt. Zum Vergleich

wurden unstimulierte Zellen lysiert. Die Aktivierungen der GTPasen wurden mittels Pull down Assays (Western Blot) untersucht.

a MDA MB 231									Zelllinie	b MDA MB 468									Zelllinie			
GTP				total				Suspension	MIP3β in ng/ml	GTP				total				Suspension	MIP3β in ng/ml			
0	25	50	100	0	25	50	100		0	25	50	100	0	25	50	100		0	25	50	100	
									Rho-GTP										Rho-GTP			
									Rac-GTP										Rac-GTP			
									Cdc42-GTP										Cdc42-GTP			

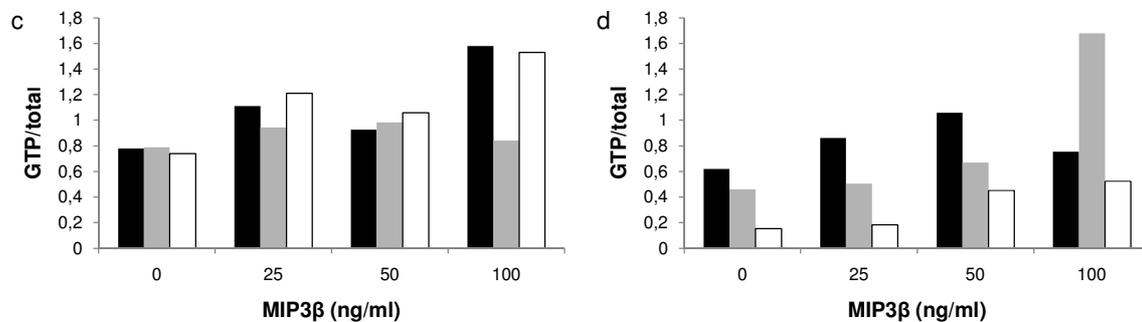


Abbildung 15: MIP3β induziert eine konzentrationsabhängige Aktivierung der Rho-GTPasen in Zellsuspensionen der Zelllinien MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b). Die Aktivierungen der GTPasen wurden mittels Pull down Assays und anschließenden Western Blots nachgewiesen. Bei den densitometrischen Analysen der Western Blots für die Zelllinien MDA MB 231 (c) und MDA MB 468 (d) wurden die Signale der aktivierten Proteine (GTP) mit denen der Gesamtproteine (total) verglichen. Rho A (schwarz); Rac (grau); Cdc42 (weiß)

Auch bei der Behandlung mit MIP3β, konnte bei den Mammakarzinomzellen eine integrinunabhängige gesteigerte Aktivierung der Rho-GTPasen im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 15). Bei der Zelllinie MDA MB 231 wurde eine gesteigerte Rho- und Cdc42-Aktivierung mit zunehmender Chemokinkonzentration beobachtet. Die Rac-Aktivierung wurde hingegen kaum durch MIP3β beeinflusst (Abb. 15a).

Bei der Zelllinie MDA MB 468 (Abb. 15b) wurden die Aktivierungen von Rac und Cdc42 mit zunehmender Chemokinkonzentration gesteigert. Bei Rho A zeigte sich ein Maximum bei 50 ng/ml MIP3β.

Als nächstes wurde die Chemokin-induzierte Aktivierung der GTPasen in Abhängigkeit der EZM untersucht. Das Matrixprotein C I wurde als Beispiel gewählt, um eine

konzentrations- und integrinabhängige Aktivierung der GTPasen Rho und Rac zu untersuchen.

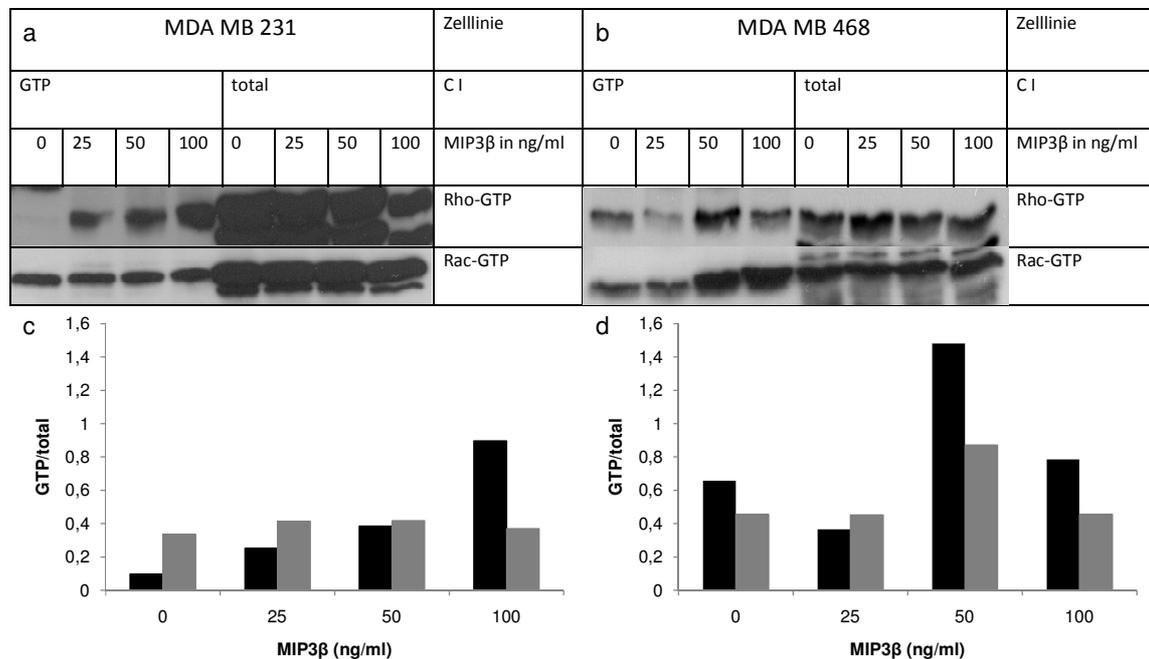


Abbildung 16: MIP3β induziert eine konzentrationsabhängige Aktivierung der Rho-GTPasen der Zelllinien MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b), wenn die Zellen auf C I ausplattiert wurden. Die Aktivierungen der GTPasen wurden mittels Pull down Assays und anschließenden Western Blots nachgewiesen. Bei den densitometrischen Analysen der Western Blots für die Zelllinien MDA MB 231 (c) und MDA MB 468 (d) wurden die Signale der aktivierten Proteine (GTP) mit denen der Gesamtproteine (total) verglichen. Rho (schwarz); Rac (grau)

Bei der Zelllinie MDA MB 231 zeigte sich mit zunehmender Chemokinkonzentration eine gesteigerte Rho-Aktivierung, während die Aktivierung von Rac nur leicht von MIP3β beeinflusst wurde (Abb. 16a). Bei der Zelllinie MDA MB 468 zeigten beide GTPasen ein Maximum der Aktivierung bei 50 ng/ml (Abb. 16b).

3.9 Zelloberflächenverteilung von CCR7 in Abhängigkeit von der EZM

Die Verteilung des Chemokinrezeptors CCR7 wurde durch immunzytochemische Färbungen nachgewiesen. Die Expression von CCR7 auf der Zelloberfläche der Tumorzellen wurde in Abhängigkeit der Matrixkomponenten C I, FN und LN untersucht. Als Integrin-unspezifisches Substrat wurde PLL verwendet.

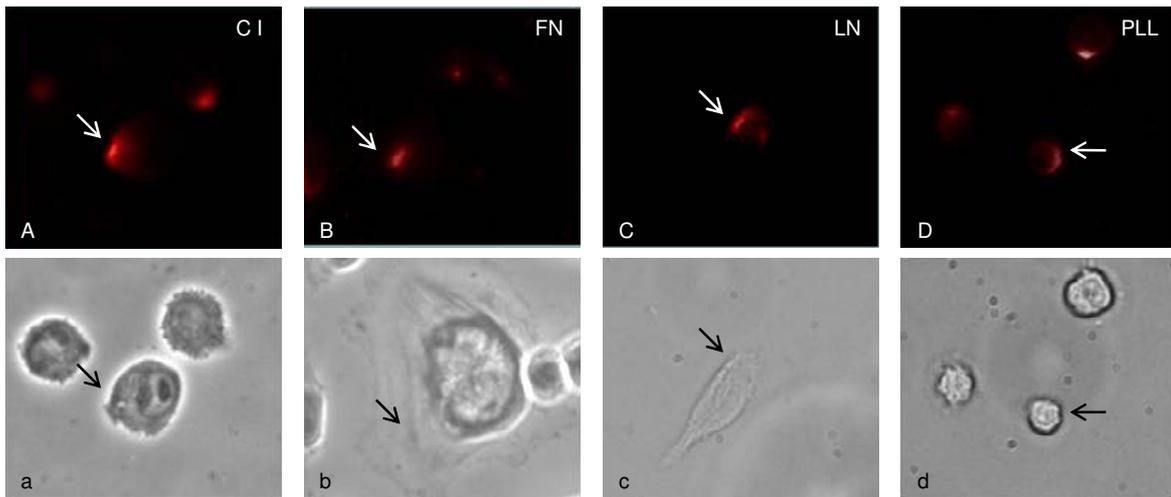


Abbildung 17: Die Verteilung von CCR7 wurde auf den Zelloberflächen der MDA MB 231-Zellen immunzytochemisch mit einem anti-CCR7-Antikörper nachgewiesen. Die Zellen wurden auf CI (A, a), FN (B, b), LN (C, c) und PLL (D, d) gesetzt und mit einem anti-CCR7-Antikörper (rot) gefärbt. Phasenkontrastbilder (a-d) dienen zur besseren Orientierung. Pfeile weisen auf die Lokalisation von CCR7 auf der Zelloberfläche hin. Vergrößerung 400x

Im Gegensatz zur Clusterbildung von CXCR4, zeigte sich für CCR7 ein anderes Expressionsmuster auf den Zelloberflächen der Tumorzellen. Unabhängig auf welchem Substrat die Zellen ausplattiert wurden, war die Lokalisation von CCR7 einseitig und polarisiert auf den Zelloberflächen der MDA MB 231-Zellen zu sehen. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Ausbildungen von Lamellipodia (siehe Abb. 17 B, b) keinen Einfluss auf die Verteilung des Rezeptors bewirkten. Clusterbildungen des Chemokinrezeptors oder Verteilungen entlang des Zellsaumes konnten nicht beobachtet werden. Die polarisierte Lokalisation von CCR7 an der führenden Frontseite der Zellen könnte auf eine Involvierung von CCR7 bei der Zellmigration hinweisen. Die Behandlung der Zellen mit MIP3 β zeigte keinen Einfluss auf die Rezeptorverteilung.

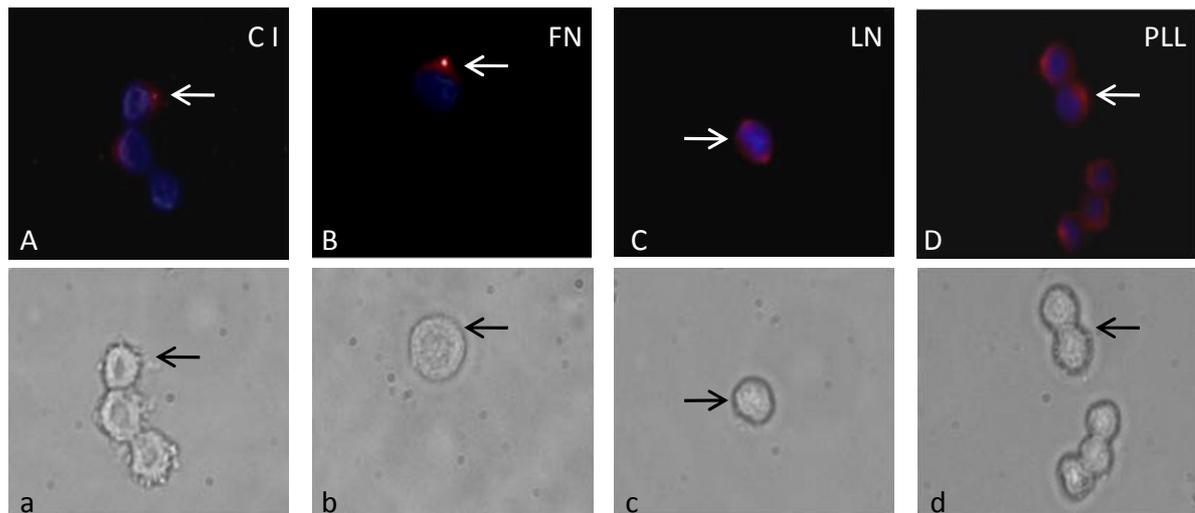


Abbildung 18: Immunzytochemische Markierungen der Zelllinie MDA MB 468. MDA MB 468-Zellen wurden auf C I (A, a), FN (B, b), LN (C, c) und PLL (D, d) ausgesät und mit einem anti-CCR7-Antikörper (rot) gefärbt. Die Zellkerne (blau) wurden zur besseren Orientierung markiert. Phasenkontrastbilder (a-d) dienen zur besseren Lokalisierung von CCR7 auf der Zelloberfläche. Pfeile weisen auf CCR7-Markierungen hin. Vergrößerung 400x

MDA MB 468-Zellen (Abb. 18) wiesen auf den verschiedenen Substraten, ähnlich wie die Zelllinie MDA MB 231, keine matrixabhängigen Verteilungen von CCR7 auf den Zelloberflächen auf. Es zeigten sich auch bei dieser Zelllinie ein- bzw. zweiseitige Lokalisation von CCR7. Bei der Zelllinie MDA MB 468 konnten zum großen Teil nur runde Zellformen und Fehlen von Lamellipodia beobachtet werden. Die Markierungen der Zellkerne zeigten, dass die Zellkerne den größten Teil der Zellkörper ausmachten.

3.10 Die integrinvermittelte Adhäsion der MIP3 β -stimulierten Tumorzellen

Nachdem eine Funktionalität von CCR7 nachgewiesen werden konnte, wurde getestet, ob der Ligand MIP3 β die Adhäsionseigenschaften der Tumorzellen modulieren kann. Die Zellen wurden auf den Matrixkomponenten C I, FN und LN ausgesät und für 30 oder 60 min mit Konzentrationen von 25, 50 und 100 ng/ml MIP3 β stimuliert. Im Vergleich dazu wurden die Adhäsionen unstimulierter Zellen getestet.

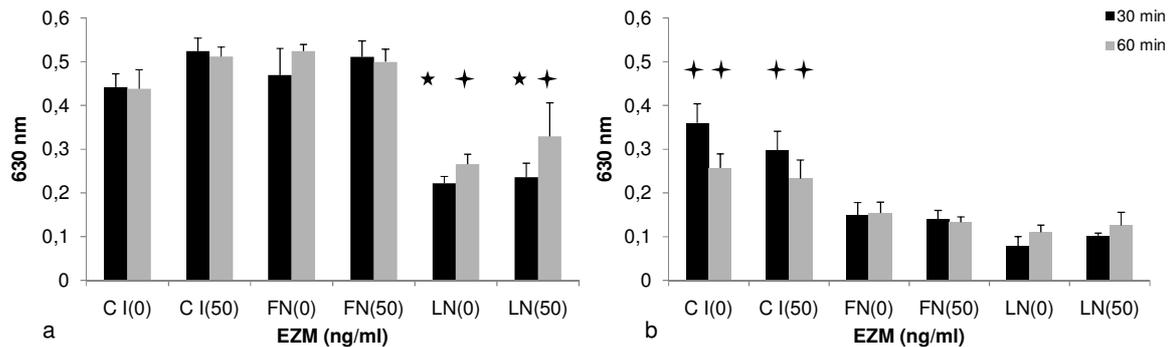


Abbildung 19: Adhäsionseigenschaften der Mammakarzinomzellen: MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b) -Zellen wurden auf C I, FN und LN ausplattiert und mit 25, 50 und 100 ng/ml SDF1 α stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 30 min und 60 min wurden die Absorptionen bei 630 nm gemessen. MIP3 β modifizierte die Adhäsionseigenschaften beider Zelllinien nicht, jedoch zeigten sich signifikante matrixabhängige Unterschiede (* $p < 0,001$; + $p < 0,05$). Beispielhaft wurden nur die unstimulierten (0) den mit 50 ng/ml (50) stimulierten Zellen gegenübergestellt. Die Adhäsionen nach 30 min (schwarz) unterscheiden sich von denen nach 60 min (grau) nicht. Die Werte zeigen Mittelwerte \pm STABW für drei unabhängige Experimente.

Auf den Matrixkomponenten C I und FN wiesen die MDA MB 231-Zellen (Abb. 19a) hohe Adhäsionen im Vergleich zu LN auf. Auf LN adhärten die Zellen nur moderat. Die Zelllinie MDA MB 468 (Abb. 19b) zeigte im Gegensatz zur Zelllinie MDA MB 231 geringere Adhäsionen. Die stärksten Adhäsionen dieser Zellen waren auf C I zu beobachten. Auf FN und LN konnten nur schwache Adhäsionen der MDA MB 468-Zellen nachgewiesen werden.

Bei beiden Zelllinien war keine Modifizierung der Adhäsionen durch MIP3 β zu beobachten. Des Weiteren konnte kein Unterschied zwischen den Adhäsionsdauern von 30 und 60 min gemessen werden.

3. 11 Die MIP3 β -induzierte Migration der Mammakarzinomzellen

Obwohl keine Modifizierung der Adhäsionseigenschaften durch MIP3 β beobachtet werden konnte, wurde die Transmigration der Zellen in Abhängigkeit von der EZM und MIP3 β -Konzentrationen getestet. Die Zellen wurden auf mit C I-, FN- und LN-beschichteten Transmigrationsmembranen gesetzt und MIP3 β -Konzentrationen in die unteren Kammern der Migrationseinheiten gegeben. Nach 16 h wurden die an der Unterseite der Membranen haftenden Zellen gefärbt und 16 Gesichtsfelder pro Membran ausgezählt.

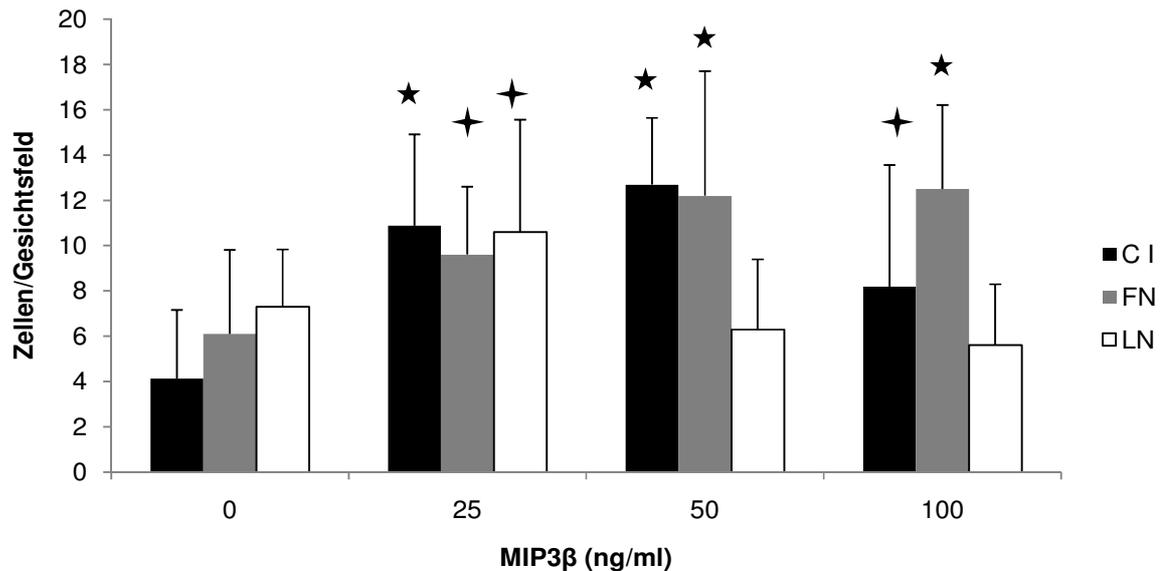


Abbildung 20: In Transmigrationsversuchen zeigte die Zelllinie MDA MB 231 unterschiedliche signifikante chemotaktische Migrationsraten in Abhängigkeit von der EZM (C I, FN, LN) und der Chemokinstimulation nach 16 h. Verglichen wurden unstimulierte Zellen (0) mit Chemokin-behandelten Zellen (25, 50, 100 ng/ml). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm STABW für drei unabhängige Experimente. (* $p < 0,001$; + $p < 0,05$).

Die Migrationsrate der MDA MB 231-Zellen wurde durch die Behandlung mit MIP3 β signifikant erhöht. Auf den Substraten C I und LN zeigten die Zellen einen kurvenförmigen Verlauf in Abhängigkeit von der Chemokinkonzentration. Auf C I war ein Maximum der Migration bei 50 ng/ml MIP3 β zu beobachten. Bei LN zeigte sich das Maximum der Migrationsrate bei 25 ng/ml, während die Zellen auf FN mit steigender Konzentration an MIP3 β vermehrt durch die Membranen wanderten. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen stiegen die Migrationsraten der stimulierten Zellen signifikant an (* $p < 0,001$ und + $p < 0,05$). Dieser Prozess zeigte Abhängigkeiten von der EZM. Die Abnahme der Migration bei höheren Konzentrationen deutet auf Sättigung des Rezeptors hin.

Bei der Zelllinie MDA MB 468 (Abb. 21a) waren nur moderate Migrationsraten zu beobachten. Oft waren die Zellen nicht fähig innerhalb von 16 h durch die Membranen durchzuwandern, so dass keine Auswertungen vorgenommen werden konnten. Auf C I konnte keine signifikante Erhöhung der Migration durch MIP3 β im Vergleich zur Zelllinie MDA MB 231 beobachtet werden (Abb. 21a). Da die MDA MB 468-Zellen oft während des Migrationsprozesses apoptotisch wurden, wurden weitere Untersuchungen nur mit der Zelllinie MDA MB 231 durchgeführt.

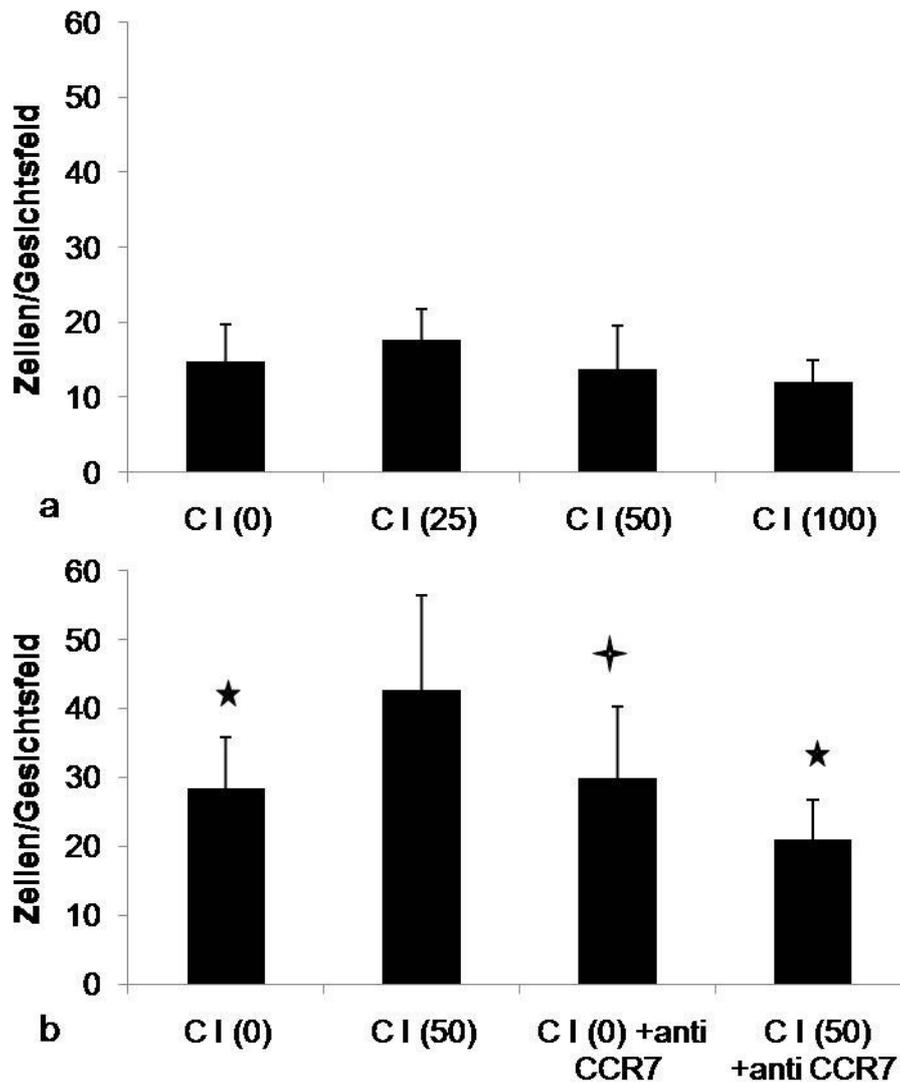


Abbildung 21: Die Transmigrationsversuche der Zelllinie MDA MB 468 (a) zeigten keine signifikante Erhöhung der Migrationsrate in Abhängigkeit von MIP3 β . Die chemotaktische Antwort der MDA MB 231-Zellen (b) wurde durch Zugabe eines blockierenden anti-CCR7-Antikörpers signifikant gehemmt. Bei der statistischen Analyse wurden signifikante Unterschiede zu stimulierten Zellen mit 50 ng/ml MIP3 β festgestellt. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte \pm STABW für drei unabhängige Experimente. (* $p < 0,001$; + $p < 0,05$).

Um die chemotaktische Wirkung von MIP3 β zu testen, wurde ein blockierender anti-CCR7-Antikörper direkt zu den Zellen gegeben und die chemotaktische Migration der MDA MB 231-Zellen in einem Zeitraum von vier Stunden beobachtet (Abb. 21b). Durch die Interaktion des Antikörpers mit dem Chemokinrezeptor auf den Zelloberflächen, wurde die chemotaktische Antwort der Zellen gehemmt, was in einer signifikant reduzierten Migrationsrate resultierte (Abb. 21b).

3.12 MIP3 β beeinflusst die Motilität der Mammakarzinomzellen

Um den Einfluss von MIP3 β auf die Zellmotilität zu untersuchen, wurden Zeitrafferaufnahmen von einer Stunde von den Zellen aufgenommen. Die Zellmotilität der Mammakarzinomzellen wurde auf den Substraten C I, FN und LN untersucht. Der Einfluss diffuser Stimulation mit 25, 50 und 100 ng/ml MIP3 β auf die Zellmotilität wurde mit der Grundmotilität der Zellen verglichen. Als quantitativer Parameter wurde die zurückgelegte Spurenlänge der Zellen mit der Zelltracking-Software Cell-D® bestimmt.

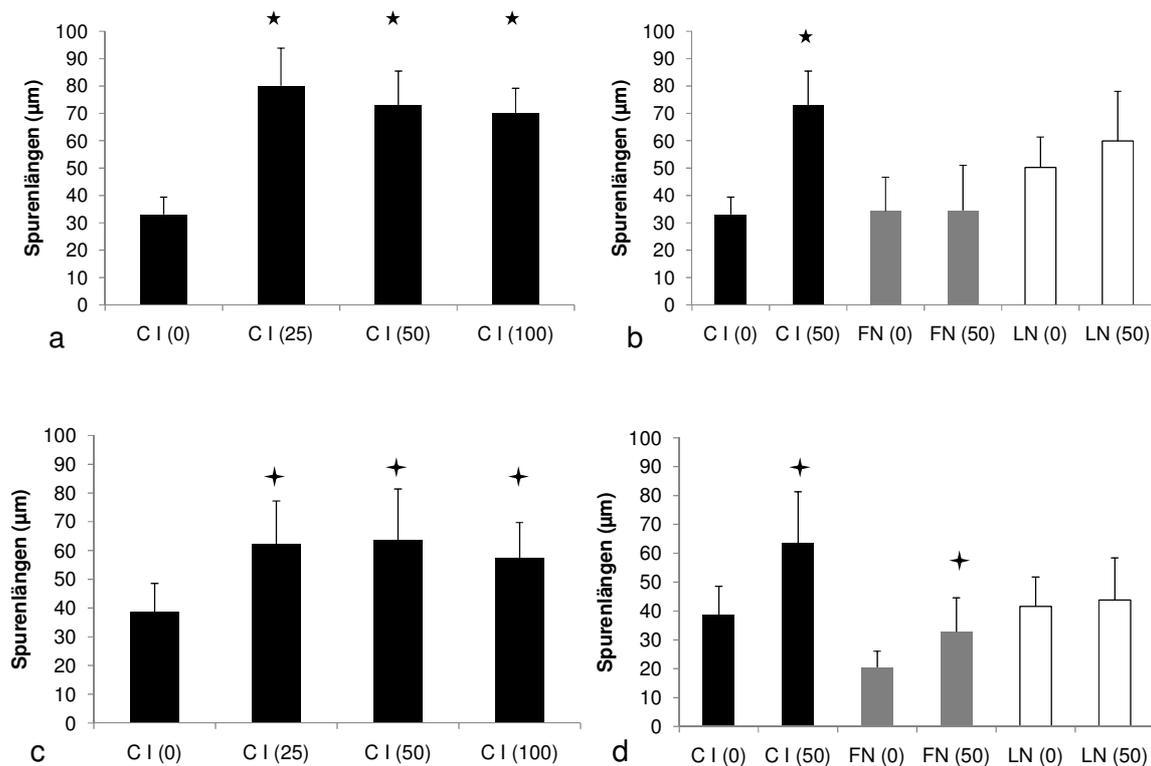


Abbildung 22: Zeitrafferaufnahmen der Zelllinien MDA MB 231 (a, b) und MDA MB 468 (c, d) wurden in Abhängigkeit der MIP3 β -Konzentrationen auf C I (a, c) und in Abhängigkeit der EZM (b, d) aufgenommen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm STABW für drei unabhängige Experimente dargestellt. (* $p < 0,001$; + $p < 0,05$).

Beide Zelllinien zeigten signifikant erhöhte Zellmotilitäten auf C I (Abb. 22 a, c). Eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Zellmotilität konnte bei beiden Zelllinien nicht beobachtet werden. Es zeigten sich im Wesentlichen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Chemokinkonzentrationen. Die Zelllinie MDA MB 231 wies höhere Motilitäten gegenüber den MDA MB 468-Zellen auf und zeigte ausgeprägte Filopodia und Lamellipodia. Auf den Substraten FN und LN wurden beispielhaft nur unbehandelte Zellen mit stimulierten Zellen einer Konzentration (50 ng/ml) verglichen. Es zeigten sich bei

beiden Zelllinien (b, d) kaum signifikante Veränderungen der Spurenlängen. Die MDA MB 231-Zellen waren auf LN motiler als MDA MB 468-Zellen, die nur leicht adhärten und sich in einem „Zitterzustand“ befanden, aufgrund fehlender gerichteter Zellmotilität. Des Weiteren wurde auch bei Stimulation mit MIP3 β keine Podienausbildung bei MDA MB 468-Zellen beobachtet. Es zeigte sich eine deutliche Matrixabhängigkeit bei der Chemokin-induzierten Motilität der Tumorzellen, da auf C I signifikante Zunahmen der Zellmotilitäten im Vergleich zu FN und LN beobachtet werden konnte. Da der Beobachtungszeitraum nur eine Stunde betrug, ließen sich nur initiale Migrationsbewegungen der Zellen untersuchen.

III. Untersuchung beteiligter Signalwege bei der Chemokin-induzierten Zellmigration

Untersuchungen der Migrationseigenschaften der Mammakarzinomzellen zeigten, dass die Stimulation der Zellen mit den Chemokinliganden SDF1 α und MIP3 β zu signifikant erhöhten Migrationsraten und Zellmotilitäten führten. Bei beiden Chemokinen wurden konzentrations- und matrixabhängige induzierte Migrationen der Tumorzellen beobachtet.

Als nächster Schritt interessierte die Frage, welche Signalmoleküle bzw. welche Signalwege beim Prozess der Chemokin-induzierten Migration involviert sind. Es wurden drei Schlüssel-moleküle, die bei der Zellmigration eine Rolle spielen, mit chemischen Inhibitoren gehemmt und die Migration stimulierter Zellen in Transmigrationsversuchen und mit zeitraffermikroskopischen Aufnahmen untersucht.

Es wurden die ROCK-, Src- und PI3-Kinase mit entsprechenden Inhibitoren gehemmt. Die Src-Kinase wurde gewählt, da sie eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion ins Zellinnere bei Integrin-vermittelten Signalwegen spielt. Src interagiert, nach Integrinclustering, mit FAK in Fokalen Adhäsionen und vermittelt Signalprozesse wie Zellspreading, Motilität, Migration, Zellwachstum, Differenzierung und Überleben (134, 135). Die PI3-Kinase ist bei chemotaktischen Migrationsprozessen durch z. B. SDF1 α und bei der Zell-Polarisation beteiligt (136). Die Rho-Kinase ROCK vermittelt Rho-Signale, die das Aktinzytoskelett regulieren. Des Weiteren sind Interaktionen von Src und Rho/ROCK bekannt. Die Untersuchungen dieser Signalmoleküle, die bei Integrin-vermittelten und/oder Chemokin-vermittelten Signalprozessen beteiligt sind, versprechen erste Hinweise bei Interaktionen von Integrinen und Chemokinen zu erhalten.

3.13 Die Chemokin-induzierte Migration der Mammakarzinomzellen

Zur Untersuchung beteiligter Signalwege wurden in Transmigrationsversuchen die Zellen auf C I-beschichteten Membranen gesetzt und mit Inhibitoren für Src (Src-Inhibitor I) und PI3K (Wortmannin) behandelt. Es wurden unstimulierte Zellen mit chemotaktisch stimulierten Zellen (50 ng/ml SDF1 α) verglichen.

Die Migration beider Zelllinien (Abb. 23a, b) wurden durch die Zugabe eines Src-Inhibitors und PI3K-Inhibitors gehemmt. Bei der Zelllinie MDA MB 231 (a) wurden die Migrationsraten wesentlich stärker gehemmt als zum Vergleich bei den MDA MB 468-Zellen (b), die insgesamt deutlich niedrigere Migrationen zeigten. Durch die Zugabe von SDF1 α wurden die Migrationsraten der Zellen signifikant erhöht.

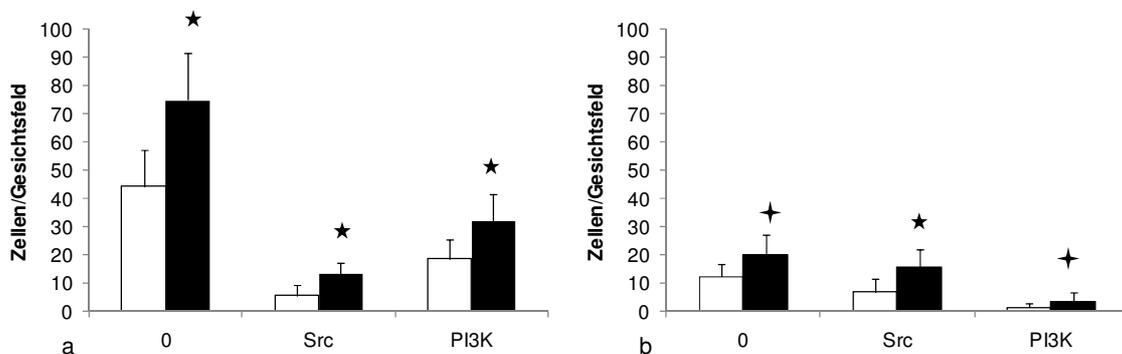


Abbildung 23: Die Zellen MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b) wurden auf C I- beschichteten Membranen gesetzt und die Migration nach 16 h ausgewertet. Die Zellen wurden entweder mit 44 nM Src-Inhibitor oder 5nM Wortmannin zur Hemmung der PI3K behandelt, verglichen zu unbehandelten Zellen (0). Es wurden Chemokingradienten, durch Zugabe von 50 ng/ml SDF1 α (schwarz) in die unteren Einheiten der Migrationskammern, erstellt. Im Vergleich dazu wurde kein Chemokin hinzugegeben (weiß). Es wurden Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente aufgetragen. Stimulierte Zellen wurden mit den unstimulierten Zellen verglichen (* $p < 0,001$; + $p < 0,05$).

3.14 Die Chemokin-induzierte Zellmotilität der Mammakarzinomzellen

Für Zeitrafferaufnahmen unter dem Mikroskop wurden die Zellen für eine Stunde vorher mit den Inhibitoren für Src (Src-Inhibitor I) und ROCK (Y-27632) in Kultur inkubiert. Es wurden Aufnahmen unstimulierter Zellen mit SDF1 α - und MIP3 β -stimulierter Zellen verglichen.

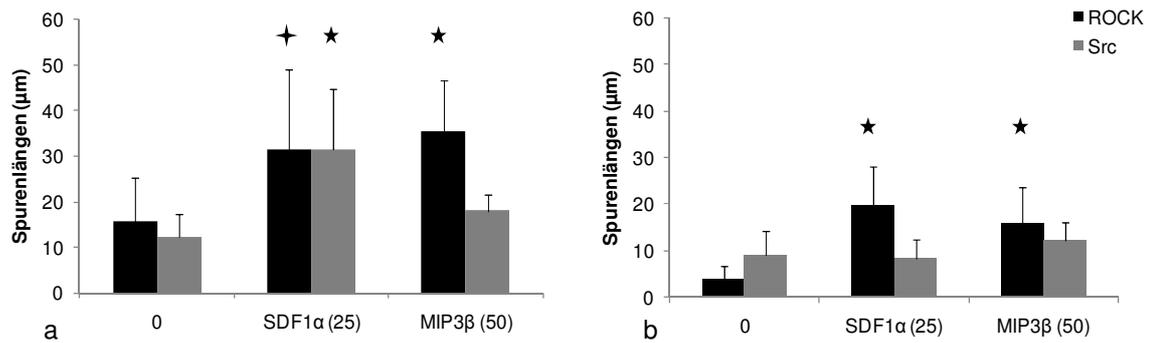


Abbildung 24: Zeitrafferaufnahmen der Zelllinie MDA MB 231 (a) und MDA MB 468 (b) nach einstündiger Inhibition von ROCK (schwarz) und Src (grau). Die Zellen wurden entweder mit 25 ng/ml SDF1α oder mit 50 ng/ml MIP3β stimuliert. Unstimulierte Zellen (0) dienten als Kontrollen. Es wurden die stimulierten Zellen jeweils mit den unstimulierten Zellen verglichen (* $p < 0,001$; + $p < 0,05$).

In beiden Zelllinien wurden durch die Inhibition von Src oder ROCK reduzierte Zellmotilitäten im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 12, 22) beobachtet.

Im Vergleich zu unstimulierten Zellen, war bei der Zelllinie MDA MB 231 (Abb. 24a) durch Stimulation mit SDF1α oder MIP3β eine signifikant verstärkte Motilität der Zellen zu beobachten. Die Effekte von den Src- und ROCK-Inhibitoren waren fast gleich. Bei der Stimulation mit MIP3β wurde hingegen nur die durch den ROCK-Inhibitor gehemmte Migration wieder erhöht. Die Inhibition von Src konnte durch Stimulation mit MIP3β nicht aufgehoben werden. Durch die Stimulation mit den Chemokinliganden wurden die Basallevels unbehandelter Zellen erreicht. Bei der Zelllinie MDA MB 468 (Abb. 24b) konnte durch die Chemokine keine erhöhte Motilität nach Inhibition von Src beobachtet werden. Bei der Hemmung von ROCK, konnte der Inhibitionseffekt durch Stimulation mit SDF1α und MIP3β signifikant behoben werden.

Im Allgemeinen wurde bei der hochmetastatischen Zelllinie MDA MB 231 (Abb. 23 und 24a) durch die Stimulation mit beiden Chemokinliganden eine signifikante erhöhte Migration bzw. Motilität der Zellen nach Hemmung von Src, PI3K und ROCK beobachtet. Bei der Zelllinie MDA MB 468 (Abb. 23 und 24b) wurde jeweils nur ein geringfügiger Effekt beobachtet und die Migrationsraten waren im Vergleich wesentlich geringer.

Betrachtete man die Zellmorphologien (Abb. 25), so wurden sichtbare Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien deutlich. Bei der Hemmung von ROCK wurden die Aktin-Stressfasern abgebaut und Fokale Adhäsionen wurden nicht gebildet. Die Hemmung von Src hatte auch einen Einfluss auf die Ausbildung von Fokalen Adhäsionen und Signalwegen, die die Migration steuern. Bei der Zelllinie MDA MB 231 (Abb. 24a, b) konnten missgebildete Stressfasern und die Abnahme vom Zellspreading durch die

Hemmung von ROCK und Src beobachtet werden. Bei der Zelllinie MDA MB 468 (Abb. 24c, d) zeigten sich hauptsächlich runde Zellformen, Filopodia-Ausbildungen konnten kaum beobachtet werden. Bei beiden Zelllinien konnten nach Behandlung mit ROCK- und Src-Inhibitoren und Stimulation mit SDF1 α und MIP3 β nur geringe Zellfortbewegungen beobachtet werden (siehe farbige Spuren in Abb. 25).

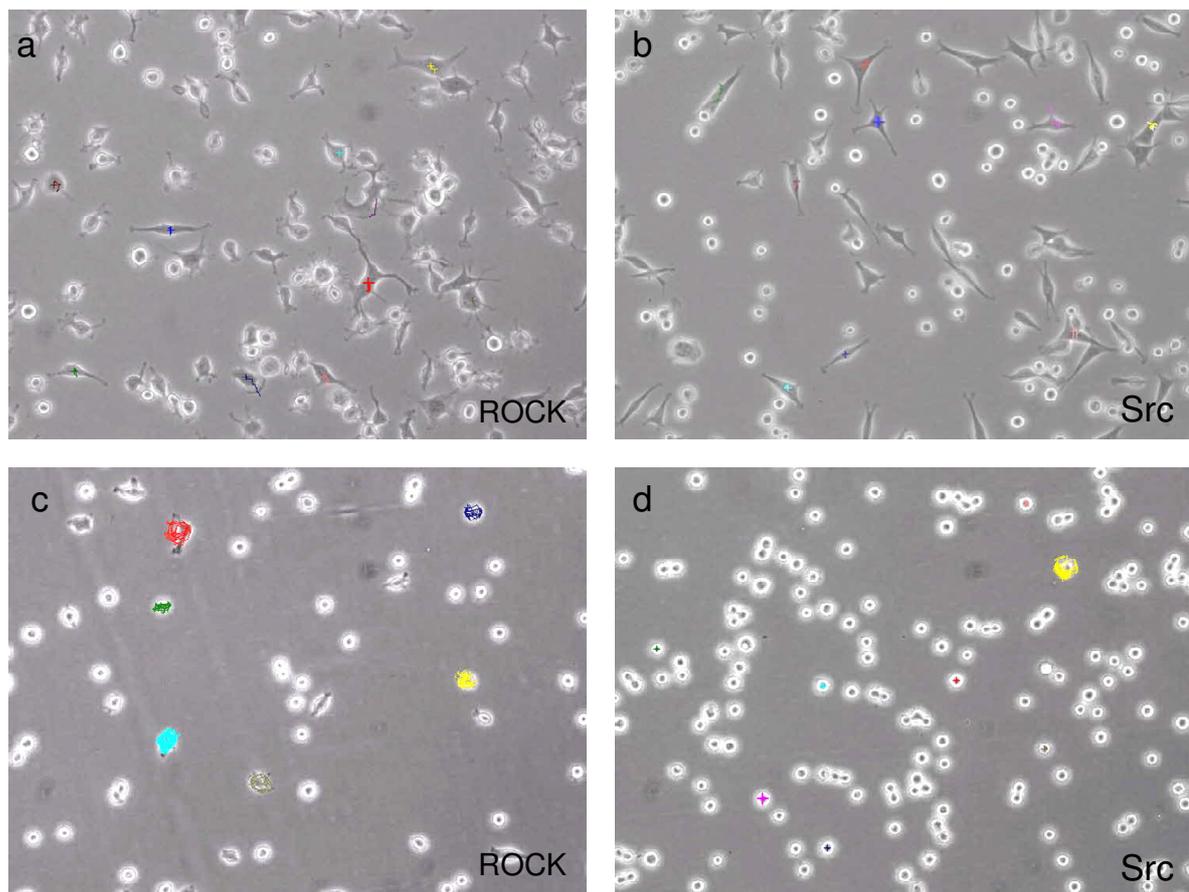


Abbildung 25: Zeitrafferaufnahmen der Tumorzellen auf C I mit Src- oder ROCK-Inhibition. Die Zelllinien MDA MB 231 (a, b) und MDA MB 468 (c, d) wurden für eine Stunde vor den Filmaufnahmen mit den Inhibitoren für ROCK (a, c) und Src (b, d) behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit den Chemokinliganden SDF1 α oder MIP3 β stimuliert. Die Spurenlängen wurden mit einer Zelltracking-Software bestimmt (farbig dargestellt). Die Ergebnisse der Spurenlängen sind in Abb. 24 gezeigt.

Grundsätzlich konnte durch die verschiedenen Versuche beobachtet werden, dass die, für diese Studie ausgewählten Mammakarzinomzelllinien fähig sind, durch die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 und deren Liganden SDF1 α und MIP3 β die Migrationseigenschaften zu modulieren und erhöhte Migrationsraten zu erzielen. Es zeigten sich jedoch Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. Die hochmetastatische Zelllinie MDA MB 231 zeigte effizientere Antworten auf die Chemokine als die

niedrigmetastatische Zelllinie MDA MB 468. Des Weiteren wurden unterschiedliche Präferenzen der Zelllinien zu den ausgewählten Matrixkomponenten in dieser Studie beobachtet.

4. Diskussion

Die Interaktion von Tumorzellen mit Komponenten der EZM ist ein wichtiger Schritt bei der organspezifischen Metastasierung. Tumorzellen haben die Fähigkeit erworben, spezifische Adhäsionen mit vaskulären Endothelzellen und/oder der EZM auszubilden, um in metastatische Zielorgane zu invadieren. Die Metastasierung in die Leber durch Mammakarzinomzellen ist ein Beispiel für organspezifische Metastasierungsprozesse. In dieser Studie wurden potentielle Mechanismen, die diesen Prozess fördern, untersucht. Chemokine und deren Rezeptoren spielen beim Mammakarzinom eine wichtige Rolle. Die Überexpression der Chemokinrezeptoren auf den Zelloberflächen und die Sekretion der Chemokinliganden in den Zielorganen wie Lymphknoten, Lungen, Leber und Knochenmark (35) scheinen einen wichtigen Einfluss auf die Adhäsions- und Migrationseigenschaften der metastatischen Mammakarzinomzellen zu haben. In der Leber sekretieren Kupfferzellen und Endothelzellen der Sinusoide das Chemokin SDF1 α (36). MIP3 β wird vornehmlich in den Lymphknoten exprimiert. Die untersuchten Mammakarzinomzellen exprimieren deren funktionell aktive Rezeptoren CXCR4- und CCR7. In dieser Studie wurde die Rolle von CXCR4/SDF1 α und CCR7/MIP3 β bei der Zellmigration und Adhäsion der Tumorzellen in Abhängigkeit der EZM-Komponenten C I, FN und LN untersucht. In der Leber werden besonders C I und FN exprimiert, die eine organspezifische Mikroumgebung für die Extravasation der Tumorzellen darstellen können.

4.1 Die Rolle von CXCR4/SDF1 α bei der Chemokin-induzierten Migration der Mammakarzinomzellen

In dieser Studie wurden zwei Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichem metastatischem Potenzial untersucht. Die Zellen zeigten in vitro verschiedene Migrationseigenschaften in Abhängigkeit der EZM. Die hochmetastatische Zelllinie MDA MB 231 zeigte hohe Migrationsraten, während die niedrigmetastatische Zelllinie MDA MB 468 nur geringe Migrationsraten aufwies. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde das Metastasierungspotenzial, sowie das Adhäsions- und Migrationsverhalten beider Zelllinien in vivo mittels Intravitalmikroskopie in der Rattenleber untersucht. Zur Validierung der Rolle von CXCR4/SDF1 α bei der Tumorzellmigration in vivo, wurde die Zelllinie MDA MB 231 mit siRNA transfiziert, um die CXCR4-Expression zu hemmen (137). Die Inhibition von CXCR4 resultierte in einer reduzierten Migrationsrate der Tumorzellen in der

Rattenleber, die Adhäsion der Tumorzellen wurde jedoch nicht beeinflusst (Publikation eingereicht). In analoger Weise wirkte sich eine antikörpervermittelte Blockade von CXCR4 in Kolon- und hepatozellulären Karzinomzellen aus (36). Diese in vivo-Ergebnisse wurden durch die in vitro-Versuche dieser Promotionsarbeit bestätigt. Hemmung von CXCR4 durch einen blockierenden Antikörper reduzierte signifikant die Transmigration durch Polykarbonatmembranen der Mammakarzinomzellen. Auch die Arbeitsgruppe von Chen et al. (37) konnte die Inhibition der Invasion bzw. Migration von Mammakarzinomzellen durch Hemmung von CXCR4 nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte eine Beeinflussung der Adhäsion in vitro und in vivo nicht beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe von Fernandis et al. (138) konnte eine konzentrationsabhängige Beeinflussung von MDA MB 231-Zellen auf FN beobachten, jedoch nahm die Adhäsion bei höheren Konzentrationen an SDF1 α wieder ab. Ähnliche Beobachtungen konnten bei eigenen Experimenten auf C I und FN auch gemacht werden, die Ergebnisse zeigten aber keine signifikanten Unterschiede. Obwohl beide Zelllinien funktionell aktive CXCR4-Rezeptoren exprimieren, wurden unterschiedliche starke chemotaktische Antworten auf Chemokingradienten in vitro entdeckt. Die Migrationsraten und Zellmotilitäten der Zelllinie MDA MB 231 waren höher als die der Zelllinie MDA MB 468. Auch die Extravasation in der Leber im Tiermodell unterschied sich zwischen den beiden Zelllinien (Publikation eingereicht). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die chemotaktischen Eigenschaften durch Integrin-vermittelte Interaktionen mit Komponenten der EZM beeinflusst werden wie es von anderen Tumortypen bereits berichtet wurde (35, 58, 61). Obwohl einige Unterschiede in der Integrin-Oberflächenexpression zwischen den beiden Zelllinien gefunden wurden, erklärt es nicht allein die unterschiedlichen Migrationseigenschaften der Zelllinien.

Die Zusammensetzung der EZM in der Leber mag bestimmte Strukturen beherbergen, die die Tumorzellextravasation lenken können. Schichten von FN und geringe Mengen an LN innerhalb des subendothelialen Dissé-Raumes und Kollagenfasern zwischen den Hepatozyten stellen mögliche Wege für adhärente Zellen dar, um ins Leberparenchym nach ausreichender Stimulation zu wandern (58). Versuche mit Kolonkarzinomzellen der Arbeitsgruppe zeigten, dass FN und Kollagen Typ IV hauptsächlich den initialen Tumorzellarrest innerhalb der Sinusoide vermittelten, wohingegen C I verantwortlich für die Tumorzellextravasation zu sein schien (62). In weiteren Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden die direkten Integrin-vermittelten Interaktionen von Tumorzellen (z.B. HepG2, HT29-LMM) mit der EZM der Leber bei der Metastasenbildung in diesem Organ intensiv untersucht. Dabei wurde vor allem gefunden, dass die Tumorzelladhäsion und die anschließende Extravasation in das Organparenchym von unterschiedlichen EZM-Integrin-Kombinationen vermittelt werden. Die beteiligten Zelladhäsionsmoleküle hängen

dabei von der Zusammensetzung der EZM in den verschiedenen Organen ab (58, 62). In dieser Studie wurde eine konzentrations- und matrixabhängige SDF1 α -induzierte Migration der Mammakarzinomzellen in vitro beobachtet. Die kurvenförmige Antwort der Migrationsraten auf verschiedene SDF1 α -Konzentrationen wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (30, 37). Eine abnehmende Migration bei höheren Chemokinkonzentrationen mag sich durch Sättigung des Chemokinliganden an der Zelloberfläche und schneller Internalisierung des Rezeptors nach Bindung des Liganden begründen. Die Arbeitsgruppe von Holland et al. (139) untersuchte Mammakarzinomzellen in Suspension. Sie beobachteten, dass nur hochinvasive Zellen fähig waren, G-Protein $\alpha\beta\gamma$ -Heterotrimere mit CXCR4 zu bilden. Obwohl nichtinvasive Zellen ähnliche CXCR4-Level exprimierten, waren diese Zellen nicht fähig, auf SDF1 α zu reagieren. Beide Mammakarzinomzelllinien zeigten in dieser Studie vergleichbare Basiszellmotilitäten auf allen Matrixkomponenten. Unterschiede zeigten sich, wenn die Zellen mit SDF1 α stimuliert wurden. Während die MDA MB 468-Zellen hauptsächlich auf SDF1 α reagierten, wenn die Zellen auf FN ausplattiert waren, zeigten sich bei der Zelllinie MDA MB 231 bevorzugt chemotaktische Antworten auf C I und LN. Da C I als Weg für die Tumorzellextavasation in das Leberparenchym zu fungieren scheint, erklärt es die erhöhte chemotaktische Zellmotilität auf C I, was ein Hinweis auf eine wichtige Rolle von C I bei der Kolonisierung der Leber durch Tumorzellen sein könnte. Da MDA MB 231-Zellen auf LN ebenfalls sehr aktiv sind, könnte spekuliert werden, dass die Zellen LN nutzen, um in andere Organe wie z. B. die Lungen, wo LN in höheren Mengen exprimiert wird, zu metastasieren. Dies würde einen früheren Austritt aus den Mikrogefäßen und die Umgehung von Kontakten mit einer potentiell toxischen Mikroumgebung für die Tumorzellen bedeuten (140). Bei HT1080-Zellen wurde der Arrest im pulmonalen Gefäßsystem via Interaktionen von $\alpha\beta 1$ -Integrine mit LN-5 in den Basalmembranen beobachtet (141). In anderen Studien wurde gezeigt, dass die Überexpression von FN und Tenascin, ein weiteres Matrixmolekül, in Mammakarzinomen und befallenden Lymphknoten Marker für eine schlechte Prognose darstellten (142). Des Weiteren wurden spezifische Interaktionen von zirkulierenden Kolonkarzinomzellen mit FN im Dissé-Raum der Leber, vermittelt durch $\alpha\beta 5$ und möglicher Weise durch $\alpha\beta 1, -6$ Integrine, beobachtet (62). In den untersuchten Tumorzellen dieser Arbeit wurde besonders eine hohe Expression an αv -Integrinuntereinheiten gemessen. Potenzielle Interaktionen zwischen Integrinen und chemotaktischen Antworten wurde auch bei anderen Tumortypen beobachtet. So wurde z. B. eine Integrin-vermittelte Pankreaskarzinom-Zellmigration auf LN beobachtet, welche eine Hochregulation von CXCR4 und IL-8 induzierte und die Empfindlichkeit auf SDF1 α -Stimulation erhöhte (143). Zusätzlich wurde eine SDF1 α -induzierte Umverteilung von verschiedenen Integrinen zwischen Zelloberflächen und

intrazellulären Kompartimenten von Nierenkarzinomzellen beobachtet (144). In dieser Studie wurden ähnliche Veränderungen der Integrinexpression durch Chemokinstimulation nicht beobachtet. Aber es konnte mit immunzytologischen Zelloberflächenmarkierungen von CXCR4 festgestellt werden, dass die Integrin-vermittelte Adhäsion der Zellen an Komponenten der EZM spezifisch die Anordnung von CXCR4 auf den Zelloberflächen beeinflussen kann und die Ausbildung größerer CXCR4-Cluster induzierte. Da dieses Phänomen mit der Ausbildung von Lamellipodia und Pseudopodia bei der Zelllinie MDA MB 231 einherging, ist anzunehmen, dass spezifische Integrin-vermittelte Zelladhäsionen eine erhöhte CXCR4-Reaktivität induzieren (35). Diese morphologischen Veränderungen nach CXCR4-Aktivierung waren bei der Zelllinie MDA MB 231 sehr intensiv, aber limitiert bei der niedrigmetastatischen Zelllinie MDA MB 468. In Arbeiten von Chinni et al. () wurde die Expression von CXCR4 in Lipid Rafts nachgewiesen. Lipid Rafts sind spezielle Mikrodomänen in der Plasmamembran, die mit Cholesterol, Sphingolipiden und verschiedenen anderen Zellsignalproteinen angereichert sind. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und trimere G-Proteine sind assoziiert mit Lipid Rafts, wo sie die Signaltransduktion initiieren (145). In Vorarbeiten konnte eine Kollokalisierung von CXCR4 und FAK in den Mammakarzinomzellen nicht nachgewiesen werden, so dass eine direkte kostimulatorische Aktivierung von Integrinen und Chemokinen jedoch nicht anzunehmen ist. Andrew und Insall (146) beobachteten mit Untersuchungen an Dictyostelium-Zellen, gerichtete Bewegungen der Zellen zu Chemokingradienten, aber ohne lokalisierte Ausbildungen von neuen Pseudopodien. Diese Effekte scheinen aber zelltypspezifisch zu sein und von adhäsiven Interaktionen mit dem unterliegenden Substrat moduliert zu werden. Durch verschiedene Kombinationen von Integrin-Interaktionen und Chemokinrezeptor-Aktivierungen scheinen Tumorzellen verschiedene Migrationsarten nutzen zu können, um zu ihrem Zielorgan zu gelangen. Der Übergang von mesenchymalen zu amöboiden Zellfortbewegungen, genannt mesenchymal-amöboide Transition, oder kollektive-amöboide Transition ermöglichen den Tumorzellen Fortbewegungen, die einen Abbau der EZM für die Invasion ins Gewebe nicht mehr notwendig macht. Diese Migrationseigenschaften sind eng gekoppelt mit Integrin-EZM-Interaktionen (147). Es kann spekuliert werden, dass Interaktionen zwischen Integrinen und Chemokinen während der chemotaktischen Tumorzellextravasation mehr verbunden sind mit „Outside-in-Signalen“, die eine höhere chemotaktische Zellmotilität mit folgender schnelleren Extravasation induzieren.

Neben Kinase-Aktivierungen und Phosphorylierungs-Kaskaden können Chemokinrezeptoren und Integrine die Signalwege der kleinen Rho-GTPasen aktivieren und modulieren (118). Rho A fördert die Kontraktion und die Retraktion des Zellkörpers und ist am Zellende während gerichteter Zellbewegungen lokalisiert. Rac kann sog.

Membranruffles an der Zellvorderseite induzieren und Cdc42 reguliert die Zellpolarität für gerichtete Migrationen (91). Die SDF1 α -induzierte Aktivierung der GTPasen in Zellsuspensionen und die erhöhte Reaktivität der Zellen, die auf C I adhärten, korrespondierten mit den Ergebnissen der Zellmotilitäten. Limitierte Aktivierungen der GTPase Cdc42 in Zellsuspensionen im Vergleich zu adhärten Zellen, sind mit dem Verlust der Zellpolarität ohne adhäsive Kontakte zu erklären. Dies könnte darauf hinweisen, dass Integrin-vermittelte adhäsive Kontakte der Tumorzellen wichtig sind bei der Chemokin-induzierten Tumorzellmotilität in den Zielorganen. Dieser Effekt wurde durch weitere Beobachtungen bestätigt, wobei GTPase-Aktivierungen durch Adhäsionen verschiedener Tumorzelltypen zu verschiedenen EZM-Komponenten unterschiedlich moduliert wurden (118, 148). So resultiert z. B. die Adhäsion der humanen Lungenadenokarzinom-Zelllinie A549 an LN 10/11 in Rac-Aktivierung, wohingegen die Adhäsion an FN in der Aktivierung von Rho A (113). Mikrovaskuläre Endothelzellen sind fähig, Rac zu aktivieren, wenn sie auf LN-1, und Rho A, wenn sie auf C I adhärten (148). Untersuchungen von Melanomzellen, die eine dominant-negative Form von Cdc42 exprimierten, zeigten keine signifikanten Veränderungen in deren invasiven Potenzial in Antwort auf SDF1 α im Vergleich zu Zellen, die die Wildtyp-Form von Cdc42 exprimierten. Bei Rho und Rac wurde hingegen eine Abnahme der Invasion beobachtet. Bei Kontakten der Melanomzellen mit der Basallamina und/oder C I wurde eine erhöhte CXCR4-Expression mit effizienteren Antworten zu SDF1 α beobachtet (149). Des Weiteren konnten bei den Aktivierungsversuchen der Rho-GTPasen konzentrations- und matrixabhängige Aktivierungen festgestellt werden, die mit den Migrationsversuchen zum Teil übereinstimmen. Zusätzlich wurden Zeitverläufe der SDF1 α -Stimulation bis zu 30 min getestet. Es zeigte sich, dass die Aktivierungen der Rho-GTPasen nach 30 min abnahmen. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Rezeptorverteilung auf den Zelloberflächen, wo nach ca. 30 min die Rezeptorinternalisierung beobachtet werden konnte.

4.2 Die Rolle von CCR7/MIP3 β bei der Chemokin-induzierten Migration der Mammakarzinomzellen

Um die Funktion der Chemokine bei der organspezifischen Metastasierung von Mammakarzinomzellen weiter zu untersuchen, wurde ein weiterer Kandidat der Chemokinfamilie getestet. Der Chemokinrezeptor CCR7 und die Liganden MIP3 β (CCL19) und 6CKine (CCL21) spielen beim Mammakarzinom ebenfalls wie CXCR4 und

SDF1 α eine wichtige Rolle. CCR7 und seine Liganden sind besonders bei der Lymphknotenmetastasierung involviert und diese werden vornehmlich in Lymphknoten und von CCR7-positiven Tumorzellen exprimiert (35, 150). Autokrine und parakrine Aktivierungsmechanismen von CCR7 wurden in einigen Studien entdeckt (150, 55). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde sich auf den Liganden MIP3 β konzentriert, da es nur wenige Studien gibt, die die Rolle von MIP3 β bei der Tumorprogression beschreiben.

Bei beiden Mammakarzinomzelllinien wurde eine hohe Zelloberflächenexpression von CCR7 gemessen, die vergleichbar mit der von CXCR4 war. Nachweise der mRNA beider Chemokinrezeptoren in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien im Vergleich zu normalen Mammaepithelzellen zeigten, dass die mRNA von CXCR4 nur in Mammakarzinomzellen nachzuweisen war, hingegen wurde die mRNA von CCR7 in normalen Mammaepithelzellen und mit einer Hochregulierung in den Mammakarzinomzelllinien detektiert (35). Die Funktionalität von CCR7 wurde mit Aktivierungsversuchen der Rho-GTPasen nachgewiesen. In Migrationsversuchen konnte die chemotaktische Wirkung von MIP3 β in einer konzentrationsabhängigen Weise bestätigt werden. Zur weiteren Kontrolle wurde mittels eines blockierenden anti-CCR7-Antikörpers die MIP3 β -induzierte Migration in vitro gehemmt. Auch bei der Behandlung der Mammakarzinomzellen mit verschiedenen Konzentrationen an MIP3 β konnten kurvenförmige Verläufe der Migrationsraten beobachtet werden, die auf eine Sättigung ab einer bestimmten Konzentration des Liganden schließen lassen. Des Weiteren ließen sich Matrix-abhängige Präferenzen bei beiden Zelllinien erkennen. Während bei der Zelllinie MDA MB 231 auf C I, FN und LN signifikante erhöhte Migrationsraten zu beobachten waren, konnte bei der Zelllinie MDA MB 468 trotz funktionell aktiven CCR7-Rezeptors keine signifikant erhöhte Migrationsrate der Zellen erzielt werden. Bei der Zelllinie MDA MB 468 war es schwierig, über einen Beobachtungszeitraum von 16 h intakte Zellen im Anschluss der Zellfärbung auszuzählen. Es lässt sich spekulieren, ob, bei niedrigmetastatischen Zellen die Überlebens-Signalwege nicht ausreichend aktiviert werden, um die Zellen vor apoptotischen Prozessen zu schützen. In anderen Studien wurden die Aktivierung von CCR7 und folgende Aktivierungen von Überlebens- und invasiven Signalwegen gefunden (15055). Bei den Untersuchungen der Zellmotilitäten durch Zeitraffermikroskopie mit einer Beobachtungszeit von einer Stunde wurden bei der Zelllinie MDA MB 231 signifikant erhöhte Motilitäten auf C I gefunden, ebenso bei der Zelllinie MDA MB 468.. Es zeigte sich eine deutliche Präferenz der chemotaktischen Antwort der Zelllinien auf C I. Anhand der Zellmotilitätsuntersuchungen lässt sich wiederum erkennen, dass spezifische Integrin-vermittelte Adhäsionen der Tumorzellen deren chemotaktische Antworten auf MIP3 β modulieren, wie es bereits bei SDF1 α beobachtet wurde. Untersuchungen statischer Adhäsionen der Zelllinien zeigten bei

beiden Zelllinien die stärksten Adhäsionen auf C I, bei der Zelllinie MDA MB 231 waren die Adhäsionen auf FN vergleichbar. Die Stimulation mit MIP3 β zeigte keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten. Da CCR7 vornehmlich bei der Metastasierung in die Lymphknoten eine Rolle spielt, lässt sich nun spekulieren, ob C I und FN wie in der Leber auch in den lymphatischen Organen eine geeignete Mikroumgebung für invadierende Tumorzellen darstellt. Da Basalmembranen weder in der Leber noch im Lymphgefäßsystem eine Rolle spielen, benötigen die Tumorzellen keine LN-Rezeptoren, um an die Basalmembran binden zu können. Interaktionen zu FN und Kollagenen haben hingegen wichtige Funktionen bei der Tumorzellmigration. Im retikulären Bindegewebe der Lymphknoten wird unter anderem Kollagen Typ III exprimiert, welches mit FN interagiert (151). Die Beeinflussung der Migration der Mammakarzinomzellen, nicht aber der Adhäsion, lässt vermuten, dass Moleküle wie Chemokine hauptsächlich die Migration der Tumorzellen fördern, nachdem sie an der EZM adhärten. Die Expression der Integrine wird am Ort der Adhäsion moduliert. So werden Integrine bei der Lymphangiogenese, die die Metastasierung in die Lymphknoten fördert, aktiviert oder überexprimiert. Je nachdem ob die Zellen an Blut- oder Lymphgefäßen adhärten, werden verschiedene Integrine exprimiert. (151). Bei der Adhäsion an Blutgefäßen werden Integrine wie $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ exprimiert, während bei Adhäsionen an Lymphgefäßen Integrine $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 9\beta 1$ gebildet werden. Es handelt sich dabei hauptsächlich um Rezeptoren für LN, C I und FN. Die Arbeitsgruppe von Müller et al. (35) berichtete von möglichen synergistischen Effekten von SDF1 α und 6CKine (CCL21), da beide Liganden in den Lymphknoten exprimiert werden und beide chemotaktische und invasive Antworten von Mammakarzinomzellen in vitro vermittelten. Bei Untersuchungen der Zellmotilitäten wurden die Zellen mit 25 ng/ml SDF1 α und 50 ng/ml MIP3 β simultan stimuliert. Bei der Zelllinie MDA MB 231 zeigte sich kein verstärkter Einfluss auf die Zellmotilität im Vergleich zu SDF1 α - oder MIP3 β -stimulierten Zellen. Bei der Zelllinie MDA MB 468 wurden höhere Spurenlängen durch die Kombination beider Chemokinliganden gemessen. Diese unterschiedlichen Beobachtungen zeigen, dass die Zellen unterschiedlich auf die Stimulation mit Chemokinen reagieren. Es bedarf allerdings noch weiterer Experimente, um diese Beobachtungen zu bestätigen. Eine ähnliche Funktion wird von MIP3 β auch vermutet, da vergleichbare Eigenschaften beobachtet werden konnten. So wurden z. B. agonistische und antagonistische Effekte zwischen MIP3 β und 6CKine bei morphologischen Veränderungen von Dendriten nachgewiesen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Chemokinliganden eines Chemokinrezeptors sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte bei der Migration und anderen Funktionen haben können (152). Es stellt sich nun die Frage, ob beide Liganden von CCR7 synergistische Effekte mit oder ohne SDF1 α vermitteln

können. Arbeiten mit Mantel-Zelllymphoma (MCL)-B-Zellen zeigten chemotaktische Antworten zu SDF1 α , genau wie bei normalen CD5⁺B-Zellen. Mit SDF1 α -vorbehandelte Tumorzellen zeigten auch signifikante Chemotaxis zu MIP3 β , was bei den CD5⁺B-Zellen nicht beobachtet werden konnte (54). Die Arbeitsgruppe entdeckte, dass CXCR4/SDF1 α durch Kreuzsensibilisierung andere Chemokinrezeptoren aktivieren bzw. modulieren kann. Solche Prozesse könnten auch im Mammakarzinom möglich sein. Des Weiteren wurde beobachtet, dass CCR7 erst in Tumorzellen aktiviert wurde und durch dessen Liganden chemotaktische Migrationen vermittelt wurden.

In sekundären lymphatischen Geweben wird SDF1 α von Stromazellen exprimiert (153) und die Liganden MIP3 β und 6CKine auf den Oberflächen von postkapillären Venolen und im perivaskulären Stroma (154). Ähnliche Expressionsmuster wurden auch in infiltrierenden Lymphknoten von B-Zell-Lymphomen von Patienten beobachtet (155). Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression der CCR7-Liganden in Patientinnen mit Lymphknoten-Metastasierung beobachtet als bei Patientinnen ohne Lymphknotenbefall (52). Die Expressionsmuster von CXCR4 und CCR7 auf den Oberflächen der Mammakarzinomzellen sind unterschiedlich und weisen unterschiedliche Verteilungsmuster auf. Während CXCR4 in Clustern an den Lamellipodia nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei CCR7 eine polarisierte und richtungsweisende Lokalisation auf den Zelloberflächen. Clusterbildungen wie bei CXCR4 wurden nicht beobachtet. Die CCR7-Expression war nicht entlang von Lamellipodia lokalisiert, so dass eine Kolo-kalisation von beiden Chemokinrezeptoren nicht beobachtet werden konnte. Die ein- bzw.- zweiseitige Lokalisation von CCR7 auf den Zelloberflächen konnte sowohl bei elongierten Zellen als auch bei runden Zellformen gesichtet werden und lässt vermuten, dass CCR7 wichtige Funktionen bei der Zellmigration hat. Die Stimulation der Zellen mit MIP3 β zeigte keinen Einfluss auf die Verteilung von CCR7 auf den Zelloberflächen. Auch eine Abhängigkeit von der EZM konnte nicht entdeckt werden. Da die Stimulation der Zellen mit Chemokinen chemotaktische Migrationen induziert, stellen die Rho-GTPasen, die das Aktinzytoskelett regulieren, wichtige Moleküle der Signaltransduktion dar. Die Aktivierungen der Rho-GTPasen wurden zusätzlich zur Überprüfung der Chemokinrezeptor-Funktionalität genutzt. Die Versuche wurden mit Zellsuspensionen und als Vergleich mit adhären-ten Zellen auf C I durchgeführt. C I wurde beispielhaft als Integrin-vermittelndes Substrat genutzt, da die stärksten Motilitäten der Zellen auf diesem beobachtet wurden. Zwischen den beiden Zelllinien wurden einige Unterschiede bei den Aktivierungen der einzelnen Rho-GTPasen durch MIP3 β beobachtet. Bei der Zelllinie MDA MB 231 wurde zwischen Zellsuspension und auf C I-adhären-ten Zellen keine Unterschiede in Hinsicht der Aktivierungen von Rho und Rac festgestellt. Während die Rho-Aktivierung mit steigender Konzentration anstieg, wurde die Rac-Aktivierung kaum

beeinflusst. Gegensätzliche Rho- und Rac-Aktivierungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (118, 148). So wurden z. B. bei einer Überexpression von Rho A in MDA MB 231-Zellen runde Zellmorphologien und reduziertes Zellspreading mit einhergehender Dephosphorylierung von FAK beobachtet (156). Bei der Zelllinie MDA MB 468 wurden bei beiden Versuchsansätzen (Zellsuspension und adhärenzte Zellen) vergleichbare Aktivierungen aller GTPasen mit Aktivierungsmaxima bei 50 oder 100 ng/ml MIP3 β beobachtet. Die unterschiedliche Rac-Aktivierung durch MIP3 β zwischen den beiden Zelllinien kann derzeit nicht erklärt werden. Bei Versuchen mit reifen Dendritischen Zellen wurden eine Rolle von Rac und Cdc42, nicht aber Rho A, bei der durch MIP3 β - und 6Ckine-induzierten Endozytosis und Dendritenverlängerung entdeckt (152, 157). Des Weiteren wurden Modifizierungen von CCR7 durch Endotheline beobachtet, die eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung spielen. Die Stimulation von Mammakarzinomzellen mit Endothelinen führte zu erhöhten chemotaktischen Antworten zu MIP3 β und 6Ckine (52-158). Die Funktion von CCR7 bei Endothelin-induzierten Invasionen zeigt, dass es viele unabhängige Signalwege gibt, die die Metastasierung von Tumorzellen durch Chemokine beeinflussen.

4.3 Untersuchungen von Signalwegen bei Interaktionen von Integrinen und Chemokinen

Bei der EZM-abhängigen und Chemokin-induzierten Migration von Tumorzellen scheint eine Reihe an gemeinsamen Signalwegen beteiligt zu sein. Adhärenz Zellen an die EZM, so führt dies zu Integrin-Clustering und schnellen Phosphorylierung von FAK an Tyrosin (Thr) 397, was zur Bildung von Phosphotyrosin-Bindungsstellen für mehrere Signalmoleküle führt. Die Ausbildung von SH2-Domänen resultiert unter anderem in der Bindung und Aktivierung von Src-Kinasen, der p85-Untereinheit der PI3-Kinase und der Phospholipase C. Es werden Phosphorylierungskaskaden von mehreren Proteinen in Gang gesetzt, die letztendlich das Aktinzytoskelett modulieren (159). Untersuchungen von CXCR4-vermittelten Signalwegen an Mammakarzinomzellen der Arbeitsgruppe von Fernandis et al (138) zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit SDF1 α eine Reihe an Komponenten der Fokalen Adhäsionskomplexe beeinflusste. Es wurden Phosphorylierungen von FAK, RAFTK/Pyk2, Paxillin, Crk sowie Crk-L. gefunden. Die Phosphorylierung von FAK an den Tyr 397, 577 und 861 und von RAFTK/Pyk2 an Tyr 402 wurde auch in anderen Zelltypen gefunden (160). Paxillin dient als wichtige Bindungsstelle für weitere Signalproteine wie Vinculin, Talin, Crk, Crk-L, p130Cas und

Src, die wiederum in der Signalkaskade weiterer Moleküle aktivieren und zu Zytoskelettveränderungen führen. Die Hemmung von Src in dieser Studie resultierte zunächst in abnehmenden Migrationsraten und Zellmotilitäten, die aber durch Stimulation mit SDF1 α und MIP3 β zu einem gewissen Teil wieder erhöht werden konnten. Diese Ergebnisse zeigen, dass der FAK/Src-Komplex und die Interaktion von anderen Signalmolekülen bei der Integrin-abhängigen Adhäsion von Zellen eine wichtige Rolle bei der Chemokinsignalübertragung spielen.

Des Weiteren wurde eine erhöhte PI3-Kinase Aktivität und Akt-Phosphorylierung durch die Stimulation von MDA MB 231 mit SDF1 α beobachtet (138). Die Assoziation der p85-Untereinheit mit der Tyrosinphosphatase SHP2 wurde entdeckt, deren Tyrosinphosphorylierung durch SDF1 α erhöht wurde. Ein weiteres Protein, was bei der Chemokin-induzierten Migration eine Rolle spielt, ist Cbl, welches auch durch SDF1 α phosphoryliert wurde. Inhibitionen dieser Moleküle resultierten in der Hemmung der Chemotaxis (138). Eine erhöhte Akt-Phosphorylierung der Mamma-karzinomzellen konnte in eigenen Vorversuchen bestätigt werden. Die Blockierung der PI3-Kinase durch Wortmannin resultierte in reduzierten Migrationsraten, die durch Behandlung der Zellen mit SDF1 α wieder erhöht werden konnten, aber das Ausgangslevel nicht mehr erreichten. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Hemmung der PI3-Kinase in veränderten Dynamiken der Pseudopodienbildung, nicht aber der gerichteten Fortbewegung der Zellen resultierte (146).

Studien mit Vorläufer-B-Zellen entdeckten, dass die Phosphorylierung von FAK durch SDF1 α in der Lokalisation von FAK in Lipid Rafts und Membran-Domänen endete und durch Binden von CXCR4 an heterotrimere G-Proteine vermittelt wurde. Die Aktivierung der p85-Untereinheit der PI3-Kinase zeigte sich als G_i-Protein-unabhängiger Prozess und ließ vermuten, dass die Interaktionen von FAK-CXCR4 und PI3K-CXCR4 durch unabhängige Signalwege vermittelt wurden (161). In Arbeiten mit Leukozyten wurde der aktivierte CXCR4-Rezeptor in Form von Clustern in Lipid Raft-Domänen gefunden und die Signalübertragung über G_i-Proteine, Src-Familie-Proteine und FAK nachgewiesen (162). In einer anderen Studie mit Vorläufer-B-Zellen wurde die Rolle von FAK bei der SDF1 α -induzierten Chemotaxis ebenfalls nachgewiesen und des Weiteren die Aktivierung der Ras-GTPase Rap1, die eine entscheidende Rolle bei der Chemokin-induzierten Integrin-Aktivierung und Migration spielt. Rap1 wurde durch 6Ckine und SDF1 α innerhalb von Sekunden aktiviert und vermittelte die Adhäsion der Lymphozyten an die Endothelzellen. Die Chemokine hochregulierten dabei die Integrine, die für den Lymphozyten-Arrest am vaskulären Endothel notwendig sind (163, 164). Des Weiteren wurde die Zellpolarisation und Chemokinrezeptorverteilung beobachtet.

In Studien mit T-Lymphozyten konnte die Migration von infiltrierenden Zellen in C I-3D-Substraten durch Zugabe von Chemokinen und FN erhöht werden (165). Bei Untersuchungen von Thymozyten wurde die Expression von $\alpha 4\beta 1$ /VLA-4 durch SDF1 α erhöht und förderte das Binden der Zellen an FN (166). Auch die Stimulation mit MIP3 β förderte die Migration von Thymozyten auf FN.

Des Weiteren wurde bei Studien der Chemotaxis von T-Lymphozyten gefunden, dass SDF1 α die Aktivierung von LIMK1 und resultierender Phosphorylierung von Cofilin induzierte, was zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts führte. Die Aktivierung von LIMK1 wurde durch den Rac-PAK-Signalweg in G_i -Protein-abhängiger Weise vermittelt, wohingegen die Aktivierung von LIMK1 durch Rho/ROCK durch SDF1 α nicht bestätigt werden konnte. Es konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass die Aktivierung des Cdc42-WASP-Arp2/3-Signalweges durch SDF1 α wichtig für die Chemotaxis der T-Lymphozyten ist (167)

Da ROCK auch bei der Aktivierung der LIMK1 und folgender Phosphorylierung von Cofilin beteiligt ist, wurde in eigenen Experimenten ROCK durch den Inhibitor Y-27632 inhibiert, und die Zellmotilität der Mammakarzinomzellen getestet. Die Inhibierung von ROCK führte zur signifikanten Abnahme der Zellmotilitäten und wurde durch die Stimulation der Zellen mit SDF1 α und MIP3 β signifikant im Vergleich zu unstimulierten Zellen wieder erhöht. Da die Aktivierung von Rho A nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass die Aktivierungen der drei Rho-GTPasen in unabhängigen aber z.T. verlinkten Signalwegen durch SDF1 α vermittelt werden. Über die Beteiligung von MIP3 β bei diesen Signalwegen ist noch wenig bekannt. Aus den Beobachtungen dieser Arbeit lässt sich jedoch schließen, dass auch MIP3 β wie SDF1 α bei einer Reihe dieser Signalwege beteiligt sein könnte. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich weiterhin vermuten, dass FAK ein mögliches Verbindungsglied zwischen Chemokinen und Integrinen darstellt.

Diese Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen zeigen, dass die Aktivierungen von verschiedenen Signalmolekülen durch Chemokine in den verschiedenen Zelltypen in Aktivierungen von Multi-Protein-Komplexen und Signalkaskaden resultieren, die dann zur Aktivierungen von Downstream-Effektoren führen und diese Prozesse wie Chemotaxis, Invasion und adhäsive Eigenschaften der Zellen regulieren. Deshalb ist es von wissenschaftlichem Interesse, durch Untersuchung weiterer Signalmoleküle und Signalwegen, die durch Chemokine beeinflusst werden, Licht in das dichte Netzwerk der Chemokinsignalübertragung zu bringen.

4.4 Schlussfolgerungen

- Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Migrationen der Tumorzellen durch SDF1 α und MIP3 β in konzentrations- und matrixabhängiger Weise stimuliert wurden.
- Die chemotaktischen Antworten der Mammakarzinomzellen konnten durch Hemmung von CXCR4 und CCR7 mittels blockierender Antikörper validiert werden.
- Die Zellmotilitäten wurden durch beide Chemokinliganden signifikant erhöht. Es zeigten sich bevorzugte Motilitäten auf C I und FN.
- Das Adhäsionsverhalten beider Zelllinien wurde durch die Chemokinstimulation nicht beeinflusst.
- Jedoch wurde die Verteilung und Größe der CXCR4-Cluster auf den Zelloberflächen matrixabhängig moduliert. Die CCR7-Lokalisation war hingegen polarisiert angeordnet und zeigte keine Clusterbildung.
- Die Internalisierung des CXCR4-Rezeptors wurde ab 30 min beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Rho-Aktivierung nach 30 min Stimulation mit SDF1 α gefunden.
- Die Aktivierungen der Rho-GTPasen Rho A, Rac 1 und Cdc42 wurden sowohl in Suspension als auch matrixabhängig durch beide Chemokinliganden konzentrationsabhängig aktiviert. Die stärksten Aktivierungen wurden auf den Matrixkomponenten C I und FN detektiert.
- Die hochmetastatische Zelllinie MDA MB 231 zeigte effizientere chemotaktische Antworten auf die Chemokine als die niedrigmetastatische Zelllinie MDA MB 468.
- Die Zelllinie MDA MB 231 wies moderate Adhäsionen und Migrationen sowie Aktivierungen der Rho-GTPasen auf LN auf im Vergleich zur Zelllinie MDA MB 468, die nur schwache Reaktionen aufwies.
- Die Inhibitionen von Src, PI3K und ROCK resultieren in verringerten Migrationen und Zellmotilitäten, die durch Stimulation mit SDF1 α und MIP3 β zu einem gewissen Grad wieder erhöht wurden, was eine Beteiligung bei Signalwegen der Chemokinsignalübertragung bedeutet.

4.5 Perspektiven

Anhand der erworbenen Kenntnisse dieser Studie, stellen sich weitere Fragen, die zu einem besseren Verständnis der Chemokin-induzierten organspezifischen Metastasierung des Mammakarzinoms führen würden.

In weiteren Versuchen könnte getestet werden, wie sich eine Kostimulation von SDF1 α und MIP3 β auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten der Tumorzellen in vitro und in vivo auswirken würde. Des Weiteren wäre es von Interesse agonistische und/oder antagonistische Effekte von MIP3 β und 6CKine bei der Tumorzellmigration zu testen. Intravitalmikroskopische Aufnahmen von CCR7-downregulierten Mammakarzinomzellen in vivo würden die bisherigen Untersuchungen abrunden. Zusätzlich wäre es von Interesse die Chemokin-vermittelte Invasion der Mammakarzinomzellen in weiteren Zielorganen wie z.B. die Lungen und Lymphknoten zu untersuchen. Ein zusätzlicher wichtiger Aspekt wären Untersuchungen weiterer beteiligter Signalwege bei der Chemokin-induzierten Tumorzellmigration, um mögliche Angriffspunkte für Anti-Krebs-Therapien zu finden. Als letzter Schritt könnten die gewonnenen Kenntnisse auf andere Tumortypen übertragen werden und die Funktion weiterer Chemokine in diesem Zusammenhang getestet werden.

5. Literaturverzeichnis

- 1) Tyczynski JE, Bray F, Maxwell Parkin D. European Network of Cancer Registries (ENCR). International Agency for Research on Cancer. Breast Cancer in Europe. ENCR Cancer Fact Sheets, Vol 2, 2002.
- 2) Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg.): Krebs in Deutschland, 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken, 2004
- 3) Understanding Cancer, From basic science to clinical practice, Alison and Sarraf, London, Cambridge University Press, 1997, 43-45
- 4) Klaus Giersiepen, Cornelia Heitmann, Katrin Janhsen, Cornelia Lange. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 25 Brustkrebs, Robert Koch Institut, Berlin, 2005.
- 5) Masood S, Kameh D. The Cancer Handbook Vol 1, Breast. Malcolm R. Alison. London, Nature Publishing Group, 2002, 611-616.
- 6) Easton D: Breast cancer genes: what are the real risks? Nature Genet 1997, 16(3):210–211.
- 7) Siegmund-Schultze N, Zylka-Menhorn, Vera; Leinmüller, Renate; Meyer, Rüdiger. Hormontherapie und Brustkrebs: Ein Blick auf aktuelle Datenlage. Dtsch Ärztebl 2008 (105): A-260 /B-234 / C-230.
- 8) Beral V, Bull D, Doll R, Peto R, Reeves G; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer.: Breast cancer and abortion: collaborative reanalysis of data from 53 epidemiological studies, including 83.000 women with breast cancer from 16 countries. In: The Lancet 2004 363 (9414), 1007–16.
- 9) Mettler FA, Upton AC, Kelsey CA, Ashby RN, Rosenberg RD, Linver MN: Benefits versus risks from mammography: a critical reassessment. Cancer 1996, 77(5):903–9.
- 10) Reynolds P, Hurley S, Goldberg DE, Anton-Culver H, Bernstein L, Deapen D, Horn-Ross PL, Peel D, Pinder R, Ross RK, West D, Wright WE, Ziogas A. Active smoking, household passive smoking, and breast cancer: evidence from the California Teachers Study. Journal of the National Cancer Institute 2004 (96):29-37.
- 11) Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP: Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. Am J Clin Nutr 2007, 85(6):1586–91.
- 12) Chambers AF, Groom AC, Mac Donald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. Nat Rev Cancer 2002, 2(8):563–572.
- 13) Fokas E, Engenhardt-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX. Metastasis: the seed and soil theory gains identity, Cancer Metastasis Rev 2007, 26(3-4):705–715.
- 14) Jonathan P. Sleeman A, Natascha Cremers. New concepts in breast cancer metastasis: tumor initiating cells and the microenvironment, Clin Exp Metastasis 2007, 24(8):707–715. Review.
- 15) Hunter KW, Crawford NPS, Alsarraj J. Mechanisms of metastasis, Breast Cancer Research 2008, 10 (Suppl 1):S2.
- 16) Griffioen AW, Encyclopedia of Cancer 2nd. Edition: Angiogenesis. Manfred Schwab, Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 2008.
- 17) Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination, Clin Exp Med 2006, 6(4):145–149.

- 18) Turner GA. Surface properties of the metastatic cell. *Invasion Metastasis* 1982, 2(4):197–216.
- 19) Reading CL, Hutchins JF. Carbohydrate structure in tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 1985, 4(3):221–260.
- 20) Raz A, Lotan R. Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1987, 6(3):433–452.
- 21) Nicolson GL, Dulski KM. Organ specificity of metastatic tumor colonization is related to organ-selective growth properties of malignant cells. *Int J Cancer* 1986, 38(2):289–294.
- 22) Nicolson GL. Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochem Biophys Acta* 1988, 948(2):175–224.
- 23) Weiss L. Dynamic aspects of cancer cell populations in metastasis. *Am J Pathol* 1979, 97(3):601–608.
- 24) Greene HS, Harvey EK. The relationship between the dissemination of tumor cells and the distribution of metastases. *Cancer Res* 1964, 24:799–811.
- 25) Auerbach R, Lu WC, Pardon E, Gumkowski F, Kaminska G, Kaminski M. Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: an in vitro correlate of preferential metastasis in vivo. *Cancer Res* 1987, 47(6):1492–1496.
- 26) Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977, 197(4306):893–895.
- 27) Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis, *Oncogene* 2003, 22(42), 6524–6536. Review.
- 28) Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, Segall JE, Pollard JW, Condeelis J. Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 2007, 67(6):2649-2656.
- 29) Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005, 438(7069):820-827.
- 30) Ali S, Lazenec G. Chemokines novel targets for breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 2007, 26(3-4): 401-420.
- 31) Lazenec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*. 2001, 142(9):4120-30.
- 32) Kulbe H, Levinson NR, Balkwill R, Wilson JL. The Chemokine network in cancer – much more than directing cell movements. *Int. J. Dev. Biol.* 2004, 48(5-6): 489-496. Review.
- 33) Yoong KF, Afford SC, Jones R, Aujla P, Qin S, Price K, Hubscher SG, Adams DH. Expression and function of CXC and CC chemokines in human malignant liver tumors: a role for human Chemokine induced by gamma-interferon in lymphocyte recruitment to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1999, 30 (1): 100-111.
- 34) Baruch-Ben A. Organ selectivity in metastasis. Regulation by chemokines and their receptors. *Clin Exp Metastasis* 2008, 25(4): 345-356.
- 35) Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verdostegui E, Zlotnik A. Involvement of Chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001, 410(6824): 24-25.

- 36) Gassmann P, Haier J. The tumor cell host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation. *Clin Exp Metastasis* 2008, 25(2): 171-81. Review.
- 37) Chen Y, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. Down-regulation of CXCR4 by inducible small interfering RNA inhibits breast cancer cell invasion in vitro. *Cancer Res* 2003, 63(16): 4801-4.
- 38) Haier J, Nasralla M, Nicolson GL. Different adhesion properties of highly and poorly metastatic HT-29 colon carcinoma cells with extracellular matrix components: role of Integrin expression and cytoskeletal components, *British Journal of Cancer* 1999, 80(12), 1867–1874.
- 39) Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(4):639-51.
- 40) Dittmar T, Heyder C, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Zänker KS. Adhesion molecules and chemokines: the navigation system for circulating tumor (stem) cells to metastasize in an organ-specific manner. *Clin Exp Metastasis* 2008, 25(1): 11-32. Review.
- 41) Zlotnik A. New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J Pathol.* 2008, 215(3):211-3. Review.
- 42) Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 2000, 52(1): 145-176.
- 43) Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000, 12(2): 121-127. Review.
- 44) Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of Chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000, 18: 593-620. Review.
- 45) Kim CH, Broxmeyer HE. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J. Leukoc Biol* 1999, 65(1): 6-15. Review.
- 46) Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood.* 2006, 107(5):1761-7. Review
- 47) Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 2004, 4(7): 540-50.
- 48) Lee B-C, Lee T-H, Avraham S, Avraham HK. Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1 α in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Mol Cancer Res* 2004, 2(6): 327-38.
- 49) Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue Chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 1999, 162(5): 2472–5.
- 50) Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naïve T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95(1):258–63.
- 51) Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu M, Hwang ST. Expression of CC Chemokine Receptor-7 and Regional Lymph Node Metastasis of B16 Murine Melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93(21):1638–43.
- 52) Wilson JL, Burchell J, Grimshaw MJ. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor and hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res* 2006, 66 (24):11802-7.

- 53) Wang J, Xi L, Hunt JL, Gooding W, Whiteside TL, Chen Z, Godfrey TE, Ferris RL. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer Res.* 2004, 64(5):1861-6.
- 54) Corcione A, Arduino N, Ferretti E, Raffaghello L, Roncella S, Rossi D, Fedeli F, Ottonello L, Trentin L, Dallegri F, Semenzato G, Pistoia V. CCL19 and CXCL12 Trigger in Vitro Chemotaxis of Human Mantle Cell Lymphoma B Cells. *Clinical Cancer Research* 2004, 964 (10): 964–971.
- 55) Wang J, Seethala RR, Zhang Q, Gooding W, van Waes C, Hasegawa H, Ferris RL. Autocrine and Paracrine Chemokine Receptor 7 Activation in Head and Neck Cancer: Implications for Therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 2008, 100 (7): 502-12.
- 56) Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E, Hoon DS. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (7): 2351 – 2358.
- 57) Tosi L, Rinaldi E, Carinci F, Farina A, Pastore A, Pelucchi S, Cassano L, Evangelisti R, Carinci P, Volinia S. Akt, protein kinase C, and mitogenactivated protein kinase phosphorylation status in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2005, 27 (2): 130 – 137.
- 58) Rosenow F, Ossig R, Thormeyer D, Gassmann P, Schlüter K, Brunner G, Haier J, Eble JA. Integrins as Antimetastatic Targets of RGD-Independent Snake Venom Components in Liver Metastasis. *Neoplasia* 2008, 10(2): 168-172.
- 59) Lester BR, McCarthy JB. Tumor cell adhesion to the extracellular matrix and signal transduction mechanisms implicated in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1992, 11(1): 31-44 Review.
- 60) Hahn E, Wick G, Pencev D, Timpl R. Distribution of basement membrane proteins in normal and fibrotic human liver: collagen type IV, laminin and fibronectin. *Gut* 1980, 21(1), 63-71.
- 61) Enns A, Gassman P, Schlüter K, Korb T, Spiegel HU, Senninger N, Haier J. Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. *J Gastrointest Surg* 2004, 8(8): 1049-1059.
- 62) Enns A, Korb T, Schlüter K, Gassman P, Spiegel HU, Senninger N, Mitjans F, Haier J. Alpha v beta 5-integrins mediate early steps of metastasis formation. *Eur J Cancer* 2005, 41(7): 1065-1072.
- 63) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* Sarah Gibbs. New York, Garland Science, 2002, 1090-1092.
- 64) Dogic D, Rousselle P, Aumailley M. Cell adhesion to laminin 1 or 5 induces isoform-specific clustering of integrins and other focal adhesion components. *J Cell Sci* 1998, 111(Pt6): 793-802.
- 65) Aumailley, M., Gimond, C, Rousselle, P. Integrin-mediated cellular interactions with laminins. In *the Laminins.* Ekblom P and Timpl R. Amsterdam. Harwood Academic Publishers. 1996,127-158.
- 66) Felding-Habermann B. Integrin adhesion receptors in tumor metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2003, 20(3): 203-13. Review.
- 67) Mizejewski GJ. Role of Integrins in Cancer: Survey of Expression Patterns. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999, 222(2): 124-138.
- 68) Sung V, Stubbs JT, Fisher L, Aaron AD, Thompson EW. Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins. *J. Cell Physiol* 1998, 176(3): 482-94.
- 69) Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996, 84(3), 345-357. Review.

- 70) Yamada KM, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997, 9(1), 76-85. Review
- 71) Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2(11): 793-805.
- 72) Bosman, FT, Havenith, MG, Visser, R, Cleutjens, JP. Basement membranes in neoplasia. *Prog Histochem. Cytochem* 1992, 24(4): 1-92.
- 73) Kleinman, HK, Koblinski J, Lee S, Engbring J. Role of basement membrane in tumor growth and metastasis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 2001, 10(2): 329-338. Review.
- 74) Lyubimov AV, Black KL, Lyubimova Yu. Yu. *Vestnik RONTs* 2003, 3: 83-91.
- 75) Condeelis J, Singer RH, Segall JE. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005, 21: 695-718. Review.
- 76) Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(5):362-374. Review.
- 77) Alexandrova AY. Evolution of Cell Interactions with Extracellular Matrix during Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)* 2008, 73 (7):733-741.
- 78) Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina E I., Strongin AY, Bocker E B, Friedl P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* 2003, 160(2): 267-277.
- 79) Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* 2005, 96(7): 379-386. Review.
- 80) Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996, 84(3): 359-369. Review.
- 81) Zamir E, Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 2001, 114(Pt20): 3583-3590. Review.
- 82) Nobes CD, Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell* 1995, 81(1): 53-62.
- 83) Rottner K, Hall A, Small, JV. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* 1999, 9(12): 640-648.
- 84) Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J. Cell Biol.* 1998, 142(2): 573-586.
- 85) Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 2004, 164(3): 427-439.
- 86) Linder S, Nelson D, Weiss M, Aepfelbacher M. Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96(17): 9648-9653.
- 87) Gimona M. The microfilament system in the formation of invasive adhesions. *Semin. Cancer Biol.* 2008, 18(1): 23-34. Review.
- 88) Ioachim E, Charchanti A, Briasoulis E, Karavasilis V, Tsanou H, Arvanitis D L, Pavlidis N, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin,

fibronectin, collagen type IV and Laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. *Eur. J. Cancer* 2002, 38(18): 2362-2370.

89) Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95(11):5857-5864.

90) Mackay DJG, Hall A. Rho-GTPases. Minireview. *The Journal of Biological Chemistry* 1998. 273 (33): 20685-88.

91) Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 2004, 265(1):23-32. Review.

92) Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol.* 2003, 5 (8):711-9.

93) Hall A. Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 1992, 3(5):475-9.

94) Moon SY, Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* 2003, 13(1):13-22. Review.

95) Schmidt A, Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho-GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 2002, 16(3): 1587-1609. Review.

96) Zheng Y, Bagrodia S, Cerione RA. Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J. Biol. Chem.* 1994, 269(29):18727-18730.

97) Nobes CD, Hawkins P, Stephens L, Hall A. Activation of the small GTP-binding proteins Rho and Rac by growth factor receptors. *J. Cell Sci.* 1995, 108(Pt1):225-233.

98) Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992, 70(3): 389-399.

99) Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein Rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992, 70(3): 401-410.

100) Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 1999, 285(5429):895-898.

101) Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K. Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Cell Biol.* 1999, 147(5): 1023-1038.

102) Mitchison TJ, Cramer L. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 1996, 84(3):371-379. Review.

103) Weaver AM, Young ME, Lee WL, Cooper JA. Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003, 15(1):23-30.

104) Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 1999, 97(2): 221-231.

105) Kraynov VS, Chamberlain C, Bokoch GM, Schwartz MA, Slabaugh S, Hahn KM. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 2000, 290(5490): 333-337.

106) Stephens L, Ellson C, Hawkins P. Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin. Cell Biol.* 2002, 14(2): 203-213. Review.

- 107) Reif K, Nobes CD, Thomas G, Hall A, Cantrell DA. Phosphatidylinositol 3-kinase signals activate a selective subset of Rac/Rho-dependent effector pathways. *Curr. Biol.* 1996, 6(11):1445-1455.
- 108) Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L, Firtel RA. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 2002, 109(5): 611-623.
- 109) Abe K, Rossman KL, Liu B, Ritola KD, Chiang D, Cambell SL, Burridge K, Der CJ. Vav 2 is an activator of Cdc42, Rac 1 and Rho A. *J. Biol. Chem* 2000, 275(14):10141-49.
- 110) Weiner OD, Neilsen PO, Prestwich GD, Kirschner MW, Cantley LC, Bourne HR. A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat. Cell Biol.* 2002, 4(7):509-513.
- 111) Klemke RL, Leng J, Molander R, Brooks PC, Vuori K, Cheresch DA. CAS/Crk Coupling Serves as a "Molecular Switch" for Induction of Cell Migration. *J. Cell Biol.* 1998, 140 (4):961-972.
- 112) Cheresch DA, Leng J, Klemke RL. Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J. Cell Biol.* 1999, 146(5):1107-1116.
- 113) Gu J, Sumida Y, Sanzen N, Sekiguchi K. Laminin-10/11 and Fibronectin Differentially Regulate Integrin dependent Rho and Rac Activation via p130Cas-CrkII-DOCK180 Pathway. *J Biol. Chem.* 2001, 276 (29): 27090–27097.
- 114) Sander EE, ten Klooster JP, van Delft S, van der Kammen RA, Collard JG. Rac Downregulates Rho Activity: Reciprocal Balance between Both GTPases Determines Cellular Morphology and Migratory Behavior. *The Journal of Cell Biology* 1999, 147 (5):1009-1021.
- 115) Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell.* 1998, 9(7):1863-71.
- 116) Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 2000, 348 Pt 2:241-255.
- 117) Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002, 34(7):746-61.
- 118) Tsubouchi A, Sakakura J, Yagi R, Mazaki Y, Schaefer E, Yano H, Sabe H. Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J Cell Biol* 2002, 159(4): 673-683.
- 119) Moran MF, Polakis P, McCormick F, Pawson T, Ellis C. Proteintyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21 ras GTPase-activating protein. *Mol. Cell. Biol.* 1991, 11 (4): 1804-12.
- 120) Chang J-H, Gill S, Settleman J, Parsons SJ. C-Src Regulates the Simultaneous Rearrangement of Actin Cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following Epidermal Growth Factor Stimulation. *The Journal of Cell Biology* 1995, 130(2):355-368.
- 121) Tsuji T, Ishizaki T, Okamoto M, Higashida C, Kimura K, Furuyashiki T, Arakawa Y, Birge RB, Nakamoto T, Hirai H, Narumiya S. ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 2002, 157 (5):819-30.
- 122) Arthur WT, Burridge K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol. Biol. Cell.* 2001, 12(9):2711–2720.
- 123) Papakonstanti EA, Ridley AJ, Vanhaesebroeck B. The p110 δ isoform of PI3-kinase negatively controls Rho A and PTEN. *The EMBO Journal* 2007. 26(13): 3050-61.

- 124) Li Y, Qiu X, Zhang S, Zhang Q, Wang E. Hypoxia induced CCR7 expression via HIF-1 α and HIF-2 α correlates with migration and invasion in lung cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2009, 8(4):322-30.
- 125) Ellenbroek SI, Collard JG. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007, 24(8):657–672.
- 126) Fritz G, Just I, Kaina B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer* 1999, 81(5):682–687.
- 127) Pan Y, Bi F, Liu N, Xue Y, Yao X, Zheng Y, Fan D. Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 315(3):686–691.
- 128) Abraham MT, Kuriakose MA, Sacks PG, Yee H, Chiriboga L, Bearer EL, Delacure MD. Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope* 2001, 111(7):1285–1289.
- 129) Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2003, 9(7):2632–2641.
- 130) Kamai T, Yamanishi T, Shirataki H, Takagi K, Asami H, Ito Y, Yoshida K. Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10(14):4799–4805.
- 131) Mira JP, Benard V, Groffen J, Sanders LC, Knaus UG. Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97(1):185–189.
- 132) Mertens AE, Rygiel TP, Olivo C, van der Kammen R, Collard JG. The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol* 2005, 170(7):1029–1037.
- 133) Lozano E, Betson M, Braga VM. Tumor progression: Small GTPases and loss of cell–cell adhesion. *Bioessays* 2003, 25 (5):452–463. Review.
- 134) Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004, 23(48): 7906–7909.
- 135) Playford MP, Schaller MD. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* 2004, 23(48): 7928–7946.
- 136) Sotsios Y, Ward SG. Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines. *Immunol Rev* 2000. 177: 217-235.
- 137) Akekawatchai C, Holland JD, Kochetkova M, Wallace JC, McColl SR. Transactivation of CXCR4 by the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in human MDA-MB-231 breast cancer epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2005, 280(48): 39701-39708.
- 138) Fernandis AZ, Prasad A, Band H, Klösel R, Ganju RK. Regulation of CXCR4-mediated chemotaxis and chemoinvasion of breast cancer cells. *Oncogene* 2004, 23(1):157-167.
- 139) Holland JD, Kochetkova M, Akekawatchai C, Dottore M, Lopez A, McColl SR. Differential functional activation of Chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. *Cancer Res* 2006, 66(8): 4117-24.
- 140) Qiu H, Orr FW, Jensen D, Wang HH, McIntosh AR, Hasinoff BB, Nance DM, Pylypas S, Qi K, Song C, Muschel RJ, Al-Mehdi AB. Arrest of B16 melanoma cells in the mouse pulmonary microcirculation induces endothelial nitric oxide synthase-dependent nitric oxide release that is cytotoxic to the tumor cells. *Am J Pathol* 2003, 162(2): 403-12.

- 141) Wang H, Fu W, Im JH. Tumor cell alpha3beta1 integrin and vascular laminin-5 mediate pulmonary arrest and metastasis. *J. Cell Biol.* 2004, 164(6): 935-941.
- 142) Christensen L. The distribution of fibronectin, laminin and tetranectin in human breast cancer with special attention to the extracellular matrix. *APMIS Suppl.* 1992, 26:1-39.
- 143) Grzesiak JJ, Smith KC, Burton DW, Deftos LJ, Bouvet M. Integrin-mediated laminin-1 adhesion upregulates CXCR4 and IL-8 expression in pancreatic cancer cells. *Surgery* 2006, 141(6): 804-14.
- 144) Jones J, Marian D, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, Jonas D, Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Exp. Cell Res* 2007, 313(19): 4051-65.
- 145) Chinni SR, Yamamoto H, Dong Z, Sabbota A, Bonfil RD, Cher ML. CXCL12/CXCR4 Transactivates HER2 in Lipid Rafts of Prostate Cancer Cells and Promotes Growth of Metastatic Deposits in Bone. *Mol Cancer Res* 2008, 6(3):446-457.
- 146) Andrew N, Insall RH. Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns-3-kinase by biased choices between random protrusions. *Nat Cell Biol* 2007, 9(2): 193-200.
- 147) Wolf K, Friedl P. Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol Review* 2006, 154 Suppl 1:11-5. Review.
- 148) Liu Y, Senger DR. Matrix-specific activation of Src and Rho initiates capillary morphogenesis of endothelial cells. *FASEB J* 2004, 18(3): 457-468.
- 149) Bartolomé RA, Gálvez BG, Longo N, Baleux F, van Muijen GNP, Sánchez-Mateos P, Arroyo AG, Teixidó J. Stromal cell-derived factor-1 α promotes melanoma cell invasion across basement membranes involving stimulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and Rho-GTPase activities. *Cancer Res.* 2004, 64 (7):2534-43.
- 150) Mburu YK, Wang J, Wood MA, Walker WH, Ferris RL. CCR7 Mediates Inflammation-Associated Tumor Progression. *Immunologic Research* 2006, 36/1–3:61–72.
- 151) Garmy-Susini B, Varner JA. Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol.* 2008, 6(3-4):155-63.
- 152) Yanagawa Y, Onoé K. CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. *Blood.* 2002, 100(6):1948-56.
- 153) Bleul CC, Schultze JL, Springer TA. B lymphocyte chemotaxis regulated in association with microanatomic localization, differentiation state, and B cell receptor engagement. *J. Exp. Med.* 1998, 187(5): 753–762.
- 154) Baekkevold ES, Yamanaka T, Palframan RT, Carlsen HS, Reinholt FP, von Andrian UH, Brandtzaeg P, and Haraldsen G. The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J. Exp. Med.* 2001, 193(9): 1105–1112.
- 155) Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The Chemokine receptor CCR7 and 4 integrin are important for migration of chronic 970 Mantle Cell Lymphoma Attraction by CCL19 and CXCL12 lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 2002, 99(8): 2977–2984.
- 156) Cacéres M, Guerrero J, Martínez J. Overexpression of Rho-GTP induces activation of the Epidermal Growth Factor Receptor, dephosphorylation of focal adhesion kinase and increased motility in breast cancer cells. *Experimental Cell Research* 2005, 309(1):229-238.
- 157) Yanagawa Y, Onoé K. CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities. *Blood.* 2003, 101(12):4923-9.

- 158) Grimshaw MJ, Hagemann T, Ayhan A, Gillett CE, Binder C, Balkwill FR. A Role for Endothelin-2 and Its Receptors in Breast Tumor Cell Invasion. *Cancer Res* 2004, 64(7):2461–2468.
- 159) Wendel C, Haier J. *Encyclopedia of Cancer 2nd Edition: The Focal Adhesion Kinase*. Manfred Schwab. Berlin, Heidelberg, New York. Springer, 2008, 1148-51.
- 160) Wang JF, Park IW, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 2000. 95 (8):2505-13.
- 161) Le Y, Honczarenko M, Glodek AM, Ho DK, Silberstein LE. CXC chemokine ligand 12-induced focal adhesion kinase activation and segregation into membrane domains is modulated by regulator of G protein signaling 1 in pro-B cells. *J Immunol.* 2005, 174(5):2582-90.
- 162) van Buul JD, Voermans C, van Gelderen J, Anthony EC, van der Schoot CE, Hordijk PL. Leukocyte-endothelium interaction promotes SDF-1-dependent polarization of CXCR4. *J Biol Chem.* 2003, 278(32):30302-10.
- 163) Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, Kinashi T. Rap1 translates chemokine signals to Integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *The Journal of Cell Biology* 2003, 161 (2):417-27.
- 164) Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, Laudanna C. Chemokines trigger immediate β 2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 2000, 13 (6):759–769.
- 165) Ivanoff J, Talme T, Sundqvist K-G. The role of chemokines and extracellular matrix components in the migration of T lymphocytes into three-dimensional substrata. *Immunology* 2005, 114: 53-62.
- 166) Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J. Leukoc Biol.* 2004, 75 (6):951-61.
- 167) Nishita M, Aizawa H, Mizuno K. Stromal Cell-Derived Factor 1 Activates LIM Kinase 1 and Induces Cofilin Phosphorylation for T-Cell Chemotaxis. *Molecular and Cellular Biology* 2002, 22(3): 774–783.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei folgenden Personen bedanken:

Herrn Prof. Dr. J. Haier für die Bereitstellung und Überlassung des interessanten Themas im Molekularbiologischen Labor der Allgemeinen und Viszeral-Chirurgie des Universitätsklinikums Münster und für die freundliche Unterstützung während meiner Promotionsarbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Püschel für die freundliche Unterstützung und Übernahme des Koreferats.

Meinen Kolleginnen Katja Hagen, Ludgera Weber-Koberg, Frauke Spiecker und Heide Lehmann für Ihre nette und tatkräftige Zusammenarbeit im Labor.

Meinen Lebensgefährten M. Gamoussi für seine Unterstützung und sein Verständnis, dass er mir in stressigen Zeiten entgegengebracht hat.

Und meiner Familie, weil sie immer für mich da sind.