

Funktion und Regulation des Chemokinrezeptors CXCR7

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Frauke Hoffmann

geboren am 05.10.1981 **in** Oldenburg

Gutachter

- 1.** Prof. Dr. Ralf Stumm
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsklinikum Jena

- 2.** Prof. Dr. Marcus Thelen
Institute for Research in Biomedicine
Università della Svizzera italiana

- 3.** PD Dr. Barbara Moepps
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universität Ulm
Medical Center

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06. November 2012

Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
AMD3100	1-[[1,4,8,11-tetrazacyclotetradec-1-ylmethyl)phenyl]methyl]-1,4,8,11-tetrazacyclotetradecane
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
CHO-K1	Chinese hamster ovary cells; Zelllinie
CHX	Cycloheximid; 4-[(2 <i>R</i>)-2-[(1 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)- 3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl]- 2-hydroxyethyl] piperidin-2,6-dion
CPM	Counts per Minute; Zählungen pro Minute
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	Extracellular signal Regulated Kinase 1/2
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HA	Hämagglutinin
HEK293	Human embryonic kidney cells; Zelllinie
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mk	monoklonal
Mock	Negativkontrolle für die Rezeptortransfektion; statt Rezeptor-Vektor-Konstrukt wird nur der leere Vektor transfiziert
NK1-R	Neurokinin-1 Rezeptor
PTX	Pertussistoxin
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1; auch CXCL12
TFR	Transferrinrezeptor
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit gebundenem G-Protein	2
1.2	Internalisierung und Recycling von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	3
1.3	Schematische Darstellung eines Chemokinrezeptors und seiner spezifischen strukturellen Eigenschaften	4
1.4	Schematische Darstellung der monomeren Struktur von SDF-1 α	5
3.1	Subzelluläre Verteilung und Rezeptortrafficking von CXCR7 und CXCR4	20
3.2	Unterschiede bei der Liganden-unabhängigen Internalisierung der Wildtyprezeptoren und Tail-swap-Mutanten	22
3.3	Einfluss verschiedener internalisierungsrelevanter Motive im CXCR7 C-Terminus auf die Liganden-unabhängige Internalisierung	24
3.4	Regulation der Rezeptordegradation durch die C-terminale Domäne	26
3.5	Bindung von SDF-1 an Wildtyprezeptoren und Rezeptormutanten und Internalisierung der CXCR7-2cD4 Rezeptorchimären	28
3.6	Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 durch rezeptorvermittelte Aktivierung von G α_i -Proteinen	30
3.7	Kopplung von wildtypischen und chimären Rezeptoren an G-Proteinchimären	32
3.8	Unterschiede zwischen Liganden-unabhängiger und Liganden-abhängiger Internalisierung der Wildtyprezeptoren und Tail swap-Mutanten	34
3.9	C-terminale Phosphorylierung von CXCR4-WT und CXCR7-4tail	35
3.10	Schnelle Endocytose und Degradation von ¹²⁵ I-SDF-1 durch den CXCR7 C-Terminus	37
3.11	Unterschiede bei der Internalisierung von CXCR7-WT und Serin/Threonin-defizienten Mutanten	40
Tab. 3.1	Aminosäuresequenzen der wildtypischen und chimären CXCR7 und CXCR4 Rezeptoren	21

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	III
	Abbildungsverzeichnis	IV
	Inhaltsverzeichnis	V
	Zusammenfassung	VI
1	Einleitung	1
1.1	G-Protein gekoppelte Rezeptoren	1
1.2	Chemokinrezeptoren	4
1.3	Das Chemokin SDF-1	5
1.4	SDF-1 und sein Chemokinrezeptor CXCR4	6
1.5	Der atypische Chemokinrezeptor CXCR7	8
1.6	Die physiologische Bedeutung des CXCR4-CXCR7-SDF-1-Systems	10
1.7	Pathologische Relevanz von CXCR7	11
1.8	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material & Methoden	13
2.1	Plasmidkonstrukte	13
2.1.1	<i>Rezeptoren</i>	<i>13</i>
2.1.2	<i>G-Proteine</i>	<i>13</i>
2.2	Zellkultur und Transfektion	14
2.3	Immuncytochemie	14
2.4	ELISA	15
2.5	Radioliganden-Versuche	15
2.6	Western-Immunoblots (Rezeptoren)	16
2.7	Western-Immunoblots ERK1/2-Aktivierung	17
2.8	[Ca ²⁺] _i Messungen	18

3	Ergebnisse	19
3.1	Subzelluläre Verteilung und Endocytose von CXCR7 und CXCR4	19
3.2	Regulation der Liganden-unabhängigen Rezeptorinternalisierung durch die C-terminale Domäne	20
3.3	Regulation der Rezeptorstabilität durch die C-terminale CXCR7-Domäne	25
3.4	Der CXCR7 C-Terminus erhöht die Affinität der Rezeptoren für SDF-1	27
3.5	Der CXCR7-Rezeptor unterbindet die Aktivierung von G-Proteinen	29
3.6	Regulation der Liganden-abhängigen Rezeptorinternalisierung	33
3.7	Aktivierung der CXCR7-4tail Mutante	35
3.8	Der CXCR7 C-Terminus beschleunigt die Aufnahme und den Abbau von SDF-1	36
3.9	Potentielle Phosphorylierungsstellen im CXCR7 C-Terminus beeinflussen die Geschwindigkeit der Rezeptorinternalisierung	39
4	Diskussion	42
4.1.1	Die Spontane Internalisierung wird durch den CXCR7 C-Terminus reguliert und erfolgt über Clathrin-vermittelte Endocytose	42
4.1.2	G-Protein und MAP-Kinase Aktivierung werden durch den CXCR7 C-Terminus reguliert	43
4.1.3	Die C-terminale Domäne von CXCR7 beeinflusst die Rezeptorstabilität	44
4.1.4	Schnelle Internalisierung und Degradation von SDF-1 werden durch die C-terminale Domäne vermittelt	46
4.1.5	Strukturelle Determinanten im CXCR7 C-Terminus regulieren die Rezeptorinternalisierung	47
5	Schlussfolgerungen	50
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	51
7	Anhang	59
	Lebenslauf	60
	Danksagung	61
	Ehrenwörtliche Erklärung	62

Zusammenfassung

Der Chemokinrezeptor CXCR7 spielt eine essentielle Rolle bei der normalen Entwicklung und fördert die Initiation und Progression verschiedener pathologischer Prozesse wie Krebs und Autoimmunerkrankungen. Er ist ein atypischer Rezeptor, der nicht an G-Proteine koppelt und als effektiver Scavenger für SDF-1 agiert. Der zweite SDF-1-bindende Chemokinrezeptor CXCR4 aktiviert intrazelluläre Signalkaskaden über G-Proteine und vermittelt so physiologisch und pathologisch relevante Zellmigrationsprozesse. Indem er als Scavenger für SDF-1 agiert, moduliert CXCR7 den CXCR4-SDF-1-Signalweg. Um die Funktionen von CXCR7 besser zu verstehen und die strukturellen Domänen zu definieren, welche die entgegengesetzten Effekte der beiden SDF-1-Rezeptoren regulieren, wurden Tail swap-Mutanten und weitere Rezeptorchimären erzeugt.

Die Wildtyprezeptoren oder Rezeptormutanten wurden in HEK293 oder CHO-K1 Zellen exprimiert und es wurde das Rezeptortrafficking, die Bindung, Internalisierung und Degradation von SDF-1, die G-Protein Kopplung und die Aktivierung von MAP-Kinasen untersucht. Dabei zeigte sich, dass CXCR7 bereits ohne Ligand schnell internalisiert und dass dieser Prozess durch Clathrin-vermittelte Endocytose vermittelt wird. Die Internalisierung wird durch den Liganden noch beschleunigt und ihre Geschwindigkeit ist abhängig von der C-terminalen Domäne. Rezeptoren mit dem CXCR4 C-Terminus internalisieren deutlich langsamer und die Internalisierung ist nur unter Ligandeneinfluss effektiv. Zusätzlich zur schnellen Internalisierung haben Rezeptoren mit dem CXCR7 C-Terminus eine höhere Affinität für SDF-1 als Rezeptoren mit der entsprechenden C-terminalen Domäne von CXCR4, woraus eine effektive SDF-1-Internalisierung und eine deutlich höhere Degradation von SDF-1 resultieren. Diese Effekte konnten trotz einer verstärkten, basalen Degradation dieser Rezeptoren beobachtet werden, die zu geringen Gesamtrezeptorspiegeln führte. Da die Expressionsspiegel dennoch konstant blieben, müssen Prozesse wie de novo Synthese und Rezeptorrecycling eine zusätzliche Rolle spielen. CXCR4 wurde dagegen unter Ligandeneinfluss degradiert und es fand bei andauernder SDF-1 Behandlung keine Auffüllung des Rezeptorproteins statt.

Für CXCR7, beide Tail swap-Mutanten und zwei weitere CXCR7-Mutanten, welche die zweite cytosolische Domäne von CXCR4 enthalten, konnte keine G-Protein Kopplung nachgewiesen werden. Nur CXCR4 zeigte eine G-Protein vermittelte Calcium-Antwort. Auch eine MAPK-Aktivierung konnte nur für CXCR4 gezeigt werden. Dafür konnte an der CXCR7-Mutante mit dem CXCR4 C-Terminus eine konstitutive Phosphorylierung gezeigt werden, die durch SDF-1 weiter intensiviert wurde. Diese C-terminale Phosphorylierung

wurde vermutlich durch die Basis des CXCR7-Rezeptors hervorgerufen. Da im Allgemeinen die Phosphorylierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren über die Entkopplung von G-Proteinen zur Rezeptordesensibilisierung führt, wurde diese Phosphorylierung zur Erklärung der fehlenden CXCR7-Signalgebung herangezogen.

Analog zu der Erkenntnis, dass CXCR7 bestimmten Phosphorylierungsmechanismen unterliegt, kristallisierte sich als vielversprechendste Mutante in Bezug auf die Rezeptorregulation eine Phosphorylierungsstellen-defiziente Mutante ohne C-terminale Serin- und Threoninreste (CXCR7-ST/A) heraus. Diese Mutante zeigte sowohl Liganden-unabhängig, als auch unter Behandlung mit SDF-1 eine deutlich verlangsamte Rezeptorinternalisierung und auch die Internalisierung von SDF-1 war deutlich eingeschränkt. Diese Effekte wurden bei dem Versuch die Phosphorylierungsstellen strukturell einzugrenzen allerdings geringer, so dass bei den Effekten von einem Zusammenspiel mehrerer, über den C-Terminus von CXCR7 verteilter Phosphorylierungsstellen auszugehen ist.

Zusammengenommen bestätigen die Ergebnisse, dass CXCR7 ein effektiver Scavenger für SDF-1 ist und weisen darauf hin, dass diese Funktion aufgrund der starken Rezeptordegradation strengen Regulationsmechanismen wie de novo Synthese und Rezeptorrecycling unterliegt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Domäne von CXCR7 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Rezeptorfunktion spielt und dass diese regulatorische Funktion durch umfangreiche C-terminale Phosphorylierungen vermittelt wird.

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) beinhaltet Rezeptoren für Hormone, Cytokine, Neurotransmitter, visuelle Lichtwellen und Chemokine (Schier et al., 2003) und stellt damit ein attraktives Ziel für pharmakologische Ansätze dar. Ihre Liganden machen derzeit etwa 30% aller klinisch angewandten pharmazeutischen Wirkstoffe aus (Wise et al., 2002; Overington et al., 2006). Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren tragen ihren Namen, da sie zunächst als Rezeptoren bekannt waren, die bei Stimulation durch einen extrazellulären Reiz intrazellulär G-Proteine (Guaninnukleotid-bindende Proteine) binden, diese aktivieren und so intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen. Seit Neuerem ist allerdings bekannt, dass es auch andere, G-Protein unabhängige Wege der GPCR-vermittelten Signaltransduktion gibt (Ferguson et al., 1996; Luttrell et al., 2008).

Die heterotrimeren G-Proteine, denen die Familie ihren Namen verdankt, bestehen aus drei Untereinheiten, von denen jeweils mehrere Isoformen existieren. Von der α -Untereinheit sind 21 Isoformen, von der β -Untereinheit 5 und von der γ -Untereinheit 12 Isoformen bekannt. Die Aktivierung verschiedener Signalwege hängt von diesen Isoformen ab. So aktivieren z.B. die Isoformen der $G\alpha_q$ -Familie die Phosphoinositoidkaskade, während die $G\alpha_s$ -Familie die Adenylat-Cyclase-Kaskade aktiviert und die $G\alpha_i$ -Familie diese Kaskade hemmt. Im inaktiven Zustand liegen die drei Untereinheiten als Komplex vor und an der α -Untereinheit ist ein GDP gebunden. Durch den aktiven Rezeptor wird dann das GDP durch ein GTP ausgetauscht, wodurch das G-Protein aktiviert wird und in die Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ zerfällt, die dann ihrerseits mit weiteren Signalmolekülen interagieren. Das G-Protein wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit wieder deaktiviert, wodurch die Untereinheiten wieder reassoziieren und erneut an einen Rezeptor binden können. Heterotrimere G-Proteine unterliegen also einer Art von Selbstregulation (Lodish et al., 2001).

Trotz der großen Vielfalt an extrazellulären und intrazellulären Bindungspartnern weisen die GPCRs viele Gemeinsamkeiten auf und sind sich vor allem strukturell sehr ähnlich. Sie haben alle eine extrazelluläre, aminoternale Domäne, die eine zentrale Funktion bei der Ligandenbindung hat, und eine intrazelluläre, carboxyterminale Domäne, die an der G-Proteinbindung und Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden beteiligt ist. Zwischen diesen beiden Domänen liegen sieben α -helikale Transmembrandomänen, die alternierend über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen verbunden sind. Jede dieser

Domänen hat ihre eigene Funktion im Rahmen der Signaltransduktion. Aufgrund der speziellen Struktur der GPCRs werden sie auch als Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren (7-TM-Rezeptoren) bezeichnet (Lodish et al., 2001).

Der intrazelluläre Teil der Rezeptoren unterliegt vielen verschiedenen Modulierungsmechanismen, welche die Aktivität der Rezeptoren beeinflussen. Dies erfolgt vor allem über Phosphorylierungen, die hauptsächlich von G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Kinasen (GRKs) und second-messenger-abhängigen Kinasen initiiert werden (Freedman et al., 1995; Mestek

et al., 1995; Qiu et al., 2003). Zu letzteren zählen die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und die Phosphoinositoid-abhängige Proteinkinase C (PKC), die selbst über die oben genannten G-Protein-induzierten Signalkaskaden reguliert werden. Die Phosphorylierung der GPCRs führt meist zur Desensibilisierung, da die Bindungsaffinität für G-Proteine verringert ist und die Interaktion mit anderen Proteinen wie z.B. β -Arrestinen, die GPCRs mit dem Endocytose-Apparat verknüpfen, gefördert wird.

Die Internalisierung ist ein weiterer Mechanismus, der Einfluss auf die Signaltransduktion der GPCRs hat. Nur an der Zelloberfläche verfügbare Rezeptoren können aktiviert werden. Die Rezeptorinternalisierung wird meist durch die Anwesenheit eines Agonisten induziert bzw. beschleunigt (von Zastrow et al., 1994). Es gibt zwei Möglichkeiten, wie ein Rezeptor internalisiert werden kann. Bei der Ersten handelt es sich um die Clathrin-vermittelte Endocytose. Dabei vermitteln die an die phosphorylierten Rezeptoren gebundenen β -Arrestine die Rekrutierung der Rezeptoren zu „Clathrin-coated pits“ (Abb. 1.2). Sie interagieren mit dem Adapterprotein AP-2 und Clathrin und sorgen so für die Integration der Rezeptoren in den „Clathrin-coated pit“. Weitere Interaktionen mit c-Src und Dynamin führen schließlich zur Abschnürung eines Clathrin-beschichteten Vesikels. Anschließend wird der Vesikel mit einem Endosom vereint und die Adapterproteine und Clathrine dissoziieren. Im

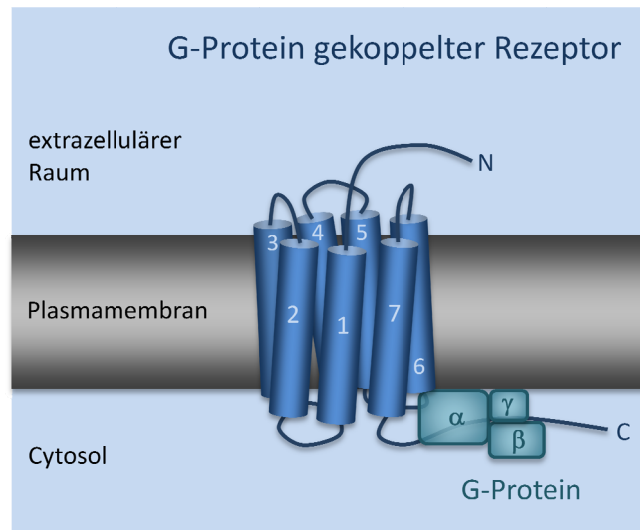


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit gebundenem G-Protein. Ausgehend von der extrazellulären, aminoterminalen Domäne durchziehen sieben Transmembrandomänen die Plasmamembran. Sie sind alternierend über intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen verbunden. Der Rezeptor endet mit seiner carboxyterminalen Domäne intrazellulär im Cytosol. Die Bindung und Aktivierung des G-Proteins erfolgt durch die C-terminale Domäne und intrazelluläre Schleifen.

Endosom dissoziiert der gebundene Ligand und wird dem Abbau in Lysosomen zugeführt. Die Rezeptoren werden entweder ebenfalls abgebaut oder sie gelangen über Recyclingendosomen dephosphoryliert zurück an die Plasmamembran (Delom und Fessart, 2011). Neben der Endocytose über „Clathrin-coated vesicles“ gibt es aber auch noch einen alternativen Endocytoseweg über Caveolae (Claing et al., 2002). Caveolae sind spezielle „Lipid Rafts“, die sich aus Lipid-angereicherten Mikrodomänen der Plasmamembran bilden und bei denen Caveolin als wichtiges strukturelles Element gilt. Dieser Endocytoseweg scheint jedoch langsamer zu sein, als der Clathrin-abhängige Mechanismus. Die Internalisierung der meisten GPCRs erfolgt hauptsächlich über die Clathrin-vermittelte Endocytose.

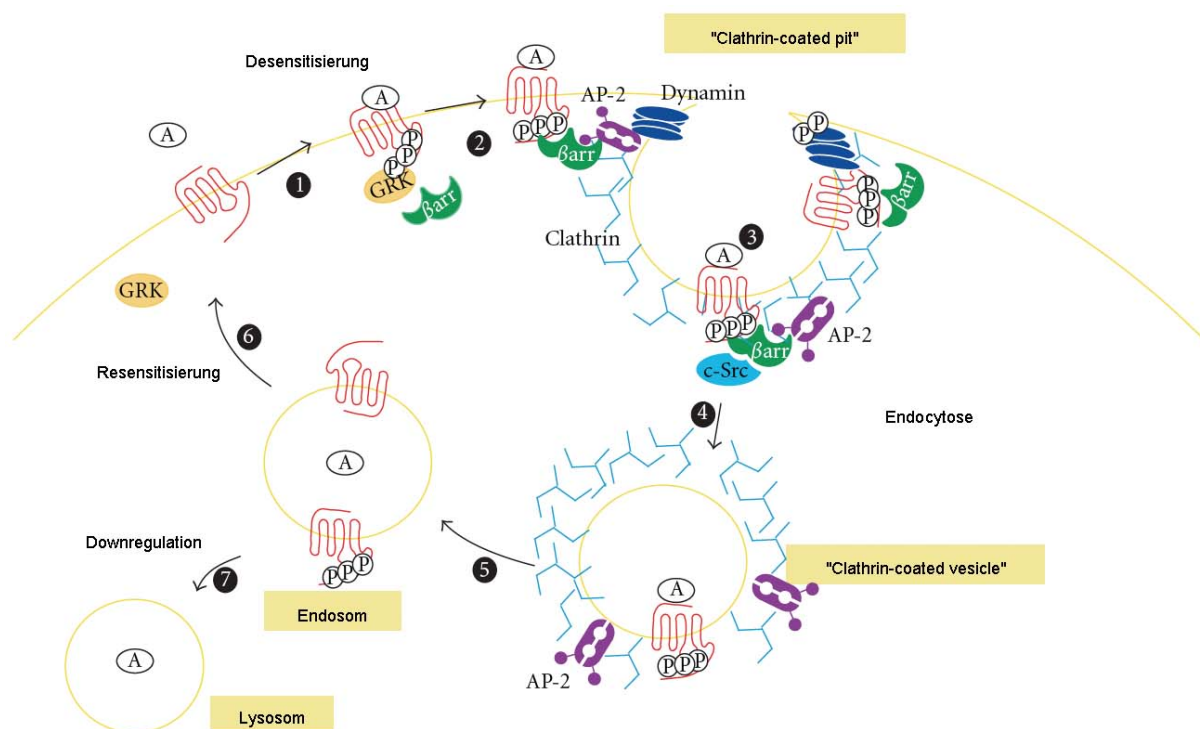


Abbildung 1.2: Internalisierung und Recycling von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Nach der Agonistbindung kommt es zur Rezeptorphosphorylierung durch GRKs, die zur Rekrutierung von β -Arrestinen führt (Schritt 1). Beta-Arrestine interagieren mit Clathrin und AP-2 und leiten die Rezeptor/Arrestin-Komplexe zu den „Clathrin-coated pits“ (Schritt 2). Außerdem bindet β -Arrestin c-Src (Schritt 2 und 3). Die GTPase Dynamin reguliert die Abschnürung des „Clathrin-coated pits“ von der Zelloberfläche (Schritt 3 und 4). Nach der Bildung der „Clathrin-coated vesicles“ (Schritt 4) wird der Rezeptor in Endosomen internalisiert (Schritt 5), dephosphoryliert und an die Zelloberfläche zurücktransportiert (Schritt 6) oder in Lysosomen degradiert (Schritt 7). (verändert nach Delom und Fessart, 2011)

1.2 Chemokinrezeptoren

Die Chemokinrezeptoren gehören zu den Klasse A GPCRs. Ihr extrazellulärer N-Terminus und ihr intrazellulärer C-Terminus zeigen eine hohe Diversität. Die N-Termini sind ohne gebundenen Liganden relativ flexibel und enthalten putative Glykosylierungsstellen. Außerdem enthalten sie basische Reste, mit denen sie mit den ebenfalls basischen Chemokinen interagieren und so die Ligandenbindung initiieren. Die C-Termini der Chemokinrezeptoren enthalten Sequenzmotive für die Bindung von G-Proteinen, die Rezeptorinternalisierung und das intrazelluläre Trafficking (Smit et al., 2011).

Daneben gibt es bestimmte strukturelle Eigenschaften, die allen Chemokinrezeptoren gemein sind. Zu den wichtigsten dieser Strukturen zählen zwei Disulfidbrücken. Eine zwischen der N-terminalen Domäne und der dritten extrazellulären Schleife und eine zwischen der dritten Transmembrandomäne und der zweiten extrazellulären Schleife (Abb. 1.3). Letztere tritt auch in vielen anderen Klasse A GPCRs auf. Des Weiteren existiert ein hoch konserviertes (D/E)R(Y/W)-Motiv am Übergang von der dritten Transmembrandomäne zur zweiten intrazellulären Schleife. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung der G-Proteine. Eine weitere hoch konservierte Aminosäuresequenz befindet sich am cytosolischen Ende der siebten Transmembrandomäne. Dieses NPxxY-Motiv markiert bei GPCRs den Übergang zum C-Terminus (Abb. 1.3). Einige Klasse A GPCRs weisen im Bereich des C-Terminus, der kurz auf die siebte Transmembrandomäne folgt, noch eine achte amphipathische Helix auf. Außerdem treten im C-Terminus häufig Palmytylierungsstellen auf. Eine Palmytylierung führt zur Verankerung des C-Terminus in der Plasmamembran und bewirkt eine höhere Stabilität dieser Domäne (Smit et al., 2011).

Die Aktivierung der Chemokinrezeptoren erfolgt durch einen zweistufigen Mechanismus. Zunächst wird das Chemokin unter Mitwirkung der extrazellulären Schleifen an den N-Terminus gebunden. Durch die Bindung gelangt der flexible, chemokinspezifische N-

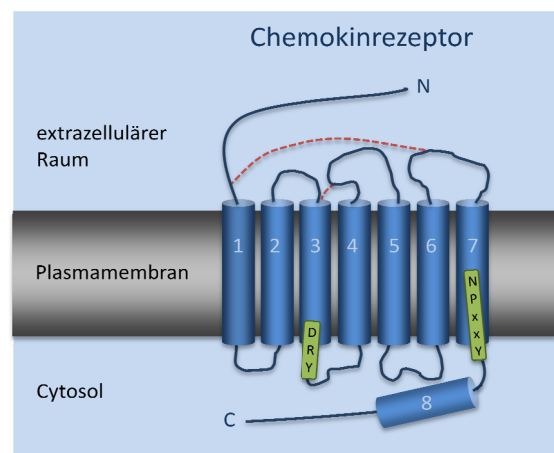


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung eines Chemokinrezeptors und seiner spezifischen strukturellen Eigenschaften. Neben dem GPCR-typischen heptahelikalen Rezeptoraufbau haben die Chemokinrezeptoren zwei Disulfidbrücken zwischen konservierten Cysteinresten der extrazellulären Domänen (rote Linien). Die zweite cytosolische Schleife beginnt mit einem konservierten DRY-Motiv und vor Beginn des C-Terminus liegt ein konserviertes NPxxY-Motiv. Häufig enthält der C-Terminus eine achte Helix.

Terminus des Liganden an eine zweite Bindungsstelle innerhalb des Bündels aus Transmembrandomänen. Zusammen führen diese beiden Interaktionen zu den Konformationsänderungen, welche die Signaltransduktion auslösen. Die Bindung des G-Proteins wird vermutlich durch das DRY-Motiv, die cytosolnahen Bereiche der Transmembransegmente 5 und 6 und der kurzen Schleife zwischen Helix 7 und 8 vermittelt (Smit et al., 2011).

1.3 Das Chemokin SDF-1

Chemokine sind eine Gruppe von etwa 50 kleinen und hoch basischen Cytokinen mit chemotaktischer Wirkung (Clare und Gronenborn 1995; Murphy et al., 2000). Ihre Tertiärstruktur wird vor allem von einem hoch konservierten Muster von Cysteinresten geprägt, aus denen 1-3 Disulfidbrücken resultieren. Anhand ihres Cystein-enthaltenden Motivs werden die Chemokine in die systematischen Untergruppen CXC, CC, CX₃C und C unterteilt. Die beiden größten Untergruppen sind die α -Chemokine, die eine Aminosäure

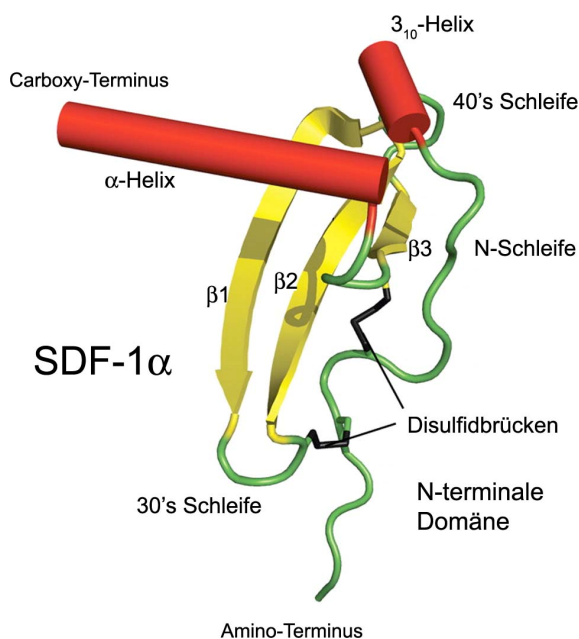


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der monomeren Struktur von SDF-1 α . α -helikale Regionen sind als rote Zylinder, antiparallele β -Faltblatt Strukturen als gelbe Bänder und das Rückgrat aus Schleifen und unstrukturierten Helices als grüne Linie dargestellt. Die Chemokin-eigenen Strukturelemente sind in der Abbildung benannt. Die beiden konservierten Disulfidbrücken sind schwarz dargestellt (verändert nach Murphy et al., 2007).

zwischen ihren ersten N-terminalen Cysteinsten haben (CXC-Chemokine), und die β -Chemokine, deren zwei Cysteinreste nicht durch eine weitere Aminosäure getrennt sind (CC-Chemokine). Daneben werden sie auch funktionell in inflammatorische (oder induzierbare) und homöostatische (oder konstitutive) Chemokine klassifiziert (Moser et al. 2004). Chemokine sind die hauptsächlichen Regulatoren der Migration und Adhäsion von Zellen (Zlotnik und Yoshie, 2000). Außerdem modulieren einige Chemokine das Überleben und Wachstum von Zellen (Horuk et al., 2001).

SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) ist ein α -Chemokin (Abb. 1.4), das auch den systematischen Namen CXCL12 trägt. Es liegt in Lösung sowohl als Monomer, als

auch als Dimer vor (Crump et al., 1997; Holmes et al., 2001). Von ihm sind drei alternative Splicevarianten bekannt, die als SDF-1 α , SDF-1 β und SDF-1 γ bezeichnet werden (Tashiro et al., 1993; Nagasawa et al., 1994; Shirozu et al., 1995). Sie unterscheiden sich in der Länge ihres C-Terminus, wobei SDF-1 α die kürzeste Splicevariante darstellt (Gleichmann et al., 2000). Die unterschiedliche Länge hat Einfluss auf die Bindung an die Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix und wirkt sich so auf die extrazelluläre Verfügbarkeit von SDF-1 aus (De La Luz Sierra et al., 2004). Der für die Rezeptorbindung und -aktivierung verantwortliche N-Terminus ist bei allen drei Peptiden gleich. In der Fachliteratur befassen sich die meisten Studien mit SDF-1 α und auch in der vorliegenden Arbeit wurde nur diese Splicevariante verwendet, auf die sich der Einfachheit halber nur als SDF-1 bezogen wird.

Die Funktionen von SDF-1 erstrecken sich über mehrere physiologische und pathologische Bereiche. Diese umfassen unter anderem die Rekrutierung von Immunzellen zu Infektionsherden (Kucia et al., 2004; White et al., 2005), die embryonale Entwicklung (Nagasawa et al., 1998), die Mobilisierung und gerichtete Migration von Stammzellen (Kucia et al., 2005) und neurologische Funktionen (Bajetto et al., 2001). Außerdem hat es Einfluss auf die Infektion mit HIV-1 (Zhou et al., 2001) und spielt eine Rolle bei der Entstehung von Tumormetastasen (Muller et al., 2001; Epstein et al., 2004; Luker und Luker 2006). SDF-1 vermittelt seine Wirkungen über die beiden heptahelikalen Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 (Neote et al. 1993; Murphy et al., 2000; Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006).

1.4 SDF-1 und sein Chemokinrezeptor CXCR4

CXCR4 ist ein typischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR). Seine Struktur ähnelt sehr stark denen anderer GPCRs wie Rhodopsin und dem β -Adrenergen Rezeptor (Wu et al., 2010). Allerdings gibt es auch Unterschiede. Neben der Chemokinrezeptor-typischen zweiten Disulfidbrücke zwischen N-Terminus und dritter extrazellulärer Schleife weicht vor allem die Position der äußeren Hälften der Transmembranhelices etwas ab. Diese Abweichungen erzeugen die für SDF-1 optimierte Bindungstasche des Rezeptors. Die innere Hälfte des CXCR4-Rezeptors ist stärker konserviert. Dennoch gibt es zwei Besonderheiten in der C-terminalen Domäne. Zum einen hat CXCR4 keine achte α -Helix und zum anderen fehlen dem Rezeptor Palmitoylierungsstellen, die eine Stabilisierung der C-terminalen Domäne ermöglichen würden (Wu et al., 2010).

Die Aktivierung des CXCR4-Rezeptors durch SDF-1 löst eine Internalisierung und Desensibilisierung des Rezeptorproteins aus. Diese Vorgänge werden durch Phosphorylierung des Rezeptors reguliert (Haribabu et al., 1997). Die Rezeptoraktivierung kann durch den

CXCR4-spezifischen Antagonisten AMD3100 blockiert werden (Schols et al., 1997). Die Endocytose von aktiviertem CXCR4 erfolgt über Clathrin-umhüllte Vesikel (Kozak et al., 2002; Sundararajan et al., 2003). Unter bestimmten pathologischen Bedingungen tritt CXCR4 aber auch in den Lipid-haltigen Mikrodomänen der Plasmamembran auf, die über Caveolae internalisiert werden (Trianiafilou et al., 2002).

Der aktivierte CXCR4-Rezeptor schaltet je nach Zelltyp unterschiedliche Signalkaskaden an (Lazarini et al., 2003). Sein Signal wird wie bei den meisten Chemokinrezeptoren hauptsächlich über G-Proteine der G_i -Familie vermittelt (Möpps et al., 1997). Die Signalkaskaden können über PI-3 und ERK1/2 verlaufen (Bacon & Harrison, 2000; Lazarini et al., 2000; Bajetto et al., 2001; Bonavia et al., 2003) oder über die PLC eine Erhöhung des Calciumspiegels auslösen, die ebenfalls zur ERK1/2-Aktivierung führen kann (Bajetto et al., 1999; Klein et al., 1999; Zheng et al., 1999). Außerdem wurde berichtet, dass CXCR4-Signaling eine G_i -Protein typische Inhibition von cAMP veranlasst (Liu et al. 2003). Die Modulation des cAMP-Spiegels spielt eine wichtige Rolle bei SDF-1-abhängigen Migrationsprozessen (Lysko et al., 2011; Wang et al., 2011).

CXCR4 war der erste Rezeptor, für den die Bindung und Aktivierung durch SDF-1 gezeigt wurde und bis 2005 ging man davon aus, dass er der einzige Chemokinrezeptor ist, über den SDF-1 seine Funktionen vermittelt (Nagasawa et al., 1996; Ma et al., 1999; Bagri et al., 2002; Lazarini et al., 2003). Diese Annahme basierte auf Daten zu den murinen Knock-down (KD) Linien von CXCR4 und SDF-1, deren Tiere denselben Phänotyp aufweisen. Die Deletion der Gene aus dem Genom ist in beiden Fällen embryonal letal und führt zu zahlreichen schwerwiegenden Defekten im Gefäßsystem, dem Herzen, dem Immunsystem und dem zentralen Nervensystem (Nagasawa et al., 1996; Zou et al., 1998; Stumm et al., 2003).

Die Annahme, dass SDF-1 das einzige CXCR4-bindende Chemokin und CXCR4 der einzige Chemokinrezeptor für SDF-1 ist, ließ eine einzigartige biologische Bedeutung des CXCR4-SDF-1-Systems vermuten, da diese singuläre Beziehung für Chemokine untypisch ist und außerdem beide Proteine lebensnotwendig sind. Die Bedeutung wurde durch die Erkenntnisse bestätigt, dass die SDF-1-Sekretion von Stromazellen des Knochenmarks während der Embryogenese für die Kolonisation von CXCR4-positiven hematopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen kritisch ist (David et al., 2002; Lapidot und Petit, 2002; Kortesisidis et al., 2005). Auch im adulten Organismus ist das CXCR4-SDF-1-System neben zahlreichen anderen Vorgängen für dieses Zellsystem von entscheidender Bedeutung. So hat SDF-1 eine vorrangige Funktion bei der Retention und Zurückführung der CXCR4-positiven Vorläuferzellen ins Knochenmark (Aiuti et al., 1997; Kim und Broxmeyer, 1998; Lapidot und

Petit, 2002; Guo et al., 2005) bzw. bei ihrer Freisetzung ins periphere Blut (Devine et al., 2004; Papayannopoulou, 2004; Lapidot et al., 2005; Pelus und Fukuda, 2008). Im Fall von hematopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen ist SDF-1 damit das wichtigste und entscheidende chemotaktische Cytokin (Kucia et al., 2005; Nagasawa et al., 1996; Aiuti et al., 1997).

1.5 Der atypische Chemokinrezeptor CXCR7

Die Annahme, dass SDF-1 das einzige CXCR4-bindende Chemokin und CXCR4 der einzige Chemokinrezeptor für SDF-1 ist, wurde 2005 von Balabanian et al. widerlegt. Dort wurde gezeigt, dass CXCR4-negative T-Lymphocyten mit hoher Affinität SDF-1 binden und SDF-1-abhängig migrieren. Diese Effekte konnten auf den Rezeptor RDC1 zurückgeführt werden, der erstmalig 1990 beschrieben wurde. Damals wurde er von Libert et al. aus der cDNA-Bibliothek einer Hundeschilddrüse kloniert und als Receptor Dog cDNA 1 bezeichnet. Unter diesem und anderen Namen war CXCR7 dann bekannt, bis er 2005 „deorphanisiert“ und der Klasse der CXC-Chemokinrezeptoren zugeordnet wurde (Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006). Burns und Kollegen entdeckten zusätzlich, dass CXCR7 außerdem das Chemokin ITAC (Interferon-inducible T-cell α -Chemoattractant oder auch CXCL11) bindet.

Obwohl CXCR7 ein Chemokinrezeptor ist und eine klassische GPCR-Struktur aufweist, konnte bisher eine wesentliche Eigenschaft dieser Rezeptoren, die Signaltransduktion über G-Proteine, nicht beobachtet werden. Dieser Sachverhalt wird allerdings noch kontrovers diskutiert. Für einige Zelltypen konnte zwar eine Kopplung an G-Proteine und ihre Aktivierung durch CXCR7 gezeigt werden, indem die Phosphorylierung der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) p42/44 (Hartmann et al., 2008) und der Serin/Threoninkinase Akt (Wang et al., 2008) nachgewiesen wurde. In anderen Zellsystemen konnten hingegen kein CXCR7-abhängigen Signaling beobachtet werden (Levoye et al., 2009).

Eine Ursache für das fehlende G-Protein Signaling könnte eine veränderte G-Protein Bindung auf Grund der Struktur des CXCR7 sein, da hier das typische DRYLAIV-Motiv in der zweiten cytosolischen Schleife zu DRYLIST verändert vorliegt. Das DRYLAIV-Motiv, welches für die Kopplung an $G\alpha_i$ -Proteine und die Induktion einer Calcium-Antwort notwendig ist (Sierro et al., 2007; Burns et al., 2006), ist bei CXCR7 leicht modifiziert (DRYLSIT; Thelen und Thelen, 2008). Diese Veränderung könnte eine Interaktion mit $G\alpha_i$ -Proteinen verhindern. Auch die Frage nach einer Sensitivität gegenüber dem $G\alpha_i$ -Inhibitor

Pertussistoxin muss noch geklärt werden (Hartmann et al., 2008). Es gibt Beobachtungen, dass CXCR7 möglicherweise erst durch Dimerisierung mit anderen Chemokinrezeptoren seine Funktionalität erlangen könnte (Percherancier et al., 2005). So wird z.B. bei Coexpression mit CXCR7 das Signaling von CXCR4 so beeinflusst, dass durch SDF-1 eine stärkere Calcium-Antwort und eine stabilere Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 hervorgerufen werden (Sierro et al., 2007; Levoye et al., 2009).

Im Jahre 2009 wurde erstmals beschrieben, dass CXCR7 nach Ligandenbindung verstärkt β -Arrestin rekrutiert (Kalatskaya et al., 2009), dass die Bindung an β -Arrestin 2 in Abhängigkeit von Zeit und Chemokinkonzentration ansteigt und dass dadurch eine Rezeptoraktivierung stattfindet (Luker et al., 2009). Es ist schon länger bekannt, dass β -Arrestine nicht nur die Internalisierung und Desensitisierung von GPCRs vermitteln, sondern dass sie auch unabhängig von G-Proteinen intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren können (Wei et al., 2003; Lefkowitz und Shenoy, 2005). Von Rajagopal et al. wurde 2009 die Aktivierung von MAP-Kinasen durch CXCR7 und β -Arrestin 2 nachgewiesen. Diese Erkenntnis verlieh CXCR7 eine neue Bedeutung, da er jetzt als eigenständig signalgebender Rezeptor identifiziert war, auch wenn er keine G-Proteine aktiviert.

Eine weitere Eigenschaft, die CXCR7 zu einem atypischen Chemokinrezeptor macht, ist die Tatsache, dass er als hochaffiner SDF-1-Fänger agiert und große Mengen dieses Chemokins aus dem umliegenden Gewebe entfernt (Boldajipour et al., 2008; Naumann et al., 2010; Sanchez-Alcaniz et al., 2011). Er wird deshalb auch als Scavenging-Rezeptor bezeichnet. Der Effekt wird, neben der Fähigkeit SDF-1 hochaffin zu binden, dadurch unterstützt, dass CXCR7 einer starken konstitutiven Internalisierung unterliegt. Der Rezeptor internalisiert nicht nur unter Ligandeneinfluss wie CXCR4 und andere typische Chemokinrezeptoren (Kucia et al., 2005), sondern durchläuft auch eine Liganden-unabhängige Internalisierung. Diese führt dazu, dass CXCR7 vor allem intrazellulär in frühen Endosomen vorliegt (Hartmann et al., 2008). Die Internalisierung verläuft vor allem über Clathrin-vermittelte Endocytose (Luker et al., 2010). Ob CXCR7 auch über Caveolae internalisiert wird, wurde bisher noch nicht untersucht. Die aus der starken Internalisierung resultierende geringe Verfügbarkeit von CXCR7-Rezeptoren an der Zelloberfläche kann auch ein Grund für fehlende bzw. zelltypspezifische G-Proteinkopplung sein. Ohne die Möglichkeit zur G-Proteinkopplung werden bestimmte Signaltransduktionswege nicht aktiviert, die für die Vermittlung physiologischer Prozesse wie z.B. Migration notwendig sein können.

1.6 Die physiologische Bedeutung des CXCR4-CXCR7-SDF-1-Systems

Ähnlich wie CXCR4 und SDF-1 hat CXCR7 auch in vivo eine hohe Relevanz und ist unter Säugetieren hoch konserviert (Heesen et al., 1998; Shimizu et al., 2000). Ist CXCR7 aus dem Genom deletiert, erleiden Mäuse perinatal den Tod. Dieser wird vor allem durch Defekte in der Entwicklung des Herzens verursacht. Beeinträchtigungen bei der Blutbildung, wie sie bei CXCR4- bzw. SDF-1-defizienten Mäusen auftreten, wurden dagegen nicht berichtet (Sierro et al., 2007; Gerrits et al., 2008).

Im gesunden Organismus wird CXCR7 sowohl in embryonalen, als auch in juvenilen und adulten Zellen exprimiert. Die höchste Expression tritt allerdings während der Entwicklung auf und CXCR7 wird kaum in normalen somatischen Zellen exprimiert (Thelen und Thelen, 2008). CXCR7-Protein konnte vor allem auf der Oberfläche von fetalen Leberzellen, Plazenten und aktiviertem Endothelium gefunden werden (Burns et al., 2006; Schutyser et al., 2007). Eine weitere Verbreitung konnte nur auf mRNA-Ebene detektiert werden. CXCR7-mRNA wurde in Herz, Gehirn, Milz, Niere, Lunge, Harnblase, Skelettmuskeln, Langerhansschen Inseln, Knorpeln, Gelenkwasser, Hoden und Ovarien gefunden (Autelitano 1998, Martinez et al. 2000, Jones et al., 2006, Gerrits et al. 2008). Im hematopoetischen System wird CXCR7 auf Neutrophilen, Monocyten und B-Zellen exprimiert (Balabanian et al., 2005, Sierro et al., 2007, Infantino et al., 2006) und im Gehirn ist CXCR7 vor allem im Vorderhirn exprimiert, wo es von neuronalen, astroglialen und vaskulären Zellen gebildet wird (Schönemeier et al., 2008).

In dieser Region wurde auch eine besondere Relevanz des CXCR4-CXCR7-SDF-1-Systems im Säugetier demonstriert (Sánchez-Alcaniz et al., 2011; Wang et al., 2011). Während der Cortexentwicklung regulieren CXCR4, CXCR7 und SDF-1 gemeinsam die Interneuronen-Migration. Dabei kommen besonders die Scavenger-Eigenschaften von CXCR7 zur Geltung. Der gemeinsam mit CXCR4 in den Interneuronen exprimierte CXCR7-Rezeptor entfernt das SDF-1 aus der Umgebung der Interneuronen und baut es ab. Dadurch wird nie eine bestimmte Konzentration von SDF-1 überschritten und es kommt nicht zu einem übermäßigen ligand-induziertem Abbau von CXCR4. Auf diese Weise bleibt das CXCR4-Protein in den Interneuronen enthalten und die CXCR4-vermittelte, SDF-1-abhängige Migration dieser Zellen wird aufrecht erhalten. Dieser Prozess ist entscheidend für eine korrekte Cortexentwicklung und wird durch einen Knock-down jedes einzelnen der drei Proteine deutlich gestört (Sánchez-Alcaniz et al., 2011).

1.7 Pathologische Relevanz von CXCR7

CXCR7 hat nicht nur eine hohe physiologische Relevanz, sondern ist außerdem in verschiedene pathologische Prozesse involviert. Er spielt eine wichtige Rolle bei dem Wachstum und der Metastasierung verschiedener Tumore und bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen.

Die Bedeutung von CXCR7 für die Krebsforschung zeigt sich bereits durch die Tatsache, dass der CXCR7-Spiegel in vielen Tumoren deutlich erhöht ist (Hattermann et al., 2010; Sun et al., 2010). Darüber hinaus wurde in einigen Studien gezeigt, dass die Hochregulation des CXCR7-Rezeptors in Tumorzellen direkt mit Tumorwachstum, Progression, Neovaskularisierung, Invasion und Metastasierung korreliert (Darash-Yahana et al., 2004; Miao et al., 2007; Liu et al., 2011). Die Studie von Hattermann et al. verdeutlicht außerdem, wie auch pathologische CXCR7-Prozesse mit CXCR4 und SDF-1 korrelieren können. In der Studie wird beschrieben, wie CXCR4-positive Tumorstammzellen zu SDF-1-exprimierenden Gliomen rekrutiert werden. CXCR7 wird in differenzierten Tumorzellen exprimiert und ist dabei in gewisser Weise für die Zurückhaltung von SDF-1 im Gliom verantwortlich. Darüber hinaus hat CXCR7 einen antiapoptotischen Effekt auf die Gliomzellen. In letzter Zeit werden vermehrt CXCR7-blockierende Substanzen und ihr Einfluss auf CXCR7-exprimierende Tumorzellen untersucht. Dabei erweisen sich sowohl synthetische CXCR7-Liganden, als auch blockierende anti-CXCR7 Antikörper als potentielle Therapeutika (Hartmann et al., 2008; Zabel et al., 2011).

Auch bei Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis hat CXCR7 eine wichtige Funktion. Bei Multipler Sklerose tritt CXCR7 vermehrt in Läsionen der Blut-Hirn-Schranke auf. Dort reduziert es SDF-1 von der abluminalen Oberfläche und reduziert auf diese Weise den Eintritt von Leukocyten. Auch in diesem Zusammenhang könnten sich CXCR7-Antagonisten als wertvolle Therapeutika erweisen (Cruz-Orengo et al., 2011). Bei Rheumatoider Arthritis wird CXCR7 auf den Endothelzellen der Synovialis exprimiert. Durch SDF-1 kann diese CXCR7-Expression noch weiter gesteigert werden und es findet eine verstärkte Angiogenese im entzündeten Gewebe statt. Diese Angiogenese kann durch Blockierung sowohl von CXCR7 als auch von CXCR4 reduziert werden. Eine Behandlung mit dem CXCR7-Liganden CCX733 führt außerdem zu signifikant reduzierten klinischen Arthritiszahlen. Somit ist CXCR7 auch bei Rheumatoider Arthritis ein geeignetes Ziel für potenzielle Therapeutika (Watanabe et al., 2010).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die beiden SDF-1 bindenden Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR7 sind sich strukturell sehr ähnlich und regulieren gemeinsam viele physiologische und pathologische Prozesse. Auf subzellulärer Ebene haben sie allerdings sehr unterschiedliche Funktionsweisen. Da die genaue Funktionsweise des erst vor kurzem deorphanisierten CXCR7-Rezeptors noch nicht bekannt ist, sollte sie in dieser Arbeit genauer untersucht werden. Dabei sollten die Unterschiede in der Funktionalität von CXCR7 und CXCR4 dazu genutzt werden, um mit Hilfe von Rezeptorchimären die Rezeptoreigenschaften bestimmten Rezeptorstrukturen zuzuordnen. Außerdem sollte durch Austausch spezieller Aminosäuren der Einfluss von Proteinkinase-vermittelten Phosphorylierungen auf den CXCR7-Rezeptor untersucht werden. Im Einzelnen wurden folgende Fragen bearbeitet:

- 1) Welche Faktoren beeinflussen die Internalisierung von CXCR7?
 - Auf welchem Weg findet CXCR7-Endocytose statt?
 - Lässt sich die Fähigkeit einer Liganden-unabhängigen Internalisierung über den Austausch der C-terminalen Domäne übertragen?
 - Kann die Liganden-unabhängige Internalisierung durch gezielte Mutationen aufgehoben werden?
 - Wird CXCR7 nach der Internalisierung abgebaut?

- 2) Kann für CXCR7 eine G-Protein-Kopplung nachgewiesen werden?

- 3) Wie beeinflusst SDF-1 die Aktivität des CXCR7-Rezeptors?
 - Hat SDF-1 Einfluss auf die Rezeptorinternalisierung?
 - Bewirkt SDF-1 eine Rezeptorphosphorylierung?

- 4) Wie erfolgt die SDF-1 Aufnahme und Degradation?

2 Material & Methoden

2.1 Plasmidkonstrukte

2.1.1 Rezeptoren

Zur Erstellung der grundlegenden rezeptorcodierenden Plasmidkonstrukte wurde durch Reverse Transkription CXCR4- und CXCR7-codierende cDNA aus murinem Milzgewebe gewonnen. Die cDNAs wurde durch die Schnittstellen NheI/NotI (CXCR4) und NheI/ApaI (CXCR7) erweitert und an das N-terminale Ende der Rezeptorsequenz wurde die Sequenz für ein Hemagglutinin (HA) Epitoptag (MYPYDVPDYA) angehängt. Die HA-tag- und rezeptorcodierenden Sequenzen wurden dann jeweils in den pcDNATM3.1(+) Vektor (#V790-20, Life Technologies) kloniert. Die daraus resultierenden Konstrukte werden im Folgenden als CXCR4-WT und CXCR7-WT betitelt.

Auf der Basis dieser Wildtyp-Konstrukte wurden weitere Konstrukte erzeugt, die Mutationen in der Sequenz der C-terminalen Rezeptordomäne aufweisen. Die veränderten Nukleotidsequenzen wurden durch Gensynthese erzeugt (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland). Die Insertion der Syntheseprodukte in CXCR4-WT erfolgte über die endogene SphI-Schnittstelle bei Basenpaar 967 und die NotI-Erweiterung. Für die Insertion in CXCR7-WT wurde eine stille Mutation an Basenpaar 865 eingeführt, die eine XhoI-Schnittstelle erzeugt. Über diese XhoI-Schnittstelle und die ApaI-Erweiterung wurden dann die Syntheseprodukte in das CXCR7-WT Konstrukt kloniert. Die resultierenden Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 1A dargestellt.

Für die Einführung einer Mutation zum Austausch der zweiten cytosolischen Domäne des CXCR7 gegen die entsprechende CXCR4-Domäne, wurde die gesamte Sequenz stromaufwärts der XhoI-Schnittstelle synthetisiert und über NheI und XhoI in CXCR7-WT und CXCR7-4tail kloniert. Die resultierende Aminosäuresequenz ist in Tabelle 1B dargestellt. Eine weitere Mutante des CXCR7, in der der gesamte C-Terminus des Rezeptors deletiert ist, wurde von ChemoCentryx zur Verfügung gestellt (Zabel et al., 2009).

2.1.2 G-Proteine

Für die $[Ca^{2+}]_i$ Messungen wurden neben den rezeptorcodierenden auch G-Protein-codierende Konstrukte benötigt. Murines $G\alpha_{15}$ aus der $G_{q/11}$ G-Protein-Familie wurde mit Rezeptoren cotransfiziert. Aufgrund der Kopplung von CXCR4 an G-Proteine der G_i/o -Familie (Moepps *et al.*, 1997; Kleemann *et al.*, 2008) wurden G-Protein-Chimären eingesetzt, die G_i/o -koppelnde Rezeptoren an Calcium-Mobilisierung koppeln können. Die q_i5 -Chimäre

besteht aus murinem $G\alpha_q$, dessen 5 C-terminale Aminosäuren gegen die des $G\alpha_{i2}$ ausgetauscht wurden (Conklin *et al.*, 1993). Die 16z44-Chimäre besteht dagegen aus humanem $G\alpha_{i6}$ und Ratten- $G\alpha_z$ (Mody *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003).

2.2 Zellkultur und Transfektion

Für Zellkulturexperimente wurden vor allem HEK293 (human embryonic kidney)-Zellen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland, #305) verwendet. Sie wurden in DMEM (PAA, Pasching, Österreich, #E15-009) mit 10% Fetalem Kälberserum (PAA, #A15-151), 2mM L-Glutamin (PAA, #M11-006) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (PAA, #P11-010) kultiviert. Bei den Calcium-Messungen wurden außerdem CHO-K1 (chinese hamster ovary)-Zellen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland, #110) eingesetzt. Sie wurden in HAM's-F12 (PAA, #E15-016) Medium mit den gleichen Zusätzen wie die HEK293-Zellen kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator mit 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden mit jetPEI (Polyplus-Transfection SA, Illkirch, Frankreich, #101-40) nach Herstellerangaben transient transfiziert.

2.3 Immuncytochemie

Auf Poly-L-Lysin (50 µg PLL/ml PBS bei 37°C über Nacht; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, #P1274) beschichteten Deckgläsern in 24well-Platten wurden 150.000 HEK293 Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurden sie mit Rezeptor-kodierenden Plasmiden transfiziert und erneut 24 Stunden kultiviert. Für den Versuch wurden sie mit in eiskaltem Ultra-MEM verdünntem Kaninchen anti-HA Antikörperserum (1:1000) bei 4°C für 1 Stunde markiert (Pulse). Anschließend wurden sie entweder mit kaltem PBS (PAA, #H15-001) gewaschen und direkt mit Zamboni fixiert oder mit Ultra-MEM (Lonza Walkersville Inc., Walkersville, USA, #12-743F) gewaschen und in Ultra-MEM mit oder ohne Ligand erneut für die angegebene Zeit kultiviert (Chase) und erst danach fixiert, um die Rezeptorinternalisierung zu ermöglichen.

Nach der Fixierung wurden die Zellen mit TPBS gewaschen, mit kaltem Methanol (50% Methanol und 100% Methanol für je 3 Minuten) permeabilisiert, erneut gewaschen und mit 3% NGS in TPBS blockiert. Die Detektion erfolgte mit Cy3 konjugiertem Ziege anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland, #111-165-003), der 1:400 mit TPBS 1% NGS verdünnt wurde. Die Markierung wurde mit dem LSM 510 Meta konfokalem Laser-Scanning Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) dokumentiert.

2.4 ELISA

Die Kulturen wurden wie für die Immuncytochemie beschrieben ausgesät und transfiziert, nur dass hier keine Deckgläser verwendet wurden. Die Oberflächenrezeptoren wurden für diese Experimente mit 0,25 µg/ml affinitätsgereinigtem Kaninchen anti-HA Antikörper in Ultra-MEM für 90 Min bei 4°C pulsmarkiert. Ebenfalls wie in der Immuncytochemie wurden sie dann entweder direkt oder nach einem definierten Zeitintervall bei Internalisierung ermöglichenden Bedingungen (37°C) fixiert.

Für die Detektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 30 Min mit 3% BSA (PAA, # K45-001) in PBS blockiert und dann mit Peroxidase-konjugiertem Esel anti-Kaninchen IgG Antikörper (1:2000; GE Healthcare, #NA9340V) in 1% BSA in PBS für 90 Min bei Raumtemperatur beladen. Anschließend wurden sie erneut gewaschen und dann wurde die Peroxidase mit 1-step™ ultra TMB-ELISA Reagenz (#34028, Thermo Scientific) detektiert. Das Reagenz wurde nach 5-10 Minuten auf eine 96well-Platte überführt und mit dem gleichen Volumen 2M Schwefelsäure versetzt. Zum Schluss wurde die Extinktion bei 450 nm mit dem FlexStation3 Microplate Reader (Molecular Devices) gemessen.

Zur Auswertung wurden die Werte von gleich behandelten, Mock-transfizierten Kulturen zur Nivellierung des Hintergrundsignals abgezogen und dann in Prozent von nicht internalisierten, direkt fixierten Kulturen angegeben.

2.5 Radioliganden-Versuche

Für alle Radioliganden-Versuche wurden die HEK293-Zellen wie für die ELISA-Experimente vorbereitet. Das ¹²⁵I-SDF-1 (2200 Ci/mmol; Hartmann Analytik, Braunschweig, Deutschland, #I-RB-SDF1a) wurde in Ultra-MEM mit 1% BSA zu einer finalen Konzentration von 25 pmol/l verdünnt. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit jeweils 300 µl dieser Verdünnung pro Well. Für die Messung des radioaktiven [¹²⁵I] wurde der Cobra II gamma counter von Packard eingesetzt.

Bei den Experimenten zur homologen kompetitiven Radioligandenbindung wurden die Zellen für zwei Stunden bei 4°C mit Radioliganden-Lösung inkubiert, die mit verschiedenen Konzentrationen (0,01-640 nM) nicht markiertem SDF-1 (PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland, #250-20A) versehen war. Dann wurden sie zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 300 µl 10 mM Tris-Puffer (pH7,4) lysiert. Um zu ermitteln bei welcher Konzentration die Hälfte des ¹²⁵I-SDF-1 durch nicht markiertes SDF-1 verdrängt wurde (IC₅₀), wurden die Daten durch nonlineares Fitting mit der „homologous competitive binding curve“ Option der GraphPad Prism 4.0a Software analysiert.

Neben der Bindung wurde auch die Internalisierung von Radioliganden mit Pulse-Chase-Experimenten untersucht. Dazu wurden die Kulturen nach der zweistündigen Ligandenbindungsphase bei 4°C (diesmal ohne unmarkiertes SDF-1) zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie direkt in 10 mM Tris-Puffer lysiert oder für eine Internalisierungsphase von 0 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Internalisierungsphase wurde restliches Oberflächen-gebundenes ¹²⁵I-SDF-1 durch zweimaliges Waschen mit Citratpuffer pH4,5 (50 mM Natriumcitrat, 90 mM NaCl, pH4.5) (Kohout et al., 2004) entfernt und erst dann wurden diese Kulturen lysiert. Für die Auswertung wurden die Werte von gleich behandelten, Mock-transfizierten Kulturen abgezogen und die Werte der internalisierten, säurebehandelten Kulturen als Prozent der Werte der unbehandelten Kulturen angegeben.

Die Aufnahme und der Abbau von ¹²⁵I-SDF-1 durch die verschiedenen Rezeptormutanten wurden untersucht, indem die Kulturen bei 37°C mit der ¹²⁵I-SDF-1-Lösung für verschiedene Zeitintervalle inkubiert wurden. Zur Analyse der Menge an aufgenommenem ¹²⁵I-SDF-1 wurden die Zellen nach der Inkubationsphase sauer gewaschen und dann lysiert und gemessen. Die Analyse des ¹²⁵I-SDF-1-Abbaus wurde durch Aufarbeitung der Kulturüberstände durchgeführt. Um degradiertes von intaktem ¹²⁵I-SDF-1 zu unterscheiden wurden die Überstände für 15 Min. auf Eis mit 12,5% Trichloressigsäure inkubiert um intaktes ¹²⁵I-SDF-1 zu fällen (Fra et al., 2003). Das Präzipitat wurde dann durch 15 minütige Zentrifugation bei 21.000xg und 4°C von dem gelösten degradierten ¹²⁵I-SDF-1 separiert. Die Strahlung der beiden Fraktionen wurde dann getrennt voneinander gemessen.

2.6 Western-Immunoblots (Rezeptoren)

Für Westernblot-Experimente zum Nachweis von Rezeptoren wurden 1 Mio. HEK293-Zellen in PLL-beschichteten 60 mm-Schalen kultiviert, transfiziert und 48 Stunden später wurden die Versuche durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit 10 µg/ml Cycloheximid (Sigma-Aldrich, #C4859) oder 20 nM SDF inkubiert oder direkt und unbehandelt in 1 ml RIPA-Puffer lysiert. Anschließend wurden die Lysate 30 Minuten bei 23.000xg zentrifugiert. Die Rezeptoren wurden zur Aufreinigung über ihre Glykosylierungen an WGA-Beads (Wheat Germ Lectin Agarose Beads; Sigma-Aldrich, #L1394) assoziiert, mit RIPA-Puffer gewaschen und bei Bedarf zur Dephosphorylierung 3 Stunden bei 37°C mit Lambda Protein Phosphatase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland, #P0753) behandelt. Danach wurden die WGA-Beads mit den assoziierten Rezeptoren nochmals gewaschen und dann eluiert, indem sie 20 Minuten mit SDS-Probenpuffer bei 40-60°C inkubiert wurden.

Die so gewonnenen Proben wurden in 10% SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, #T830.1) geblottet. Auf den Membranen wurden die Rezeptoren nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5% BSA in TBST-Puffer mit Kaninchen anti-HA (1:300) oder Kaninchen anti-CXCR4 (UMB-2; 1:100) Primärantikörpern in 1% BSA-TBST markiert. Anschließend wurden die Membranen gewaschen mit Peroxidase-konjugiertem Ziege anti-Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, #SC-2004) Sekundärantikörper beladen und nach weiteren TBST-Waschungen detektiert. Für die ECL-Detektion wurden die Membranen 30 Sekunden in einer Mischung aus Luminol und Cumarsäure und Wasserstoffperoxid inkubiert und das Signal anschließend mit dem Fusion-FX7 Chemiluminescence System (PEQLAB) aufgenommen und mit der dazugehörigen BIO-ID Software analysiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Membranen wurden diese anschließend für 30 Minuten bei 50°C mit Stripingpuffer inkubiert, um sie von den Antikörpern zu befreien. Dann wurden sie mit Maus anti-Transferrinrezeptor (TFR) Primärantikörper (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland, #13-6800) und Schaf anti-Maus IgG Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (GE-Healthcare, #NA931V) beladen und erneut detektiert.

2.7 Western-Immunoblots ERK1/2-Aktivierung

Zum Nachweis der aktivierten MAP-Kinase ERK1/2 wurden 120.000 CHO-K1 bzw. 150.000 HEK293 Zellen pro Well auf PLL-beschichteten 12Well-Platten kultiviert und transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 90 Minuten in serumfreiem DMEM kultiviert. Bei Antagonist-Vorbehandlung wurden die Kulturen dann für 5 Minuten mit 100 µM AMD3100 (Sigma-Aldrich, #A5602) bzw. für 17 Stunden mit 2 mg/ml Pertussistoxin (PTX; Sigma-Aldrich, #P2980) inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 20 nM SDF-1 für 5 Minuten. Die Kulturen wurden 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und in Probenpuffer lysiert. Die Auftrennung, das Blotting und die Detektion erfolgten wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Dabei wurde der Primärantikörper Kaninchen anti-phosphoERK1/2 (1:1000; CellSignaling Technology, Danvers, USA, #4370) und als Ladekontrolle Maus anti-β-Aktin (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, #sc-47778) eingesetzt.

2.8 $[Ca^{2+}]_i$ Messungen

Für Calcium-Messungen wurden 50.000 HEK293 oder 30.000 CHO-K1-Zellen mit jetPEI nach dem Batch-Protokoll mit Rezeptor- und G-Protein-Konstrukten transfiziert und auf PLL-beschichteten 96Well-Platten ausgesät. 24 Stunden später wurde das Kulturmedium durch Probenecid-Ringer-Lösung (130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7.3, 20 mM Glukose, 2.5 mM Probenecid) ersetzt und es wurde der Calcium Loading Dye des Calcium 4 Assay Kits (Molecular Devices, Sunnyvale, USA, #R8142) nach Herstellerangaben zugegeben. 1 Stunde nach Farbstoffzugabe und Inkubation bei 37°C wurde die Messung mit dem FlexStation3 Microplate Reader (Molecular Devices) begonnen. Zunächst wurde 30 Sekunden das Hintergrundsignal gemessen, bevor SDF-1 mit einer Endkonzentration von 80 nM zugegeben wurde, um einen Ligand-induzierten Anstieg von cytosolischem $[Ca^{2+}]_i$ hervorzurufen. Der CXCR4-Antagonist AMD3100 wurde bei Bedarf 15 Minuten vor Beginn der Messung mit einer Konzentration von 30 μM zugegeben. Die Viabilität der Zellen wurde kontrolliert, indem im Anschluss an die erste Messung durch Zugabe von 20 μM ATP eine verlässliche $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort ausgelöst wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Subzelluläre Verteilung und Endocytose von CXCR7 und CXCR4

Zur Untersuchung der Regulation und Funktion von CXCR7 und CXCR4 wurden die Rezeptoren mit einem N-terminalen Hämagglutinin (HA)-Epitoptag in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 (Human Embryonic Kidney Cells) exprimiert. Zuerst wurde mit Immuncytochemie die basale Expression der Wildtyp-Rezeptoren (CXCR7-WT, CXCR4-WT) untersucht. Dazu wurden die Zellen in serumfreies Medium überführt, mit SDF-1 oder Vehikel stimuliert, fixiert, permeabilisiert und die transfizierten Rezeptoren wurden mittels spezifischem anti-HA Primärantikörper und Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert. Dabei konnte CXCR7-Protein vor allem in intrazellulären Vesikeln detektiert werden (Abb. 3.1A). Im Gegensatz dazu befand sich der Großteil des CXCR4-Proteins an der Zelloberfläche (Abb. 3.1B) und trat erst nach einer SDF-1 Stimulation verstärkt intrazellulär auf (Abb. 3.1C). Mock-transfizierte Kontrollkulturen zeigten kein Signal.

Als Nächstes wurde der Endocytosemechanismus untersucht, über den der CXCR7-Rezeptor internalisiert wird. Von CXCR4 ist bereits bekannt, dass er vor allem über Clathrin-umhüllte Vesikel internalisiert wird (Sundararajan et al., 2003). Zur Untersuchung dieses Endocytosewegs wurde eine 0,4M Sucroselösung als Inhibitor eingesetzt. In manchen Zelltypen konnte zusätzlich eine geringe Internalisierung des CXCR4-Rezeptors über Caveolae beobachtet werden (Triantafilou et al., 2002). Als Inhibitor für diesen Endocytoseweg gilt Nystatin. Für die Betrachtung des CXCR7-Endocytosemechanismus wurde der Rezeptor in Anwesenheit von den verschiedenen spezifischen Endocytose-Inhibitoren unter Internalisierungs-verhindernden Bedingungen pulsmarkiert. Dies wurde durchgeführt, indem die Rezeptor-transfizierten Zellen in serumfreiem Medium mit Endocytose-Inhibitoren oder Vehikel inkubiert wurden, bevor sie in eine Internalisierungs-verhindernde Umgebung (4°C) überführt wurden. Unter diesen Bedingungen wurde das N-terminale HA-tag der membranständigen Rezeptoren mit anti-HA Antikörpern beladen. Anschließend wurde der Primärantikörper abgewaschen und die Zellen wurden erneut in Anwesenheit der verschiedenen Endocytose-Inhibitoren oder Vehikel im Brutschrank inkubiert, um nicht inhibierte Endocytosevorgänge zu ermöglichen. Danach wurden die Kulturen fixiert und zur Detektion sowohl von internalisiertem, als auch von an der Oberfläche verbliebenem, Antikörper-beladenem Rezeptorprotein permeabilisiert. Die Detektion erfolgte mittels fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Die Ergebnisse zeigen

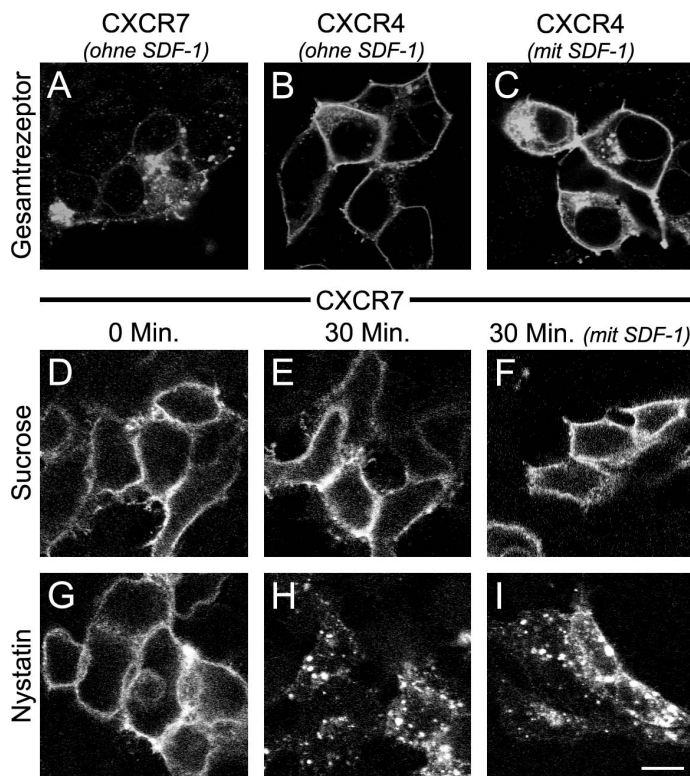


Abbildung 3.1: Subzelluläre Verteilung und Rezeptortrafficking von CXCR7 und CXCR4. A-C: Immunocytochemische Färbung des Gesamtrezeptorproteins von CXCR7 (A) und CXCR4 ohne SDF-1 Stimulation (B) bzw. nach 30 minütiger SDF-1 Inkubation (C) in transfizierten HEK293 Zellen. Die Detektion erfolgte mittels anti-HA Primärantikörper und Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper an permeabilisierten Kulturen und mit konfokaler Mikroskopie. **D-I:** Immunocytochemische Pulsmarkierung von CXCR7-WT in transfizierten HEK293 Zellen zur Visualisierung der Rezeptorendocytose unter Einfluss von spezifischen Endocytoseinhibitoren. Nach einer 30 minütigen Inhibitor-Vorinkubation erfolgte die Pulsmarkierung mit anti-HA Antikörper bei 0°C. Danach wurden die Zellen direkt fixiert (D, G) oder vorher für 30

Min. ohne (E, H) oder mit 20 nM SDF-1 (F, I) unter Inhibitor inkubiert. D-F: Inhibition der Endozytose über Clathrin-umhüllte Vesikel durch 0,4 M Sucrose. G-I: Inhibition der Endozytose über Caveolae durch 50 µg/ml Nystatin. Die Detektion erfolgte mittels Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper an permeabilisierten Kulturen und mit konfokaler Mikroskopie. *Balken:* 10 µm.

eine Internalisierung von CXCR7-Rezeptorprotein in unbehandelten Zellen und einen deutlichen Verbleib des pulsmarkierten Rezeptorproteins an der Zelloberfläche nach Sucrose-Behandlung (Abb. 3.1D-F). Dies deutet auf eine bevorzugte Endocytose über Clathrin-umhüllte Vesikel hin. Die Ergebnisse mit dem Caveolae-Inhibitor widersprechen dem nicht. Unter Nystatin-Behandlung fand eine deutliche Internalisierung von CXCR7-WT statt (Abb. 3.1G-I). Ob ein geringer Anteil des CXCR7-Proteins durch diese Behandlung an der Zelloberfläche zurückgehalten wurde, kann mit diesem Versuchsaufbau allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zusammen zeigen die Ergebnisse aber eine Endocytose von CXCR7-WT, die vor allem über Clathrin-umhüllte Vesikel stattfindet.

3.2 Regulation der Liganden-unabhängigen Rezeptorinternalisierung durch die C-terminale Domäne

Die einführenden Experimente zeigen bereits einen deutlichen Unterschied bei der spontanen, Liganden-unabhängigen Internalisierung von CXCR7 und CXCR4. Um diesen Unterschied näher zu untersuchen und den Einfluss bestimmter Domänen und Subdomänen auf die Regulation und Funktion des CXCR7-Rezeptors herauszuarbeiten, wurden durch Klonierung

verschiedene Rezeptorchimären erzeugt. Diese Rezeptorchimären wurden ebenfalls mit einem HA-tag am N-terminalen Rezeptorende versehen. Die veränderten Aminosäuresequenzen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

A

Systematische Bezeichnung	Bezeichnung im Text	C-terminale Aminosäuresequenz
CXCR7	CXCR7-WT	³¹¹ NPVLYSFIN ³²⁰ RNYRYELMKAFI ³³⁰ FKYSAKTGLT ³⁴⁰ TKLIDASRV ³⁵⁰ SETEYSALEQNTK ³⁶⁰ 362
CXCR7(320-362)/ CXCR4(313-359)	CXCR7-4tail	NPVLYSFIN <u>GAKFKSSAQHALNSMSRGSSLKILSKGKRGGHSSVSTESSESSFHSS</u>
CXCR7-Y/A (322, 324, 334, 354)	CXCR7-Y/A	NPVLYSFIN RN <u>AR</u> ELMKAFI <u>FK</u> SAKTGLT <u>KL</u> IDASRVSETE <u>EA</u> SALEQNTK
CXCR7(320-338)/ CXCR4(313-331)	CXCR7-4-7	NPVLYSFIN <u>GAKFKSSAQHALNSMSRGSLTKLIDASRVSETEYSALEQNTK</u>
CXCR7(Δ320-338)	CXCR7-Δ19	NPVLYSFIN -----GLTKLIDASRVSETEYSALEQNTK
CXCR7-ST/A (335, 338, 341, 347, 350, 352, 355, 361)	CXCR7-ST/A	NPVLYSFIN RNYRYELMKAFI <u>FKYAAKAGLAKLIDAARV</u> <u>AE</u> EALEQNAK
CXCR7-ST/A (335, 338, 341)	CXCR7-PhosLi	NPVLYSFIN RNYRYELMKAFI <u>FKYAAKAGLAKLIDASRVSETEYSALEQNTK</u>
CXCR7-ST/A (350, 352, 355)	CXCR7-PhosRe	NPVLYSFIN RNYRYELMKAFI <u>FKYSAKTGLTKLIDASRV</u> <u>AE</u> EALEQNTK
CXCR4	CXCR4-WT	³⁰⁵ NPILYAFL ³¹³ GAKFKSSAQHALNSMSRGSSL ³²³ LKILSKGKRGGHSSVSTESSESSFHSS ³³³ 359
CXCR4(324-359)/ CXCR7(320-362)	CXCR4-7tail	NPILYAFL <u>GAKFKSSAQHARNRYRYELMKAFI</u> <u>FKYSAKTGLTKLIDASRVSETEYSALEQNTK</u>
CXCR4(351-359)/ CXCR7(354-362)	CXCR4-7(C9)	NPILYAFL <u>GAKFKSSAQHALNSMSRGSSLKILSKGKRGGHSSVST</u> <u>EYSALEQNTK</u>
B		
Systematische Bezeichnung	Bezeichnung im Text	Aminosäuresequenz der zweiten intrazellulären Schleife
CXCR7	CXCR7-WT	¹³⁶ ACMSV ¹⁴¹ DRYLSITYFTGT ¹⁵¹ SSYKKMVR ¹⁶¹ R VVCIL 167
CXCR7(141-162)/ CXCR4(135-156)	CXCR7-2cD4	ACMSV <u>DRYLAI</u> VHATNSQRPRKLLAEK VVCIL 167
CXCR4	CXCR4-WT	¹³⁰ AFISL ¹³⁵ DRYLAI ¹⁴⁵ VHATNSQRPRKLLAEK ¹⁵⁵ AVYVG 161

Tabelle 3.1: Aminosäuresequenzen der wildtypischen und chimären CXCR7 und CXCR4 Rezeptoren. A: C-terminale Sequenzen der verschiedenen Rezeptormutanten beginnend mit dem konservierten NPxxY-Motiv am Ende der siebten Transmembrandomäne. **B:** Sequenzen der zweiten cytosolischen Schleife der Wildtyprezeptoren und der Rezeptorchimären beginnend mit dem Ende der dritten Transmembrandomäne.

Der Vergleich der Liganden-unabhängigen Internalisierung der wildtypischen CXCR7 und CXCR4 Rezeptoren mit den mutierten Rezeptorchimären wurde mit Hilfe zweier immunocytochemischer Methoden, Immunfluoreszenz und ELISA, durchgeführt. Die Immunfluoreszenzmethode wurde zur Visualisierung der subzellulären Rezeptorverteilung

gebraucht, während mittels ELISA die entsprechende Abnahme der Oberflächenrezeptoren quantifiziert wurde. Für beide Ansätze wurde die bereits unter 3.1 beschriebene Pulsmarkierung mit anti-HA Antikörper angewendet. Die anschließende Inkubation der Kulturen erfolgte über Zeitintervalle von 0, 5, 15 und 30 Minuten. Für die Darstellung mit Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper wurden die Zellen nach der Fixierung permeabilisiert. Dieser Schritt wurde beim ELISA unterlassen, um allein die an der Zelloberfläche verbliebenen Rezeptoren messen zu können. Die Messung erfolgte mittels eines Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper und einem entsprechenden Peroxidase-Substrat. Die Signalintensitäten nach den angegebenen Zeitintervallen wurden in Prozent des Signals direkt nach der Pulsmarkierung (0 Min) angegeben.

Bei jedem der Konstrukte konnte direkt nach der Pulsmarkierung der Oberflächenrezeptoren eine deutliche Färbung der Zelloberfläche nachgewiesen werden, wodurch eine intakte

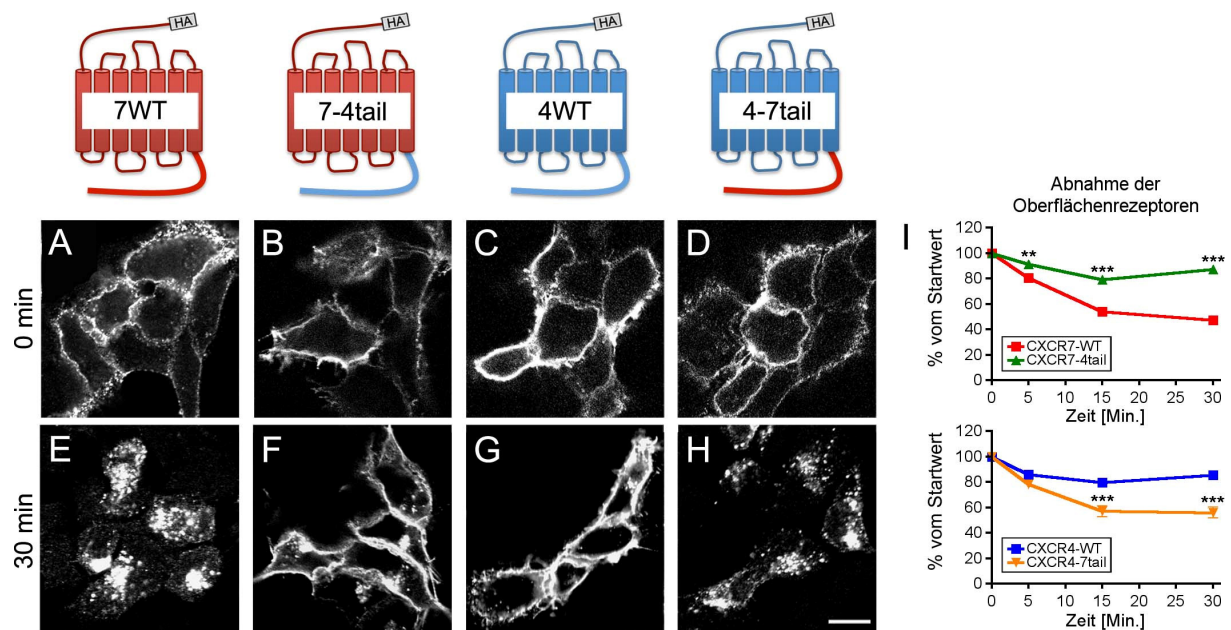


Abbildung 3.2: Unterschiede bei der Liganden-unabhängigen Internalisierung der Wildtyprezeptoren und Tail-swap-Mutanten. Immuncytochemische Pulsmarkierung von wildtypischen und chimären Rezeptoren in transfizierten HEK293 Zellen zur Visualisierung der Rezeptorinternalisierung ohne Ligandeneinfluss. Die Rezeptoren wurden mit anti-HA Antikörper bei 4°C pulsmarkiert. Danach wurden die Kulturen direkt fixiert (A-D) oder vorher noch für 30 Min. ohne Ligand bei 37°C inkubiert (E-H). Die Detektion erfolgte mittels Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper an permeabilisierten Kulturen und mit konfokaler Mikroskopie. *Balken:* 10 µm. **I:** Quantitative Analyse der Rezeptorinternalisierung mittels ELISA. Der Oberflächenrezeptorspiegel wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten ohne Ligand bzw. direkt nach der Beladung mit anti-HA Antikörper (Startwert) an fixierten aber nicht permeabilisierten Zellen bestimmt. Die Werte sind als Prozent des Startwerts angegeben. Bei Rezeptoren mit dem CXCR7 C-Terminus (CXCR7-WT, CXCR4-7tail) tritt Liganden-unabhängige Internalisierung auf. *Statistik:* Vergleich von Wildtyp- und Tail-swap Rezeptor mit 2way ANOVA. *Signifikanzlevel:* **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Zielführung aller Rezeptorkonstrukte zur Plasmamembran vorausgesetzt werden konnte (Abb. 3.2A-D). Die Internalisierung von CXCR7-WT und CXCR4-WT korrelierte mit den vorangegangenen Ergebnissen. Die Gegenüberstellung mit den beiden grundlegendsten Rezeptorchimären, den Tail-swap-Mutanten, bei denen der gesamte C-Terminus eines Rezeptors auf das jeweils andere Rezeptormolekül übertragen wurde, zeigte deutliche Veränderungen im Vergleich zum Grundrezeptor. Pulsmarkierte CXCR7-WT und CXCR4-7tail Rezeptoren waren nach 5 und 15 Minuten teilweise und nach 30 Minuten vollständig internalisiert (Abb. 3.2E, H). Der Anteil an internalisierten CXCR4-WT und CXCR7-4tail Rezeptoren nach dem 30 minütigen Zeitintervall stellte dagegen nur einen geringen Anteil der pulsmarkierten Rezeptoren dar (Abb. 3.2F, G). Sowohl die schnelle Internalisierung von CXCR7-WT und CXCR4-7tail Oberflächenprotein, als auch die zu vernachlässigende Internalisierung von CXCR4-WT und CXCR7-4tail Oberflächenrezeptoren in Abwesenheit von SDF-1 konnten durch die Quantifizierung mittels ELISA bestätigt werden (Abb. 3.2I). Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass der Austausch des CXCR4 C-Terminus durch die entsprechende CXCR7-Domäne Liganden-unabhängige Rezeptorinternalisierung vermittelt. Umgekehrt vermittelt der Austausch der CXCR7 C-terminalen Domäne durch den CXCR4 C-Terminus die Aufhebung der Liganden-unabhängigen Internalisierung.

Für eine weitere Eingrenzung des Bereichs, der für die spontane CXCR7-Internalisierung verantwortlich ist, sollte nun der Abschnitt des C-Terminus angesprochen werden, in dem sich die putative Helix VIII des CXCR7-Rezeptors befindet. In früheren Veröffentlichungen wurde berichtet, dass auch die Deletion des CXCR7 C-Terminus (CXCR7 Δ C-term) die Liganden-unabhängige Rezeptorinternalisierung auslöscht (Zabel et al, 2009). Aus diesem Grund wurde der Helix VIII-kodierende Bereich von Aminosäure 320-338 zum einen deletiert (CXCR7- Δ 19) und zum anderen durch die entsprechende CXCR4-Domäne (AS 313-331), welche bewiesenermaßen keine Helix VIII enthält (Wu et al, 2010), ersetzt. Sowohl Immunfluoreszenz- als auch ELISA-Untersuchungen beider Rezeptormutanten zeigten eine effiziente Liganden-unabhängige Internalisierung (Abb. 3.3E, F, I). Dies lässt darauf schließen, dass die übrigen Aminosäuren 339-362 für eine Liganden-unabhängige CXCR7-Internalisierung ausreichend sind.

Die Suche nach weiteren wichtigen Strukturmotiven unter den restlichen 24 Aminosäuren des CXCR7 C-Terminus ergab ein YSAL-Motiv unter den letzten neun C-terminalen Aminosäuren, das mit den 2008 von Meiser et al. beschriebenen Ergebnissen korrelieren könnte. Dort wurde das YXXL-Motiv am äußersten C-terminalen Ende von CXCR3 für dessen Liganden-unabhängige Internalisierung verantwortlich gemacht. Da die Funktion

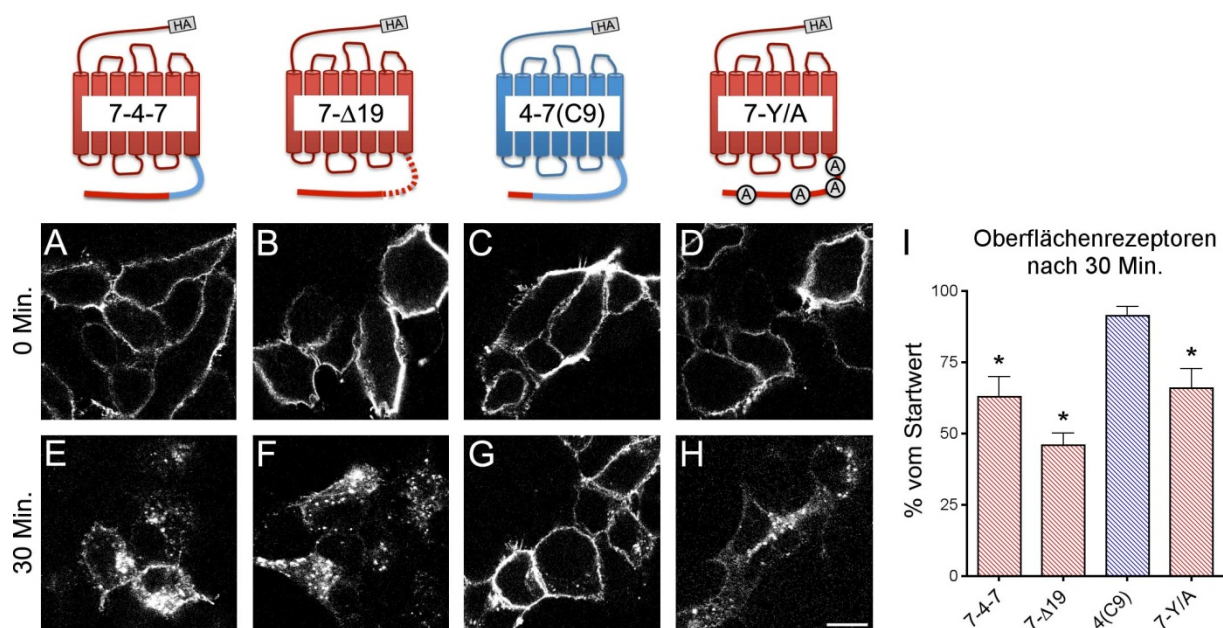


Abbildung 3.3: Einfluss verschiedener internalisierungsrelevanter Motive im CXCR7 C-Terminus auf die Liganden-unabhängige Internalisierung. Immuncytochemische Pulsmarkierung von chimären Rezeptoren in transfizierten HEK293 Zellen zur Visualisierung der Rezeptorinternalisierung ohne Ligandeneinfluss. Die Rezeptoren wurden mit anti-HA Antikörper bei 4°C pulsmarkiert. Danach wurden die Kulturen direkt fixiert (A-D) oder vorher noch für 30 Min. ohne Ligand bei 37°C inkubiert (E-H). Die Detektion erfolgte mittels Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper an permeabilisierten Kulturen und mit konfokaler Mikroskopie. *Balken*: 10 µm. **I**: Quantitative Analyse der Rezeptorinternalisierung mittels ELISA. Der Oberflächenrezeptorspiegel wurde nach 30 Min. Inkubation ohne Ligand bzw. direkt nach der Beladung mit anti-HA Antikörper (Startwert) an fixierten aber nicht permeabilisierten Zellen bestimmt. Die Werte sind als Prozent des Startwerts angegeben. *Statistik*: Ermittlung der Signifikanz der Abweichung vom Startwert mit Student's T-Test. *Signifikanzlevel*: *: $p \leq 0,05$.

dieses Motivs auch für das YSAL-Motiv von CXCR7 logisch wäre, wurden als nächstes die letzten neun C-terminalen Aminosäuren des CXCR4 durch den entsprechenden Teil des CXCR7-Rezeptors ersetzt. Diese CXCR4-7(C9) Rezeptorchimäre zeigte jedoch keine Liganden-unabhängige Internalisierung, die mit der CXCR4-7tail Mutante vergleichbar wäre (Abb. 3.3G, I). Demnach ist der äußerste Bereich des CXCR7 C-Terminus nicht ausreichend, um eine Liganden-unabhängige Rezeptorinternalisierung hervorzurufen.

Die Hypothese, dass die C-terminalen Tyrosine (AS 322, 324, 334, 354) als potentielle Phosphorylierungsstellen des CXCR7-Rezeptors dessen Liganden-unabhängige Internalisierung hervorrufen könnten, wurde mit einer Mutante geprüft, in der diese Tyrosine durch Alanine ersetzt wurden (CXCR7-Y/A). Diese Veränderungen führten aber nicht zur Aufhebung der Internalisierung (Abb. 3.3H, I), so dass ein Einfluss von Tyrosinphosphorylierungen auf den Prozess der Liganden-unabhängigen Internalisierung ausgeschlossen werden kann. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse zur Liganden-unabhängigen Internalisierung des CXCR7-Rezeptors, dass die Aminosäuren 339-362

ausreichend sind, um diesen Prozess zu vermitteln und dass dieser Prozess unabhängig von einem Tyrosin-enthaltendem Motiv geschieht.

3.3 Regulation der Rezeptorstabilität durch die C-terminale CXCR7-Domäne

In den immunocytochemischen Experimenten wurde durchgehend beobachtet, dass sich die Expression der verschiedenen Rezeptoren deutlich unterscheidet. Eine hohe Transfektionseffizienz konnte mit CXCR4-WT und CXCR7-4tail erzielt werden, während die Expression von CXCR7-WT und CXCR4-7tail deutlich geringer war. Um diese Beobachtungen zuverlässig zu quantifizieren wurden Westernblots von aufgereinigten Lysaten erstellt. Die Aufreinigung erfolgte über WGA-Beads, die eine Anreicherung von glykosylierten Membranrezeptorproteinen ermöglichen. Der anti-HA Antikörper erkannte in diesen Lysaten von Rezeptor- und Mock-transfizierten Kulturen eine unspezifische Bande bei 80 kDa. Die rezeptorspezifischen Banden von CXCR7-WT und CXCR7-4tail wurden von dem Antikörper in einer breiten, von 50 bis 70 kDa reichenden Bande detektiert (Abb. 3.4A). Ein ähnliches, rezeptorspezifisches Signal konnte auch mit dem monoklonalen anti-CXCR7 Antikörper 11G8 nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). CXCR4-WT und CXCR4-7tail zeigten mit dem anti-HA Antikörper eine breite Bande bei 47 kDa (Abb. 3.4B). Durch densitometrische Analyse der Signalintensitäten wurden die zuvor beobachteten Expressionsunterschiede zwischen wildtypischen Rezeptoren und Tail swap-Mutanten bestätigt. Der CXCR7-4tail Rezeptor wird 6,6-mal stärker exprimiert als CXCR7-WT, während umgekehrt der CXCR4-7tail Rezeptor ein fünfmal schwächeres Signal zeigt als CXCR4-WT.

Die durch den CXCR7 C-Terminus übertragbare Eigenschaft der spontanen Rezeptorinternalisierung und die geringeren Expressionsspiegel der Rezeptoren, die den CXCR7 C-Terminus tragen, lassen einen Zusammenhang zwischen der C-terminalen Domäne und der Rezeptorstabilität vermuten. Deshalb wurde als nächstes die Umsatzrate von Rezeptorprotein in Abhängigkeit und unabhängig vom Liganden getestet. Zur Untersuchung der Liganden-unabhängigen Rezeptordegradation wurden rezeptortransfizierte Kulturen für 60 oder 180 Minuten mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Die WGA-aufgereinigten Lysate der vier Rezeptoren wurden aufgrund ihrer verschiedenen Expressionsspiegel auf gesonderte Westernblots übertragen, wo sie mit dem anti-HA Antikörper detektiert wurden. Dabei wurden die Expositionenzeiten für die verschiedenen Expressionsspiegel optimiert. Im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kulturen (0 Min.) konnten deutliche Unterschiede bei der Stabilität der vier verschiedenen

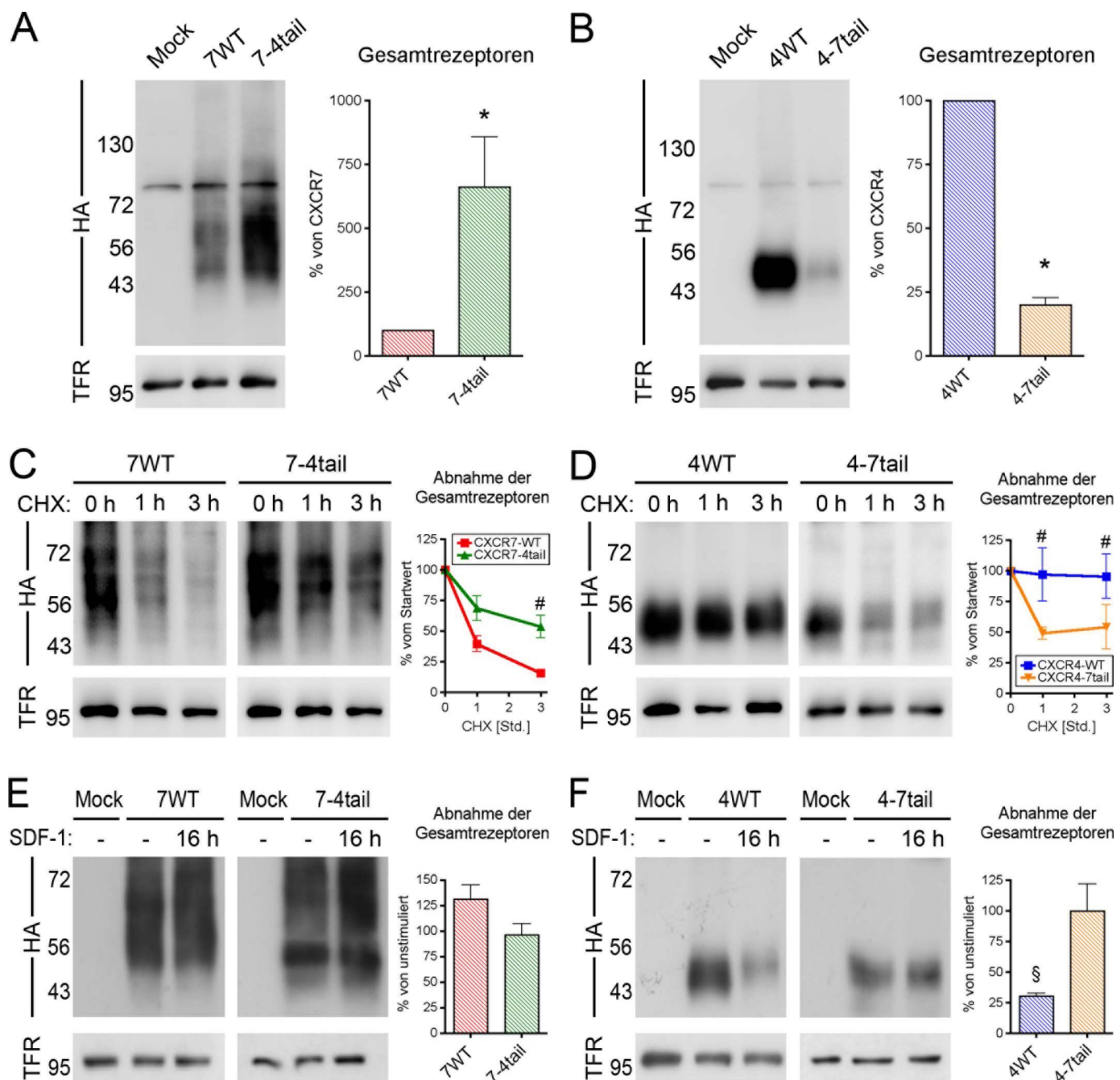


Abbildung 3.4: Regulation der Rezeptordegradation durch die C-terminale Domäne. Immunoblots von WGA-aufgereinigten HEK293 Lysaten, die zuvor transient mit Leervektor (Mock) oder HA-getagtem Rezeptor transfiziert wurden. Die rekombinant exprimierten Rezeptoren wurden mit Kaninchen anti-HA Antikörper detektiert. Der als Ladekontrolle verwendete, endogene Transferrinrezeptor (TFR) wurde am gestripten Blot mit Maus anti-TFR Antikörper nachgewiesen. Für die Quantifizierung wurde das HA/TFR-Verhältnis der durch Densitometrie gewonnenen Werte aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt. **A:** Der anti-HA Antikörper erkennt CXCR7-WT und CXCR7-4tail als spezifische Banden von 50-70 kDa und eine unspezifische Bande bei 80 kDa. CXCR7-4tail ist 6,6mal stärker exprimiert als CXCR7-WT. **B:** Der anti-HA Antikörper erkennt CXCR4-WT und CXCR4-7tail als spezifische Banden bei 47 kDa. CXCR4-7tail ist 5,0mal schwächer exprimiert als CXCR4-WT. **C, D:** Kinetik der Liganden-unabhängigen Rezeptordegradation. Die Kulturen wurden zur Inhibition der Proteinsynthese mit Cycloheximide (CHX) behandelt. Die Blots von CXCR7-WT und CXCR4-7tail wurden länger exponiert um Expressionsunterschiede zu kompensieren. **C:** Bei CXCR7-4tail nimmt der Gesamtrezeptorspiegel langsamer ab als bei CXCR7-WT. **D:** Der CXCR7 C-Terminus von CXCR4-7tail induziert den Abbau von CXCR4-Protein, der bei CXCR4-WT nicht auftritt. **E, F:** Rezeptordegradation unter Langzeit SDF-1 Behandlung. Die 16stündige Behandlung mit SDF-1 induziert eine 70%ige Abnahme des CXCR4-WT Rezeptorproteins, während die Behandlung bei CXCR7-WT, CXCR7-4tail und CXCR4-7tail keine signifikante Abnahme hervorruft. *Statistik:* *: Student's T-Test; #: 2way ANOVA; §: 1way ANOVA. *Signifikanzlevel:* *: $p \leq 0,05$.

Rezeptoren demonstriert werden. CXCR4-WT zeigte keine Veränderung des Proteinexpressionsspiegels, während das CXCR7-Rezeptorprotein nach 180 Minuten CHX-Behandlung fast vollständig aus den Lysaten verschwunden war. Der Austausch der C-terminalen Domänen führte beim CXCR7-Rezeptor zu einer abgeschwächten Degradationsrate (Abb. 3.4A). Am CXCR4-Rezeptor induzierte der CXCR7 C-Terminus dagegen den Rezeptorabbau (Abb. 3.4B). Damit wird die Regulation der Rezeptorstabilität in Abwesenheit von Ligand durch die C-terminale Domäne beeinflusst, wobei die CXCR7-Domäne zu einer Beschleunigung der Degradation führt.

Neben der regulären Rezeptordegradation sollte nun auch der Einfluss von SDF-1 auf die Rezeptorstabilität bestimmt werden. Um den regulären Rezeptorproteinumsatz nicht zu beeinflussen, fanden diese Experimente nicht unter Einfluss von Cycloheximide statt. Stattdessen wurden die Kulturen über längere Zeit (16 Std.) mit 20 nM SDF-1 inkubiert. Die Aufarbeitung und Detektion der Proben wurde analog zu den Liganden-unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die durch densitometrische Analyse erzielten Ergebnisse wurden in Relation zu vergleichbaren Ergebnissen von Vehikel-behandelten Kulturen dargestellt. Die Ergebnisse führten zu der Erkenntnis, dass die Langzeitbehandlung mit SDF-1 bei CXCR4-WT zu einer Degradation von 70 % des Rezeptorproteins führt (Abb. 3.4F). Die Expressionsspiegel von CXCR7-WT und den Rezeptorchimären wurden von dieser Behandlung dagegen nicht beeinflusst (Abb. 3.4E, F).

3.4 Der CXCR7 C-Terminus erhöht die Affinität der Rezeptoren für SDF-1

In den bisherigen Experimenten wurden zunächst vor allem Liganden-unabhängige Prozesse betrachtet. Bevor die Untersuchung von SDF-1 abhängiger Rezeptoraktivierung begonnen wurde, sollte jedoch zunächst die SDF-1 Affinität der Rezeptorchimären überprüft werden. Dies geschah mittels homologer kompetitiver Ligandenbindungsstudien. Dazu wurden die transfizierten Rezeptoren unter Internalisierungs-verhindernden Bedingungen mit 25 pM ¹²⁵I-markiertem SDF-1 und ansteigenden Konzentrationen von nicht markiertem SDF-1 beladen. Dabei verdrängt das nicht markierte SDF-1 mit zunehmender Konzentration immer mehr radioaktiv markiertes SDF-1 von den Bindungsstellen der Rezeptoren, bis sich bei einer bestimmten Konzentration die gebundenen Mengen von markiertem und nicht markiertem SDF-1 gleichen. Dieser Wert der mittleren inhibitorischen Konzentration wird als IC₅₀-Wert bezeichnet und ist für die SDF-1-Affinität des Rezeptors spezifisch. Um allein die Radioaktivität des gebundenen ¹²⁵I-SDF-1 messen zu können, wurden die Kulturen nach der

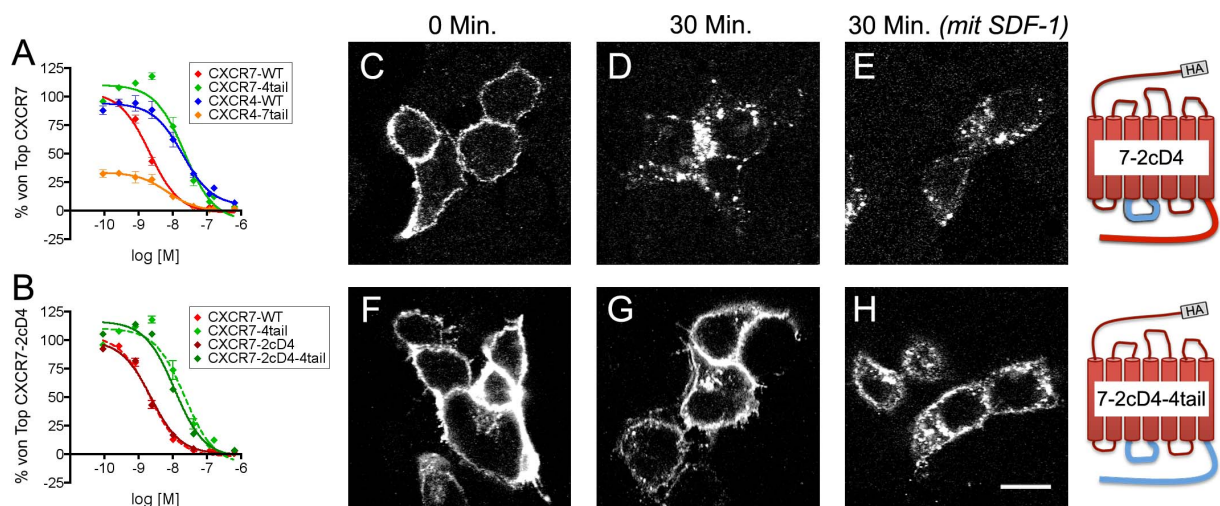


Abbildung 3.5: Bindung von SDF-1 an Wildtyprezeptoren und Rezeptorchimären und Internalisierung der CXCR7-2cD4 Rezeptorchimären. A, B: Homologe kompetitive Ligandenbindungsstudien, bei denen 25 pM ^{125}I -SDF-1 durch ansteigende Konzentrationen von nicht markiertem SDF-1 von den Rezeptorbindungsstellen verdrängt wurden. Die Werte wurden zur Normalisierung auf das Maximum (Top) der CXCR7-WT bzw. CXCR7-2cD4 Kurve bezogen. IC_{50} -Werte: CXCR7-WT (2,6 nM); CXCR4-7tail (8,4 nM); CXCR4 (23,8 nM); CXCR7-4 (25,2 nM); CXCR7-2cD4 (2,3 nM); CXCR7-2cD4-4tail (11,3 nM). A: CXCR7-WT hat eine 10fach höhere Affinität für SDF-1 als CXCR4-WT und CXCR7-4tail. B: Die Veränderung der zweiten cytosolischen Domäne hat keine Auswirkung auf die SDF-1 Affinität des Rezeptors. C-H: Immunocytochemische Pulsmarkierung der chimären Rezeptoren CXCR7-2cD4 (C-E) und CXCR7-2cD4-4tail (F-H) in transfizierten HEK293 Zellen zur Visualisierung der Rezeptorinternalisierung ohne und mit Ligandeneinfluss. Die Rezeptoren wurden mit anti-HA Antikörper bei 4°C pulsmarkiert. Danach wurden die Kulturen direkt fixiert (C, F) oder vorher für 30 Min. ohne Ligand (D, G) oder mit 20 nM SDF-1 (E, H) bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper an permeabilisierten Kulturen und mit konfokaler Mikroskopie. CXCR7-2cD4 internalisiert Liganden-unabhängig, während CXCR7-2cD4-4tail hauptsächlich bei SDF-1 Behandlung internalisiert. *Balken:* 10 μm .

Inkubation gründlich gewaschen, bevor sie lysiert wurden. Als Kontrollen wurden Kulturen mit leerem Vektor transfiziert (Mock) und denselben Behandlungen unterzogen.

Rezeptortransfizierte Kulturen banden deutlich mehr ^{125}I -SDF-1 als die Kontrollkulturen. Bei den Wildtyp- und Tail swap-Rezeptoren wurde folgende Rangordnung der IC_{50} -Werte ermittelt: CXCR7-WT (2,6 nM) < CXCR4-7tail (8,4 nM) < CXCR4 (23,8 nM) < CXCR7-4 (25,2 nM). Damit hat der wildtypische CXCR7-Rezeptor die höchste Affinität für SDF-1, gefolgt von der CXCR4 Mutante, die den CXCR7 C-Terminus trägt (CXCR4-7tail). Die beiden den CXCR4 C-Terminus tragenden Rezeptoren (CXCR4-WT, CXCR7-4tail) haben eine etwa zehnfach geringere SDF-1 Affinität (Abb. 3.5A).

Für die Untersuchung der G-Protein-Kopplung und der damit verbundenen Aktivierung des CXCR7-Rezeptors wurden weitere Rezeptorchimären eingesetzt. Diese entsprechen CXCR7-WT und CXCR7-4tail, nur dass zusätzlich die zweite cytosolische Schleife des CXCR7-

Rezeptors gegen die entsprechende Domäne des CXCR4-Rezeptors vertauscht wurde. Die genauen Aminosäuresequenzen können in Tabelle 3.1 nachgelesen werden. Die ermittelte Affinität dieser Rezeptorchimären unterscheidet sich nicht von der SDF-1-Affinität der Ausgangsrezeptoren. So hat CXCR7-2cD4 einen dem CXCR7-WT ähnlichen IC_{50} -Wert von 2,3 nM und CXCR7-2cD4-4tail hat mit 11,3 nM einen IC_{50} -Wert, der dem IC_{50} -Wert von CXCR7-4tail nahe kommt (Abb. 3.5B). Die zweite cytosolische Domäne hat damit keinen entscheidenden Einfluss auf die SDF-1 Affinität des CXCR7-Rezeptors.

Das subzelluläre Trafficking dieser beiden Rezeptorchimären wurde wie bei den anderen Rezeptorchimären auch mit der Immunfluoreszenzmethode bestimmt. Dabei konnten wie bereits für die SDF-1 Bindungsaffinität beschrieben ebenfalls keine Unterschiede zu den Ausgangsrezeptoren CXCR7-WT und CXCR7-4tail gefunden werden. Beide Rezeptoren werden problemlos an die Zelloberfläche transportiert (Abb. 3.5C, F). Der CXCR7-2cD4 Rezeptor internalisiert Liganden-unabhängig und unter Inkubation mit SDF-1, während CXCR7-2cD4-4tail nur nach SDF-1-Stimulation endocytisiert wird (Abb. 3.5D-E, G-H).

3.5 Der CXCR7-Rezeptor unterbindet die Aktivierung von G-Proteinen

Die Aktivierung von G-Proteinen über den CXCR7-Rezeptor konnte in der Literatur bisher nicht einheitlich geklärt werden (Thelen und Thelen, 2008). In mehreren Studien konnte weder die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden über MAP-Kinasen, noch eine rezeptorabhängige Mobilisierung von intrazellulärem Calcium gezeigt werden (Popik 1998; Levoe et al., 2009; Sun et al., 2010; Boudot et al., 2011; Shimizu et al., 2011). Da die Interaktionen von Chemokinrezeptoren mit G-Proteinen über die C-terminale Domäne und die zweite cytosolische Schleife des Rezeptors vermittelt werden, wurde die G-Protein Aktivierung hier zusätzlich an entsprechenden Rezeptorchimären untersucht. Für diese Experimente wurden die Tail swap-Mutanten und die CXCR7-Mutanten, deren zweite cytosolische Domäne durch die entsprechende CXCR4-Domäne ersetzt wurde, eingesetzt.

Die Aktivierung von G-Proteinen wurde zunächst über die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 untersucht, die auf die Aktivierung von $G\alpha_i$ -Proteinen folgt. Diese Versuche wurden an CHO-K1 Zellen durchgeführt, um unabhängig von Effekten des endogenen CXCR4-Rezeptors der HEK293-Zelllinie zu sein, dessen Aktivierung eindeutig beobachtet werden konnte (Abb. 3.6A). In untransfizierten CHO-K1 Kulturen trat dieser Effekt dagegen nicht auf (Abb. 3.6B). Für die Experimente wurden die Kulturen zunächst in serumfreiem Medium inkubiert, um nicht spezifische G-Protein Aktivierungen zu minimieren. Anschließend fand eine 5-minütige Stimulation der Kulturen durch SDF-1-Zugabe statt. Ein

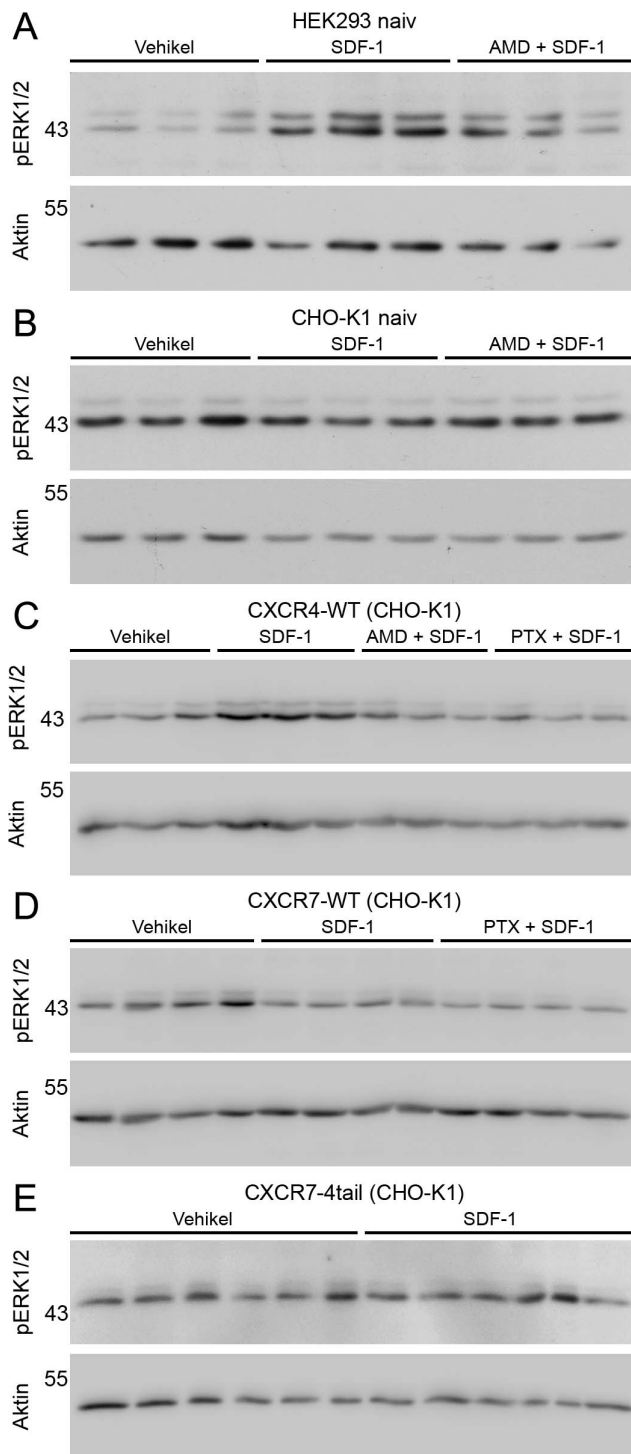


Abbildung 3.6: Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 durch rezeptorvermittelte Aktivierung von $G\alpha_i$ -Proteinen. Für den Nachweis der ERK1/2-Phosphorylierung wurden Kulturen von naiven HEK293 (A) bzw. CHO-K1 Zellen (B) oder rezeptortransfizierten CHO-K1 Zellen (C-E) zunächst in serumfreiem Medium inkubiert, dann 5 Min. mit Vehikel oder SDF-1 stimuliert und danach lysiert. Der CXCR4-Antagonist AMD3100 und der $G\alpha_i$ -Inhibitor Pertussistoxin (PTX) wurden bereits vor SDF-1 Stimulation zugegeben. Der Nachweis erfolgte mittels anti-pERK1/2 Antikörper. Zur Ladekontrolle wurde die Proben ebenfalls mit einem anti- β -Aktin Antikörper detektiert. Eine $G\alpha_i$ -vermittelte ERK1/2-Aktivierung durch SDF-1 Stimulation konnte nur an HEK293 Zellen mit endogenem CXCR4 (A) bzw. an mit CXCR4-WT transfizierten CHO-K1 Zellen (C) beobachtet werden. Es findet nur eine CXCR4-spezifische SDF-1 Antwort auf.

Teil der Kulturen wurde zuvor mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 bzw. mit dem $G\alpha_i$ -Inhibitor Pertussistoxin (PTX) behandelt. Die SDF-1 Stimulation wurde durch Waschen mit eiskaltem PBS abgestoppt und die Zellen wurden direkt in Probenpuffer lysiert. Die Stimulation von CXCR4-WT transfizierten Kulturen zeigte die bereits beschriebene (Ganju et al., 1998; Sotsios et al., 1999), SDF-1 induzierte Phosphorylierung (Abb. 3.6C). Dabei konnte ein deutlicher Unterschied zwischen nicht stimulierten Kontrollkulturen und den SDF-1

stimulierten Kulturen gezeigt werden. Dieser Effekt konnte durch den Einsatz von AMD3100 und PTX unterdrückt werden (Abb. 3.6C), wodurch auf ein direktes Zusammenspiel von CXCR4 und $G\alpha_i$ -Protein geschlossen werden kann. Eine vergleichbare Aktivierung von ERK1/2 in den mit CXCR7-WT und CXCR7-4tail transfizierten Kulturen konnte dagegen nicht gezeigt werden (Abb. 3.6D, E). Die Signalintensität der Banden der stimulierten Kulturen war nicht signifikant von der Signalintensität der Banden der Kontrollkulturen verschieden.

Des Weiteren sollte die Aktivierung von G-Proteinen auch anhand der Messung von intrazellulären $[Ca^{2+}]_i$ -Strömen untersucht werden. Diese geben bekanntermaßen Aufschluss über die Aktivierung von Proteinen der $G_{q/11}$ -Subfamilie oder von $G_{i/o}$ - $G_{q/11}$ -Proteinchimären (Conklin et al., 1993; Liu et al., 2003). Für die Experimente wurden die Zellkulturen mit Rezeptorkonstrukten allein bzw. mit Rezeptorkonstrukten und G-Proteinkonstrukten gleichzeitig transfiziert. Vor den Messungen wurden die transfizierten Kulturen zunächst mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff des Calcium 4 Assay Kits von Molecular Devices inkubiert, bevor die Stimulation und Messung mit der FlexStation3 erfolgte.

Die Funktionalität des Versuchsaufbaus konnte durch die Stimulation des Neurokinin-1 Rezeptor (NK1-R) gezeigt werden, der nach Substanz P-Stimulation G_q -Proteine aktiviert, die dann ihrerseits die Freisetzung von $[Ca^{2+}]_i$ ins Cytosol vermitteln (Abb. 3.7A). Die Stimulation mit SDF-1 löste dagegen keine Mobilisierung von $[Ca^{2+}]_i$ in CHO-K1 Zellen aus, die allein mit wildtypischen Rezeptoren oder Rezeptorchimären transfiziert waren (Abb. 3.7A). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass endogenes $G_{q/11}$ -Protein, das die Rezeptoren über den Phospholipase C-Signalweg an die Calcium-Mobilisierung koppeln könnte, nicht in ausreichendem Maße vorhanden ist um ein detektierbares Signal zu erzeugen. Wahrscheinlicher ist es jedoch, dass die Rezeptoren nicht an die endogenen G-Proteine koppeln. Für CXCR4 ist bekannt, dass er an $G\alpha_{i2}$ -Proteine koppelt (Moepps et al., 1997; Kleemann et al., 2008). Deshalb wurden die Rezeptoren im Weiteren zusammen mit den G-Proteinchimären Gqi5 oder G16z44 transfiziert, die $G\alpha_i$ -bindende Rezeptoren an $G\alpha_q$ -vermittelte Signalwege koppeln. Nach Cotransfektion von CXCR4-WT und einer G-Proteinchimäre konnte durch Stimulation mit SDF-1 eine deutliche Calcium-Antwort gemessen werden (Abb. 3.7A, B). Bei CXCR7-WT und den Rezeptorchimären konnte durch Cotransfektion mit einer G-Proteinchimäre jedoch keine Calcium-Antwort hervorgerufen werden (Abb. 3.7B).

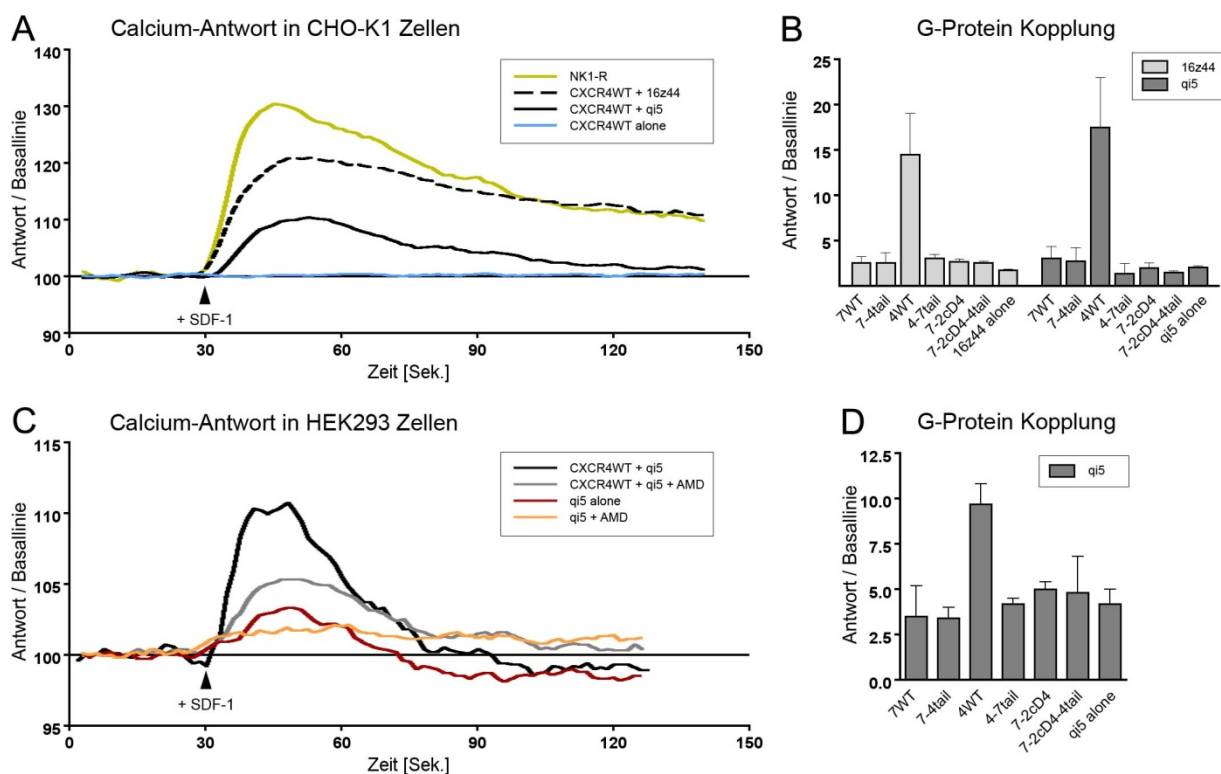


Abbildung 3.7: Kopplung von wildtypischen und chimären Rezeptoren an G-Proteinchimären.

Zum Nachweis der G-Protein Kopplung durch Messung der $G\alpha_q$ -vermittelten intrazellulären Calcium-Antwort wurden CHO-K1 (A, B) und HEK293 Zellen (C, D) transient mit den wildtypischen und chimären Rezeptoren zusammen mit G-Proteinchimären transfiziert. Die G-Proteinchimären 16z44 und qi5 koppeln $G\alpha_i$ -aktivierende Rezeptoren an $G\alpha_q$ -vermittelte Signalkaskaden. Die Stimulation erfolgte nach 30 Sek. mit 80 nM SDF-1 und AMD3100 wurde 15 Minuten vor Versuchsbeginn appliziert. Der durch Substanz P aktivierte, $G\alpha_q$ -koppelnde Neurokin-1 Rezeptor (NK1-R) diente als Positivkontrolle. **A, C:** Die Traces der Calcium-Antworten wurden auf die Basallinie normalisiert. Jeder Trace entspricht dem Mittelwert aus 3-4 Wells eines repräsentativen Experiments. **B, D:** Mittelwerte der maximalen Fluoreszenzamplitude (n=8-12). Eine G-Protein Kopplung konnte nur bei CXCR4-WT und nur in Kombination mit einer G-Proteinchimäre gezeigt werden.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde auch an HEK293 Zellen angewandt, um die Experimente für das bei den übrigen Fragestellungen angewandte HEK293-Zellsystem zu validieren. Die Experimente führten ebenfalls zu der Aussage, dass allein der CXCR4-Rezeptor und nur bei Cotransfektion mit einer G-Proteinchimäre eine deutliche Calcium-Antwort auslöst. Die Relevanz von endogenem CXCR4-Rezeptor in den HEK293 Zellen zeigt sich bei der Messung von Kulturen, die allein mit einer G-Proteinchimäre transfiziert wurden. In diesen Kulturen konnte ebenfalls eine Aktivierung gemessen werden, deren Signalstärke allerdings geringer als die von rezeptortransfizierten Kulturen war (Abb. 3.7C). Zur Prüfung der CXCR4-Spezifität des SDF-1 Signals wurden die Kulturen außerdem mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 vorbehandelt. Dies führte zu einer deutlichen Reduktion des SDF-1 vermittelten Signals, allerdings nicht zu einer kompletten Auslöschung der Calcium-Antwort. CXCR7-WT und die Rezeptorchimären zeigen auch in HEK293 Zellen keine Mobilisierung

von intrazellulärem Calcium (Abb. 3.7D). Damit löscht der CXCR7 C-Terminus die G-Proteinkopplung des CXCR4-Rezeptors aus, wenn er mit diesem Rezeptor fusioniert wurde. Außerdem löst CXCR7 keine G-Protein abhängigen Signalkaskaden aus und auch der Austausch seiner C-terminalen Domäne durch die entsprechende CXCR4-Domäne ist nicht ausreichend um eine G-Protein Aktivierung hervorzurufen. Auch der zusätzliche Austausch der zweiten cytosolischen Domäne hat darauf keinen weiteren Einfluss.

3.6 Regulation der Liganden-abhängigen Rezeptorinternalisierung

In Zabel et al. 2009 wurde gezeigt, dass die spontane und Liganden-abhängige Internalisierung des CXCR7-Rezeptors durch die Deletion der C-terminalen Domäne ausgelöscht werden kann. Des Weiteren ist bereits etabliert, dass der CXCR4-Rezeptor unter Ligandeneinfluss internalisiert (Haribabu et al., 1997). Basierend auf diesem Wissen sollte nun geprüft werden, ob der Austausch der C-terminalen Domäne von CXCR7 bei CXCR7-4tail Liganden-abhängige Internalisierung erlaubt, nachdem die spontane Internalisierung bei dieser Mutante ausgelöscht ist. Für diese Untersuchungen wurden erneut die Techniken Immunfluoreszenz und ELISA in Form der unter 3.1 beschriebenen Pulsmarkierung mit anti-HA Primärantikörper angewendet. Auf die Pulsmarkierung folgte eine 30 minütige Behandlung mit Vehikel, 20 nM SDF-1, 1 μ M CCX733 oder 6 μ M AMD3100.

Das Experiment bestätigte die Hypothese, dass CXCR7-4tail in Anwesenheit von SDF-1 internalisiert (Abb. 3.8E-G). Die ELISA-Analysen mit dem synthetischen CXCR7-Liganden CCX733 zeigten im Weiteren, dass auch dieser Ligand die Internalisierung des Rezeptors im Vergleich zur geringen, spontanen Internalisierung beschleunigte (Abb. 3.8H). Eine ähnliche Beschleunigung der Internalisierung wurde auch an CXCR7-WT gezeigt. Unter CCX733-Einfluss wurde CXCR7-WT schneller internalisiert als ohne Ligand und eine Behandlung mit SDF-1 führte nach dem 30 minütigen Internalisierungsintervall sogar zu einer nahezu vollständigen Internalisierung der pulsmarkierten Oberflächenrezeptoren (Abb. 3.8A-D). An CXCR4-WT konnten die bereits bekannten Effekte beobachtet werden, dass der Rezeptor nur sehr schwach spontan internalisiert, durch SDF-1 eine eindeutige Internalisierung einsetzt und dass AMD3100 als CXCR4-Antagonist die Rezeptorinternalisierung blockiert (Abb. 3.8I-L). Bei der Tail swap-Mutante CXCR4-7tail wurden keine Einflüsse von SDF-1 und AMD3100 auf die Internalisierung festgestellt. Unter jeglicher Behandlung erreichte der Rezeptor nur das Internalisierungslevel wie bei der Liganden-unabhängigen Internalisierung (Abb. 3.8M-P). Diese Experimente führen zu der Aussage, dass SDF-1 und CCX733 die Internalisierung von CXCR7-WT und CXCR7-4tail beschleunigen.

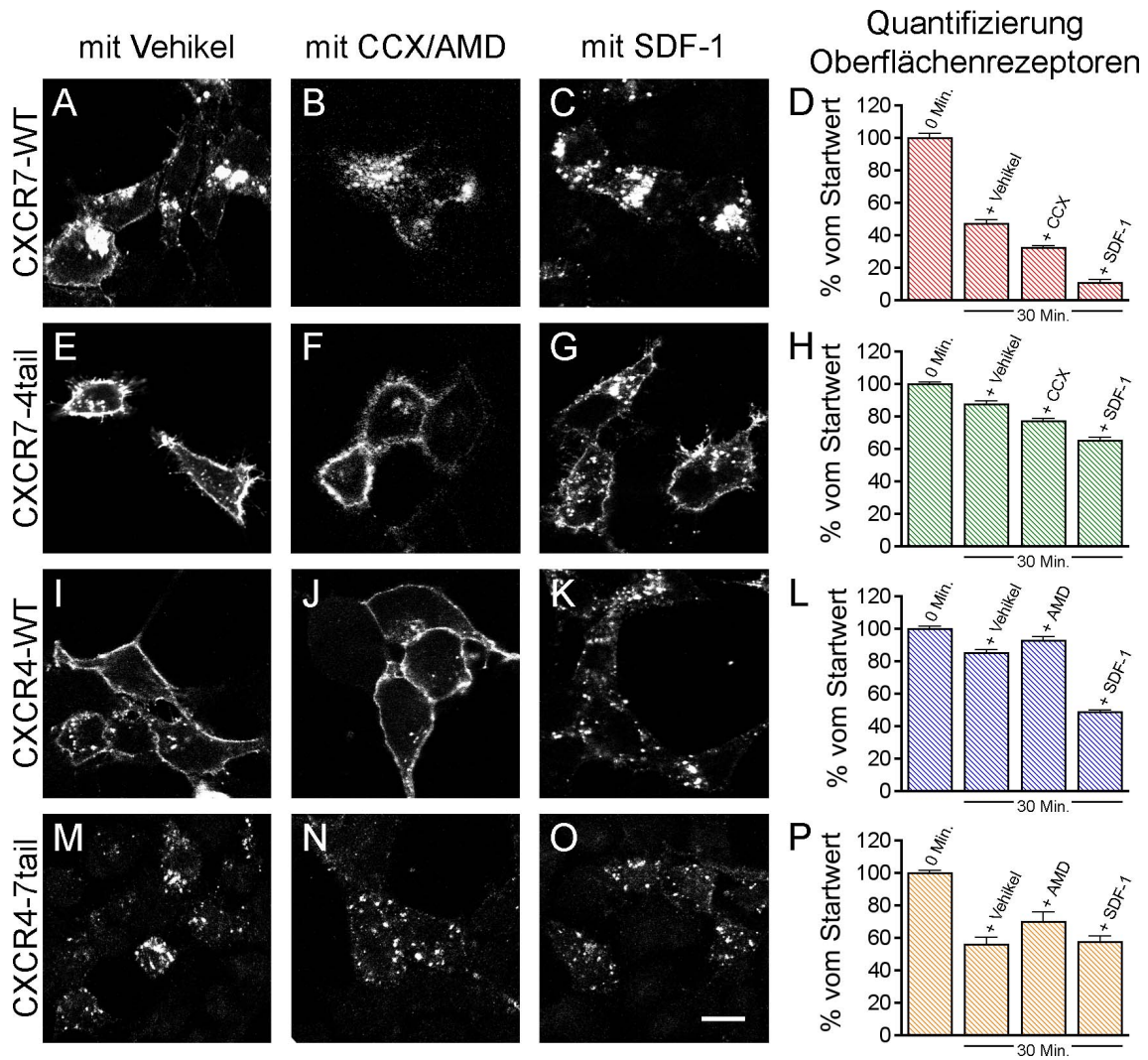


Abbildung 3.8: Unterschiede zwischen Liganden-unabhängiger und Liganden-abhängiger Internalisierung der Wildtyprezeptoren und Tail swap-Mutanten. Immunocytochemische Pulsmarkierung von wildtypischen und chimären Rezeptoren in transfizierten HEK293 Zellen zur Visualisierung der Rezeptorinternalisierung. Die Rezeptoren wurden mit anti-HA Antikörper bei 4°C pulsmarkiert. Danach wurden die Kulturen für 30 Min. mit Vehikel (A, E, I, M), 20 nM SDF-1 (C, G, K, O), 6 µM CXCR4-Antagonist AMD3100 (J, N) bzw. 1 µM synthetischem CXCR7-Liganden CCX733 bei 37°C inkubiert (B, F). Die Detektion erfolgte mittels Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper an permeabilisierten Kulturen und mit konfokaler Mikroskopie. *Balken:* 10 µm. **D, H, L, P:** Quantitative Analyse der Rezeptorinternalisierung mittels ELISA. Der Oberflächenrezeptorspiegel wurde nach 30 Min. Inkubation mit angegebenen Liganden bzw. direkt nach der Beladung mit anti-HA Antikörper (Startwert) an fixierten, aber nicht permeabilisierten Zellen bestimmt. Die Werte sind als Prozent des Startwerts angegeben. SDF-1 und CCX733 beschleunigen die Internalisierung von CXCR7-WT und CXCR7-4tail signifikant. CXCR4-WT wird nur durch SDF-1 internalisiert und auf CXCR4-7tail haben SDF-1 und AMD3100 keinen signifikanten Einfluss.

3.7 Aktivierung der CXCR7-4tail Mutante

Neben der Eigenschaft der CXCR4 C-terminalen Domäne eine SDF-1 abhängige Internalisierung auszulösen, ist weiterhin bekannt, dass dieser Vorgang durch GRK-phosphorylierungsabhängige Mechanismen vermittelt wird (Barker und Benovic, 2011). Diese Eigenschaft sollte an der CXCR7-4tail Rezeptorchimäre im Vergleich mit dem CXCR4-WT Rezeptor überprüft werden. Die Fragestellung wurde mit Westernblots von WGA-aufgereinigten Lysaten und dem UMB-2 Primärantikörper angegangen. UMB-2 ist ein monoklonaler Kaninchen anti-CXCR4 Antikörper, der gegen die 22 C-terminalen Aminosäuren des CXCR4-Rezeptors gerichtet ist (Fischer et al., 2008). Der Antikörper ist phosphosensitiv und eignet sich für die Klärung einer Phosphorylierungsfragestellung. Wie bei Sanchez-Alcaniz et al. (2011) vor kurzem gezeigt wurde, ist die UMB-2-Bindung an CXCR4-WT nach einer Stimulation des Rezeptors, auf die eine Phosphorylierung folgt, deutlich beeinträchtigt. Die UMB-2-Bindung konnte aber wieder hergestellt werden, wenn die stimulierten Proben während der WGA-Aufreinigung mit der λ -Proteinphosphatase (λ -PP) dephosphoryliert wurden. Der Antikörper UMB-2 erkannte an unbehandelten Proben die gleichen spezifischen Rezeptorbanden wie der anti-HA Antikörper (vgl. Abb. 3.4). Für

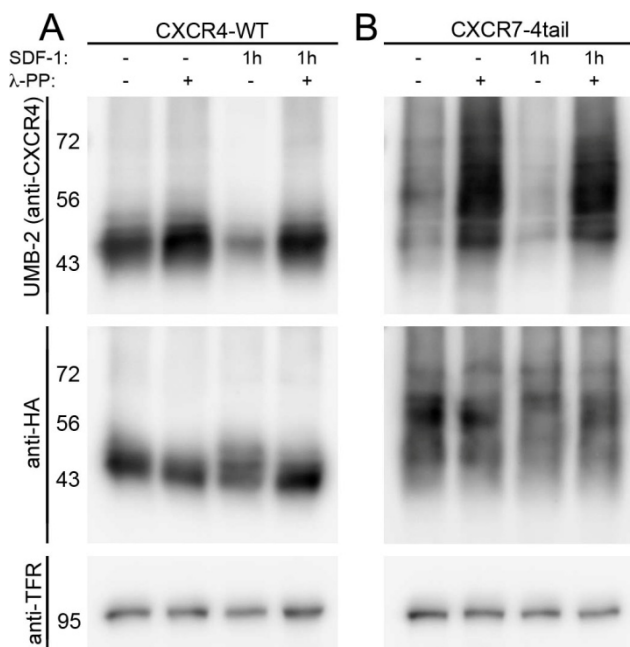


Abbildung 3.9: C-terminale Phosphorylierung von CXCR4-WT und CXCR7-4tail.

Immunoblots von WGA-aufgereinigten HEK293 Lysaten, die zuvor transient mit HA-getagtem Rezeptor transfiziert wurden. Die Kulturen wurden mit Vehikel oder 20 nM SDF-1 für 1 Std. stimuliert und die Lysate wurden wie dargestellt mit Lambda Proteinphosphatase (λ -PP) dephosphoryliert. **Oberer Abschnitt:** Detektion von CXCR4-WT (A) und CXCR7-4tail (B) mit dem mk Kaninchen anti-CXCR4 Antikörper UMB-2, der als Epitop nur das nicht phosphorylierte C-terminale Ende des CXCR4-Rezeptors erkennt. Der Vergleich von nicht stimulierten λ -PP-behandelten und λ -PP-unbehandelten Lysaten zeigt eine geringe konstitutive Phosphorylierung des UMB-2 Epitops bei CXCR4-WT, aber eine starke konstitutive Phosphorylierung bei CXCR7-4tail. Durch

Behandlung mit SDF-1 kann eine nahezu vollständige Phosphorylierung des UMB-2 Epitops beider Rezeptoren erreicht werden. **Untere Abschnitte:** Aliquots der gleichen Proben des oberen Abschnittes wurden mit Kaninchen anti-HA Antikörper zur Überprüfung der Gleichmäßigkeit der Expressionsspiegel detektiert. Außerdem wurden sie mit Maus anti-Transferrinrezeptor (TFR) zur zusätzlichen Überprüfung von gleichmäßiger Proteinbeladung detektiert.

CXCR4 zeigte er eine Bande bei 47 kDa und für CXCR7-4tail zeigte er eine breite Bande von 50 bis zu 70 kDa (Abb. 3.9). Durch Dephosphorylierung konnte bei CXCR7-4tail im Gegensatz zu CXCR4-WT ein verstärktes Signal detektiert werden. Dies spricht für eine konstitutive Phosphorylierung des Rezeptors. Nach einer einstündigen Inkubation der rezeptortransfizierten Kulturen mit SDF-1 verschwindet das UMB-2 Signal bei beiden Rezeptoren nahezu vollständig. Durch Dephosphorylierung der Rezeptoren wurde das UMB-2 Signal wieder detektierbar. Es findet also bei beiden Rezeptoren eine SDF-1-induzierte Phosphorylierung statt. Die Ladekontrollen, für die sowohl der anti-HA Antikörper als auch der anti-Transferrinrezeptor Antikörper eingesetzt wurden, zeigten dabei keine entsprechenden Abweichungen im Proteinspiegel. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass CXCR7-4tail anders als CXCR4-WT bereits in nicht stimulierten Kulturen konstitutiv im Bereich der 22 C-terminalen Aminosäuren phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierung durch Stimulation mit SDF-1 noch intensiviert wird.

3.8 Der CXCR7 C-Terminus beschleunigt die Aufnahme und den Abbau von SDF-1

Nach Untersuchung der Regulation der Internalisierung und der Aktivierung von Wildtyp-Rezeptoren und den Tail swap-Rezeptorchimären, sollte als Nächstes die rezeptorabhängige Prozessierung von SDF-1 durch diese Rezeptoren untersucht werden. Dazu wurden zunächst die Kinetiken der Aufnahme von radioaktiv markiertem SDF-1 durch die Rezeptoren bzw. durch Mock-transfizierte Kulturen von HEK293-Zellen geprüft. Zunächst wurden die Kulturen unter Internalisierungs-verhindernden Bedingungen (4°C) mit 25 pM ¹²⁵I-SDF-1 beladen. Anschließend wurden sie mit eiskaltem PBS gewaschen, um einen SDF-Pulse zu erzeugen. Ein Teil der Kulturen wurde direkt nach dem Beladen lysiert, um den Startwert zu bestimmen. Die übrigen Kulturen wurden über verschiedene Zeitintervalle (0, 5, 15, 30 Min) bei 37°C inkubiert, um die Internalisierung des Radioliganden ¹²⁵I-SDF-1 zu ermöglichen. Dann wurden die Kulturen mit einem sauren Citratpuffer (pH4,5) gewaschen, wodurch sämtliches, an der Zelloberfläche verbliebenes ¹²⁵I-SDF-1 abgewaschen wurde, so dass der Anteil an aufgenommenem ¹²⁵I-SDF-1 in den Lysaten gemessen werden konnte. Der Anteil des aufgenommenen ¹²⁵I-SDF-1 wurde dann als Prozent des Startwertes dargestellt. Für alle vier Rezeptoren konnte die Aufnahme von ¹²⁵I-SDF-1 gezeigt werden. Allerdings traten deutliche Unterschiede in den Kinetiken auf (Abb. 3.10A, B). Während die ¹²⁵I-SDF-1 Aufnahme bei CXCR4-WT und CXCR7-4tail relativ langsam war und das intrazelluläre ¹²⁵I-SDF-1 konstant zunahm, wurde das gebundene ¹²⁵I-SDF-1 von CXCR7-WT und CXCR4-7tail sehr schnell internalisiert und erreichte früh ein Maximum. Dies zeigt, dass der CXCR7

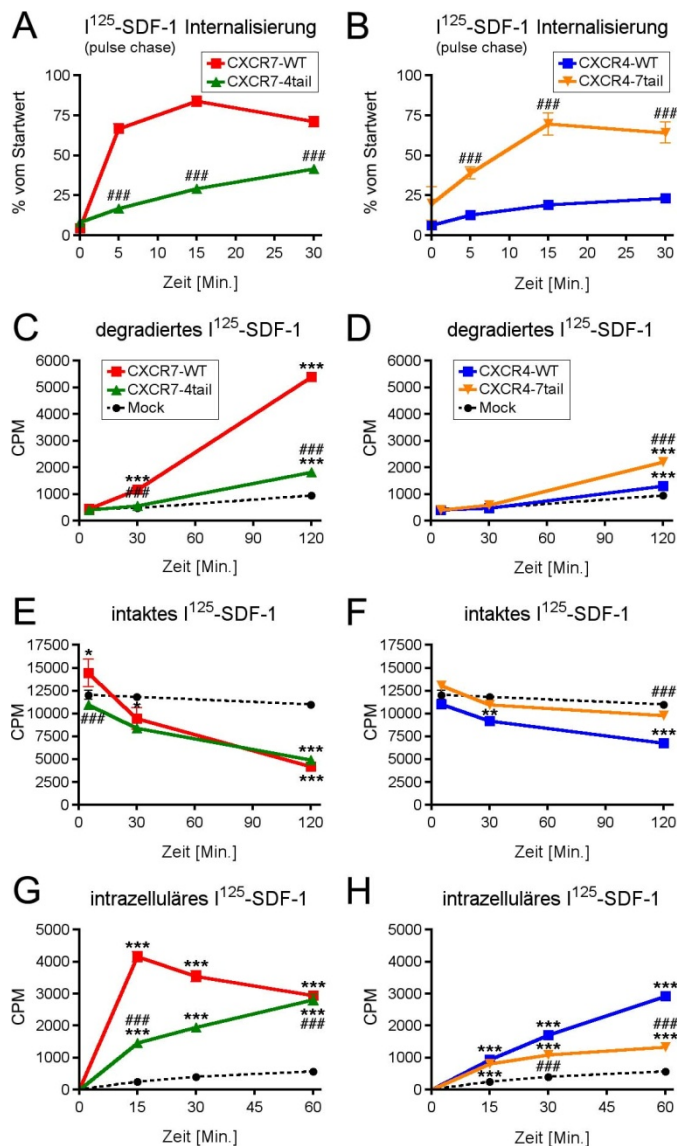


Abbildung 3.10: Schnelle Endocytose und Degradation von ^{125}I -SDF-1 durch den CXCR7 C-Terminus. HEK293 Zellen wurden transient mit Leervektor (Mock), Wildtyp oder Tail-swap Rezeptor transfiziert. **A, B:** Internalisierungskinetik von rezeptorgebundenem ^{125}I -SDF-1. Rezeptortransfizierte Kulturen wurden bei 4°C mit ^{125}I -SDF-1 pulsmarkiert, gewaschen und direkt lysiert (Startwert) oder für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C inkubiert und vor der Lyse sauer gewaschen, um restliches oberflächengebundenes ^{125}I -SDF-1 zu entfernen. Die Daten der sauer gewaschenen Proben sind als Prozent des Startwerts angegeben. Rezeptoren, die den CXCR7 C-Terminus tragen, vermitteln eine schnellere Internalisierung von ^{125}I -SDF-1 als Rezeptoren mit dem CXCR4 C-Terminus. **C-F:** Scavenging Aktivität der Wildtyp und Tail-swap Rezeptoren. Die verschiedenen Kulturen wurden für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C mit ^{125}I -SDF-1 inkubiert. Dann wurden die Überstände einer TCA-Fällung unterzogen um degradiertes ^{125}I -SDF-1 (C, D) von intaktem ^{125}I -SDF-1 (E, F) zu separieren. C, D: Rezeptoren mit dem CXCR7 C-Terminus erzeugen mehr ^{125}I -SDF-1 Abbauprodukte im Zellkulturüberstand. E: Die Entfernung von intaktem ^{125}I -SDF-1 aus dem Zellkulturüberstand erfolgt bei CXCR7-WT und CXCR7-4tail nach einer

ähnlichen Kinetik. F: Im Gegensatz zu CXCR4-7tail entfernt CXCR4-WT signifikante Mengen intaktes ^{125}I -SDF-1 aus dem Zellkulturüberstand. **G, H:** Intrazelluläre Akkumulation von ^{125}I -SDF-1. Die verschiedenen Kulturen wurden für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C mit ^{125}I -SDF-1 inkubiert. Anschließend wurden sie sauer gewaschen, um restliches oberflächengebundenes ^{125}I -SDF-1 zu entfernen, und dann lysiert. Die Messung des intrazellulären ^{125}I ergab, dass die Rezeptoren mit dem CXCR7 C-Terminus schnell ^{125}I -SDF-1 in den Zellen akkumulieren, bevor der intrazelluläre ^{125}I -SDF-1 Spiegel wieder leicht absinkt (CXCR7-WT) bzw. einen konstanten Spiegel erreicht (CXCR4-7tail). Die Rezeptoren mit dem CXCR4 C-Terminus akkumulierten dagegen fortwährend mehr ^{125}I -SDF-1 in den Zellen. *Statistik:* 2way ANOVA. *: signifikante Unterschiede zwischen dem jeweiligen Rezeptor und Mock transfizierten Kulturen. #: signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Tail-swap Mutante aufzeigen. *Signifikanzlevel:* *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

C-Terminus im Vergleich zum CXCR4 C-Terminus eine deutlich schnellere Aufnahme von SDF-1 ermöglicht.

Basierend auf dieser Erkenntnis sollte als Nächstes untersucht werden, ob die Effizienz der SDF-1 Aufnahme aus dem Kulturmedium bei den CXCR7 C-Terminus tragenden Rezeptoren

auch verbessert ist. Aus diesem Grund wurden die Kulturen andauernd für 5, 30, 90 oder 120 Minuten mit ^{125}I -SDF-1 inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und dann einer Fällung mit 12,5% Trichloressigsäure (TCA) unterzogen. Dadurch konnte intaktes Protein pelletiert werden, während Proteinfragmente gelöst blieben. Beide Fraktionen wurden getrennt gemessen, um die Verhältnisse von intaktem ^{125}I -SDF-1 und degradiertem [^{125}I] zu bestimmen. Die Zellen wurden währenddessen sauer gewaschen und lysiert. So wurde restliches oberflächengebundenes ^{125}I -SDF-1 entfernt und das intrazellulär akkumulierte ^{125}I -SDF-1 konnte gemessen werden.

Die schnellste Akkumulation von degradiertem ^{125}I -SDF-1 wurde im Kulturmedium von CXCR7-WT beobachtet (Abb. 3.10C). Der Rezeptor erzeugte in 120 Minuten 2,9mal mehr Abbauprodukte als CXCR7-4tail. Auch die CXCR4-Mutante, welche die C-terminale Domäne von CXCR7 trägt (CXCR4-7tail), erzeugte 1,7mal mehr Abbauprodukte als der wildtypische CXCR4-Rezeptor (Abb. 3.10C, D). Verglichen mit CXCR7-WT erzielten die CXCR4-7tail transfizierten Kulturen allerdings nur eine 2,4mal geringere Menge an degradiertem [^{125}I]. Trotz der deutlichen Unterschiede lagen die Mengen an degradiertem [^{125}I] in allen rezeptortransfizierten Kulturen signifikant über dem Level der Mock-transfizierten Kulturen. Soweit weisen die Experimente darauf hin, dass der CXCR7 C-Terminus nicht nur die Aufnahme von SDF-1 beschleunigt, sondern auch dessen Degradation bzw. die Exocytose der Degradationsprodukte erhöht.

Die Betrachtung der Spiegel von intaktem ^{125}I -SDF-1 in den Kulturüberständen zeigte bei allen vier Rezeptoren eine Abnahme über die Zeit. Am effizientesten entfernten CXCR7-WT und CXCR7-4tail das ^{125}I -SDF-1 aus dem Medium (Abb. 3.10E). Die Reduktion von ^{125}I -SDF-1 im Medium durch CXCR4-WT ist etwas geringer, aber signifikant stärker als durch CXCR4-7tail (Abb. 3.10F). Bei CXCR4-7tail wurde zwar eine Tendenz zur Abnahme von extrazellulärem ^{125}I -SDF-1 gefunden, diese war jedoch nicht signifikant von der ^{125}I -SDF-1 Reduktion durch Mock-transfizierte Kulturen verschieden. Aus diesen Ergebnissen kann abgelesen werden, dass CXCR4-WT und CXCR7-4tail, obwohl sie SDF-1 langsamer aufnehmen und abbauen als die entsprechenden Rezeptoren mit der C-terminalen CXCR7-Domäne, SDF-1 trotzdem effizient aus dem Kulturmedium entfernen.

Um diese Diskrepanz zu erklären, wurden die Daten zur intrazellulären ^{125}I -SDF-1-Akkumulation herangezogen. Diese Daten zeigen eine deutliche Akkumulation von ^{125}I -SDF-1 in Kulturen mit CXCR4-WT und CXCR7-4tail. Im Vergleich dazu akkumulierten die CXCR7-WT und CXCR4-7tail transfizierten Kulturen zunächst schnell eine gewisse Menge ^{125}I -SDF-1, der intrazelluläre ^{125}I -SDF-1-Spiegel erreichte aber früh sein Maximum und stieg

nicht weiter an (Abb. 3.10G, H). Im Fall von CXCR7-WT nahm es sogar wieder leicht ab. Diese Tatsache lässt sich durch den Vergleich mit den zuvor gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der ^{125}I -SDF-1-Degradation erklären. Dort konnte parallel zum stagnierenden intrazellulären Level von ^{125}I -SDF-1 ein verstärktes Auftreten von extrazellulären Abbauprodukten beobachtet werden. Dies alles lässt vermuten, dass die Rezeptoren mit dem CXCR4 C-Terminus die langsamere SDF-1-Aufnahme durch eine andauernde Akkumulation von SDF-1 im Zellinneren kompensieren. Die Rezeptoren mit der CXCR7 C-terminalen Domäne nehmen SDF-1 dagegen schneller auf, schleusen Abbauprodukte dann aber auch schneller aus der Zelle heraus, so dass sich das intrazelluläre SDF-1-Level schneller bei einer bestimmten Konzentration einpendeln kann.

3.9 Potentielle Phosphorylierungsstellen im CXCR7 C-Terminus beeinflussen die Geschwindigkeit der Rezeptorinternalisierung

Bisher wurden vor allem die Auswirkungen des Austausches der C-Terminalen Domänen von CXCR7 und CXCR4 auf die Funktionalität der Rezeptoren untersucht. Darüber hinaus wurden weitere Mutanten des CXCR7-Rezeptors auf veränderte Rezeptorfunktionalität hin untersucht. Wie aus den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Ergebnissen hervorgeht, gab es bei diesen Mutanten aber keinen Hinweis auf eine veränderte Funktionalität. Während der Durchführung der weiterführenden Untersuchungen zu den Tail swap-Mutanten geriet allerdings eine weitere Mutante in den Fokus, deren Funktionalität deutlich eingeschränkt zu sein schien. Bei dieser Mutante handelte es sich um eine Phosphorylierungsstellen-defiziente Mutante, bei der komplementär zur CXCR7-Y/A Mutante sämtliche Serin- und Threonin-Reste durch Alanine ersetzt wurden.

Für die Charakterisierung dieser ST/A-Mutante wurde zunächst die bereits unter 3.1 beschriebene immunocytochemische Pulsmarkierung herangezogen. Dabei wurden die lebendigen rezeptortransfizierten und mit Primärantikörper beladenen Kulturen über verschiedene Zeitintervalle (0, 5, 15, 30 Min.) bei Internalisierung-ermöglichenden 37°C ohne oder mit 20 nM SDF-1 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen fixiert, permeabilisiert und pulsmarkiertes Rezeptorprotein wurde mit Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper detektiert und mit konfokaler Mikroskopie dokumentiert.

Bereits dieser relativ einfache Versuchsansatz zeigte deutliche Unterschiede zwischen der CXCR7-ST/A Mutante und CXCR7-WT. Diese stellten sich vor allem bei den frühen Zeitpunkten, insbesondere aber nach 15 Minuten Inkubationszeit, dar. So war bei der ST/A-Mutante nach 5 Minuten fast kein internalisiertes Rezeptorprotein zu erkennen (Daten nicht

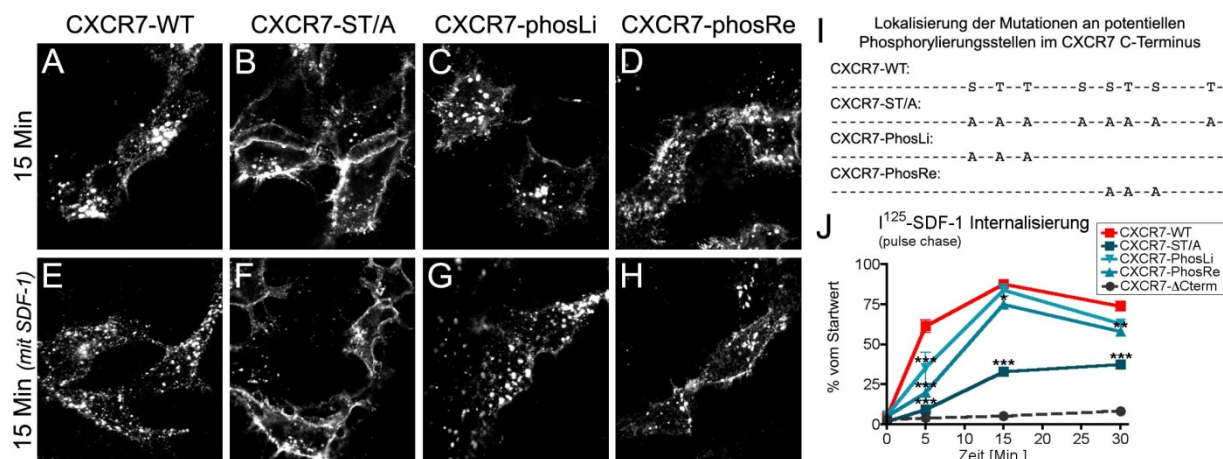


Abbildung 3.11: Unterschiede bei der Internalisierung von CXCR7-WT und Serin/Threonindefizienten Mutanten. Immuncytochemische Pulsmarkierung von wildtypischen und mutierten Rezeptoren in transfizierten HEK293 Zellen zur Visualisierung der Rezeptorinternalisierung. Die Rezeptoren wurden mit anti-HA Antikörper bei 4°C pulsmarkiert. Danach wurden die Kulturen für 15 Min. ohne Ligand (A-D) oder mit 20 nM SDF-1 (E-H) bei 37°C inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper an permeabilisierten Kulturen und mit konfokaler Mikroskopie. **I:** Schematische Übersicht über die durch Alanine ersetzten Serin- und Threonin-Reste der ST/A-Mutanten im CXCR7 C-Terminus. **J:** Internalisierungskinetik von rezeptorgebundenem ¹²⁵I-SDF-1. Rezeptortransfizierte Kulturen wurden bei 4°C mit ¹²⁵I-SDF-1 pulsmarkiert, gewaschen und direkt lysiert (Startwert) oder für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C inkubiert und vor der Lyse sauer gewaschen, um restliches oberflächengebundenes ¹²⁵I-SDF-1 zu entfernen. Die Daten der sauer gewaschenen Proben sind als Prozent des Startwerts angegeben. Die nicht internalisierende Mutante CXCR7-ΔCterm wurde als Negativkontrolle eingefügt. Die Reduktion von potentiellen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus führt zu einer langsameren Internalisierung von ¹²⁵I-SDF-1 durch den CXCR7-Rezeptor. *Statistik:* Vergleich von CXCR7-WT und ST/A-Mutanten mit 2way ANOVA. *Signifikanzlevel:* *: p≤0,05; **: p≤0,01; ***: p≤0,001.

dargestellt) und auch nach 15 Minuten war ein Großteil des Rezeptorproteins noch an der Zelloberfläche (Abb. 3.11B, F). Der wildtypische CXCR7-Rezeptor internalisiert dagegen schon in 5 Minuten nahezu vollständig und liegt bei 15 Minuten vollständig internalisiert vor (Abb. 3.11A, E). Nach 30 Minuten Inkubation ist dann aber auch das pulsmarkierte ST/A-Rezeptorprotein fast vollständig internalisiert und es ist kein eindeutiger Unterschied zu CXCR7-WT mehr zu erkennen. Die Stimulation mit SDF-1 scheint auf diesen Vorgang keinen Einfluss zu haben. Die SDF-1 behandelten Präparate (Abb. 3.11E-H) zeigen keine erkennbaren Unterschiede zu den unbehandelten Präparaten (Abb. 3.11A-D).

Deshalb konnte für die genauere Untersuchung und Quantifizierung der Unterschiede in der Internalisierungskinetik die Internalisierung von rezeptorgebundenem ¹²⁵I-SDF-1, wie bereits unter 3.8 beschrieben wurde, gemessen werden. Mit diesem Versuchsaufbau konnten die Erkenntnisse aus der Immuncytochemie bestätigt werden. Die ST/A-Mutante nimmt gebundenes ¹²⁵I-SDF-1 auf, dieser Vorgang ist aber deutlich langsamer als bei CXCR7-WT (Abb. 3.11J). Außerdem kann CXCR7-ST/A in 30 Minuten nur etwa ein Drittel des

gebundenen ^{125}I -SDF-1 aufnehmen, während CXCR7-WT in der gleichen Zeit mindesten drei Viertel des gebundenen ^{125}I -SDF-1 aufnimmt.

Um die veränderte Internalisierungskinetik von CXCR7-ST/A auf eine Phosphorylierungsstelle oder ein bestimmtes Serin-Threonin-Motiv zurückführen zu können, wurden noch zwei weitere ST/A-Mutanten erstellt und auf ihre Internalisierungskinetik hin untersucht. Bei jeder der beiden Mutanten war nur je ein Motiv aus drei der insgesamt acht Serin- und Threonin-Reste verändert (Abb. 3.11I). Die Abweichungen beider Mutanten von der Internalisierungskinetik von CXCR7-WT waren aber geringer als bei der ST/A-Mutante. In der Immunocytochemie sind sie nach 5 Minuten zwar noch nicht so stark internalisiert wie der Wildtyprezeptor, aber bereits nach 15 Minuten ist kaum mehr ein Unterschied zu CXCR7-WT zu sehen (Abb. 3.11C, D, G, H). Dies wird durch die Quantifizierung der ^{125}I -SDF-1 Internalisierung bestätigt. Bei den partiellen ST/A-Mutanten beginnt die Internalisierung von ^{125}I -SDF-1 langsamer, nach 15 Minuten ist der Unterschied zu CXCR7-WT aber nur noch gering. Außerdem vermitteln sie die Internalisierung von ^{125}I -SDF-1 deutlich schneller als CXCR7-ST/A. Diese Daten zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Internalisierungskinetik des CXCR7-Rezeptors von potenziellen C-terminalen Phosphorylierungsstellen. Diese sind allerdings nicht für die Rezeptorinternalisierung allein verantwortlich, sondern ermöglichen eher eine beschleunigte Internalisierung. Außerdem kann dieser Effekt nicht auf ein bestimmtes Serin-Threonin-Motiv zurückgeführt werden sondern bedarf vielmehr weitreichender Veränderungen.

4 Diskussion

Es ist noch nicht lange her, dass eindeutige Unterschiede in der Funktion von CXCR4 und CXCR7 festgestellt wurden. Beide Rezeptoren binden und internalisieren SDF-1, aber nur CXCR7 ist ein effizienter Scavenger (Balabanian et al., 2005; Burns et al., 2006; Boldajipour et al., 2008). Außerdem unterscheidet sich CXCR7 von CXCR4 dadurch, dass er keine Signale über heterotrimere G-Proteine vermittelt und Liganden-unabhängig internalisiert (Sierro et al, 2007; Levoye et al., 2009; Rajagopal et al., 2009; Luker et al, 2010; Naumann et al., 2010). Über die strukturellen Determinanten, welche diese verschiedenen Rezeptorfunktionen vermitteln, ist allerdings relativ wenig bekannt (Zabel et al., 2009; Gravel et al., 2010; Naumann et al., 2010; Canals et al., 2012; Ray et al., 2012). Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass die C-terminale Domäne viele wichtige Eigenschaften von CXCR7 beeinflusst. So entsteht durch die Übertragung der C-terminalen Domäne von CXCR4 auf den CXCR7-Rezeptor eine Rezeptorchimäre, die SDF-1-abhängig internalisiert und konstitutiv phosphoryliert wird, aber kaum Liganden-unabhängige Internalisierung aufweist. Außerdem beschleunigt der CXCR7 C-Terminus nicht nur die Rezeptor-abhängige Endocytose und Degradation von SDF-1 durch einen phosphorylierungs-abhängigen Prozess, sondern trägt auch zur Degradation des Rezeptorproteins selbst bei.

4.1.1 Die Spontane Internalisierung wird durch den CXCR7 C-Terminus reguliert und erfolgt über Clathrin-vermittelte Endocytose

Zu Beginn dieser Studie konnte durch verschiedene spezifische Endocytosehemmer deutlich gezeigt werden, dass CXCR7 über Clathrin-vermittelte Endocytose internalisiert wird und dass Caveolae in diesem Zusammenhang keine Rolle spielen. Diese Daten korrelieren mit anderen Studien, die deutliche Beeinträchtigungen der Rezeptorinternalisierung und SDF-1-Aufnahme durch die Blockierung der Clathrin-vermittelten Endocytose erzielen konnten (Luker et al., 2010; Ray et al., 2012).

Im Weiteren wurden der Prozess der CXCR7-Internalisierung und der Einfluss der C-terminalen Domäne auf die Liganden-unabhängige Rezeptorinternalisierung untersucht. Die Analyse von CXCR7, CXCR4 und den Tail swap-Mutanten ergab, dass der C-terminalen Domäne eine zentrale Rolle bei dieser spontanen Rezeptorinternalisierung zukommt. Durch den Austausch der C-terminalen Domäne des CXCR7-Rezeptors gegen die entsprechende Domäne des CXCR4-Rezeptors (CXCR7-4tail) wurde die spontane Internalisierung ausgelöscht. Umgekehrt konnte durch Einfügen des CXCR7 C-Terminus am CXCR4-

Rezeptor (CXCR4-7tail) spontane Internalisierung induziert werden. Welche Bedeutung die spontane Internalisierung für die Funktion von CXCR7 hat, ist dadurch aber noch nicht geklärt.

4.1.2 G-Protein und MAP-Kinase Aktivierung werden durch den CXCR7 C-Terminus reguliert

Einen Hinweis auf die Funktion von CXCR7 liefert die CXCR4-7tail Mutante. Bei dieser Mutante findet im Gegensatz zu CXCR4-WT keine G-Protein Kopplung statt und die Aufnahme und Degradation von SDF-1 ist beschleunigt. Die fehlende G-Protein Kopplung kann Erstens durch die geringe Verweildauer des Rezeptors an der Zelloberfläche ausgelöst werden, welche durch die konstitutive Internalisierung von Rezeptoren mit dem CXCR7 C-Terminus zustande kommt. Zweitens kann der Rezeptor aufgrund seiner Konformation oder durch spezielle intrazelluläre Modifikationen von der Kopplung an G-Proteine abgehalten werden. Auf beschleunigter Aufnahme und Degradation von SDF-1 basiert die Scavenger-Funktion von CXCR7. Da diese Eigenschaften auch bei CXCR4-7tail auftreten, sind sie der C-terminalen Domäne von CXCR7 zuzuschreiben. Aufgrund dieser Tatsachen kann man annehmen, dass bei CXCR7 die Scavenger-Funktion im Vordergrund steht und dass die G-Protein Kopplung vernachlässigt wird.

Der Annahme, dass CXCR7 durch seine geringe Verweildauer an der Zelloberfläche nicht an G-Proteine koppeln kann, widersprechen die Erkenntnisse über die CXCR7-4tail Mutante. Der CXCR4 C-Terminus verhindert bei dieser Mutante nicht nur die spontane Internalisierung, sondern auch die schnelle Aufnahme und den damit verbundenen Abbau von SDF-1. Trotzdem ermöglicht der CXCR4 C-Terminus dem CXCR7-Rezeptor keine G-Protein Kopplung. Die G-Protein Kopplung wird demnach nicht durch eine geringe Verweildauer an der Zelloberfläche verhindert.

Neben dem C-Terminus ist bei klassischen Chemokinrezeptoren auch die zweite cytosolische Rezeptordomäne und insbesondere das darin enthaltene DRYLAIV-Motiv für die G-Protein Kopplung entscheidend (Thelen und Thelen, 2008). Bei CXCR7 ist dieses Motiv verändert (DRYLSIT). Um den Einfluss der zweiten cytosolischen Domäne auf die G-Protein Kopplung von CXCR7 zu untersuchen, wurde auch diese Domäne von CXCR7-WT und CXCR7-4tail durch die entsprechende CXCR4-Domäne vertauscht und die daraus resultierenden Rezeptormutanten wurden ebenfalls auf G-Protein Kopplung hin untersucht. Auch bei diesen Mutanten konnte keine Aktivierung von G-Proteinen nachgewiesen werden. Die fehlende G-Protein Kopplung von CXCR7-4tail und CXCR7-2cD4-4tail muss demnach über die

Rezeptorkonformation bzw. spezielle intrazelluläre Modifikationen erklärt werden, die von der Basis des CXCR7-Rezeptors ausgelöst werden. Für CXCR7-4tail konnte die konstitutive Phosphorylierung der C-terminalen Domäne gezeigt werden. Durch dieses Ergebnis liegt es nahe, dass CXCR7 durch konstitutive, intrazelluläre Phosphorylierung dauerhaft desensibilisiert ist und die Kopplung an G-Proteine aus diesem Grund nicht möglich ist.

Neben der Aktivierung von G-Proteinen gibt es noch einen weiteren Signaltransduktionsweg, über den intrazelluläre Signalkaskaden bei GPCRs aktiviert werden können. Dieser wird über β -Arrestine vermittelt, die bis vor Kurzem nur durch ihre Rolle bei der Endocytose bekannt waren (Gurevich und Gurevich, 2006). Für CXCR7 wurde diese Art der Signalübertragung bereits mehrfach im Zusammenhang mit der Aktivierung von MAP-Kinasen untersucht (Rajagopal et al., 2010; Decaillet et al., 2011; Canals et al., 2012; Ray et al., 2012). Alle diese Studien zeigen in der Zelllinie HEK293 eine Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2, die in Zusammenhang mit der Rekrutierung von β -Arrestin 2 steht. Die HEK293-Zelllinie exprimiert signifikante Mengen endogenen CXCR4-Rezeptor. In der vorliegenden Studie wurde an naiven HEK293-Kulturen SDF-1-induzierte, CXCR4-spezifische Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen. In den anderen Studien wurde der Einfluss von endogenem CXCR4 nicht untersucht und auch nicht ausgeschlossen. Die Aussagekraft der Studien bezüglich CXCR7-spezifischer MAPK-Aktivierung ist deshalb anzuzweifeln. Für die weiteren Untersuchungen zur MAPK-Aktivierung wurden deshalb CHO-K1 Zellen verwendet, die untransfiziert keine ERK1/2-Phosphorylierung nach Stimulation mit SDF-1 zeigen. An CXCR4-WT transfizierten CHO-Kulturen konnte eine durch SDF-1 Stimulation induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass es sich dabei um einen $G\alpha_i$ -vermittelten Effekt handelt. An CXCR7-WT und CXCR7-4tail transfizierten CHO-Kulturen fand unter den gegebenen Versuchsbedingungen aber keine SDF-1-vermittelte MAPK-Aktivierung statt. Demnach findet durch den CXCR7-Rezeptor weder über G-Proteine, noch über den alternativen, β -Arrestin 2-abhängigen Signaltransduktionsweg eine MAPK-Aktivierung statt.

4.1.3 Die C-terminale Domäne von CXCR7 beeinflusst die Rezeptorstabilität

Immunoblotanalysen von rezeptortransfizierten Kulturen zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Expressionsspiegeln der unterschiedlichen Wildtyp- und Tail swap-Rezeptoren, die Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation des Rezeptorproteinspiegels von CXCR7 und CXCR4 liefern. Die Signale der Kulturen mit Rezeptoren, die den CXCR7 C-Terminus tragen, waren dabei mindestens um das Fünffache geringer als die Signale der entsprechenden

Rezeptoren mit dem CXCR4 C-Terminus. Eine Ursache für diese Expressionsunterschiede wurde bei der Betrachtung der basalen Rezeptordegradation aufgedeckt. Wird die Proteinsynthese durch Cycloheximidbehandlung blockiert, so zeigen CXCR7-WT und CXCR4-7tail einen beschleunigten Abbau des exprimierten Rezeptorproteins. Die Expression der Rezeptoren mit der CXCR4 C-terminalen Domäne ist dagegen deutlich stabiler. Der CXCR7 C-Terminus beschleunigt also nicht nur die Liganden-unabhängige Internalisierung, sondern auch den Abbau von Rezeptorprotein. Folgerichtig ist davon auszugehen, dass der endogen exprimierte CXCR7-Rezeptor im Gewebe durch Mechanismen wie Transkriptionskontrolle und Rezeptorrecycling kontrolliert wird, um die Gesamtexpression von CXCR7 im Gleichgewicht zu halten (Luker et al., 2010; Naumann et al., 2010; Canals et al., 2012).

Weitere Analysen der Expressionsspiegel der transient transfizierten Rezeptoren verdeutlichen den Einfluss von SDF-1 auf die Rezeptorexpression. Durch die Langzeitbehandlung mit SDF-1 entstehen deutliche Unterschiede zwischen den Proteinspiegeln von CXCR7 und CXCR4. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus anderen Studien (Boldajipour et al., 2008; Naumann et al., 2010; Sanchez-Alcaniz et al., 2011) wurde CXCR4-WT durch die Behandlung mit SDF-1 deutlich abgebaut. Die Expressionsspiegel von CXCR7-WT und beiden Tail swap-Mutanten wurden dagegen nicht von SDF-1 beeinflusst. Demzufolge funktioniert bei CXCR7 und CXCR4 die Regulation der Gesamtrezeptorexpression deutlich verschieden. Der CXCR7 C-Terminus beschleunigt den basalen Abbau von Rezeptorprotein, während CXCR4 keinem basalen Abbau unterliegt und nur durch Stimulation mit SDF-1 abgebaut wird. Mehr Gemeinsamkeiten hat CXCR7 dagegen mit CXCR3, einem weiteren nahe verwandten Chemokinrezeptor, der den Liganden ITAC mit CXCR7 teilt. CXCR3 wird ebenfalls Liganden-unabhängig internalisiert und die Aufrechterhaltung des Expressionsspiegels erfolgt über mRNA-Transkription und de novo Rezeptorsynthese (Meiser et al., 2008). Es ist davon auszugehen, dass der CXCR7-Expressionsspiegel ebenfalls über de novo Rezeptorsynthese aufrechterhalten wird. Darüber hinaus bleibt vermutlich ein Teil des Rezeptorproteins durch Recycling-Prozesse erhalten, da die Geschwindigkeit der Rezeptordegradation langsamer als die Rezeptorinternalisierung ist.

4.1.4 Schnelle Internalisierung und Degradation von SDF-1 werden durch die C-terminale Domäne vermittelt

Nicht nur die Rezeptorinternalisierung von CXCR7 ist besonders schnell, sondern auch die CXCR7-vermittelte Endocytose von SDF-1. Experimente mit radioaktiv markiertem SDF-1, bei denen entweder eine Pulsmarkierung von Oberflächenrezeptoren vorgenommen oder eine dauerhafte Inkubation mit SDF-1 durchgeführt wurde, zeigen deutlich den Einfluss der C-terminalen Domäne auf die Aufnahme und den Abbau von SDF-1. Rezeptoren, die den CXCR7 C-Terminus tragen, sind affiner für SDF-1 und internalisieren es viel schneller als die entsprechenden Rezeptoren mit der C-terminalen Domäne von CXCR4. Diese Erkenntnis korreliert mit den Ergebnissen von Zabel und Kollegen aus dem Jahr 2009, wo CXCR7 mit der verkürzten Mutante CXCR7 Δ C-term verglichen wird. Die Ergebnisse führen zu der Aussage, dass die C-terminale Domäne die Affinität für SDF-1 erhöht und für die Internalisierung essentiell ist (vgl. Abb. 3.11).

Durch die effiziente Endocytose von SDF-1, die zusammen mit der durch SDF-1 beschleunigten Rezeptorinternalisierung auftritt, ist auch die Degradation von SDF-1 durch CXCR7-WT und CXCR4-7tail deutlich stärker. Bei diesem Prozess spielt auch die Rezeptorstabilität eine wichtige Rolle. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen, waren die Rezeptoren mit dem CXCR4 C-Terminus deutlich stärker exprimiert. Dies erklärt, warum CXCR4-WT und CXCR7-4tail nennenswerte Mengen SDF-1 akkumulieren konnten, obwohl sie SDF-1 weniger affin binden und deutlich langsamer internalisieren. Bei physiologischen Bedingungen würde man von ähnlichen Expressionsspiegeln ausgehen. Berücksichtigt man darüber hinaus das Fließgleichgewicht von CXCR7 und die CXCR4-Abnahme nach Langzeitbehandlung mit SDF-1, so ist es absehbar, dass CXCR7 unter physiologischen Bedingungen der effizientere SDF-1-Scavenger ist. Als Konsequenz dieser Scavenger-Funktion verhindert CXCR7 die durch SDF-1 induzierte Degradation von CXCR4 und balanciert auf diese Weise die SDF-1/CXCR4-Signalwege in der Ontogenese (Sanchez-Alcaniz et al., 2011). Unter den pathologischen Bedingungen einer Multiplen Sklerose verhindert die Scavenger-Funktion des in den Läsionen exprimierten CXCR7 dagegen die Rekrutierung von Leukocyten (Cruz-Orengo et al., 2011).

4.1.5 Strukturelle Determinanten im CXCR7 C-Terminus regulieren die Rezeptorinternalisierung

In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass viele der wichtigen Funktionen von CXCR7 auf die C-terminale Domäne zurückzuführen sind. Es ist jedoch immer noch offen, welche strukturellen Determinanten im C-Terminus diese Funktionen kodieren. Vorhersagen für die Sekundärstruktur von CXCR7 (Jones, 1999; Bryson et al., 2005) weisen auf eine C-terminale Helix VIII kurz hinter dem konservierten NPxxY-Motiv am Ende von Transmembranhelix VII hin, wie sie in vielen Klasse A GPCRs auftritt. Der CXCR4-Rezeptor hat keine solche Helix VIII, wie vor Kurzem überraschend durch die Aufklärung der CXCR4-Kristallstruktur gezeigt wurde (Wu et al., 2010). Dieser Unterschied war Anlass für zwei weitere Mutanten, bei denen die Helix VIII-kodierende Sequenz von CXCR7 deletiert bzw. durch den nicht helikalen Bereich von CXCR4 ersetzt wurde. Mit diesen Mutanten sollte untersucht werden, ob dieser Bereich der putativen Helix VIII eine veränderte Rezeptorinternalisierung aufweist. Es wurden keine Hinweise auf eine deutlich veränderte Internalisierung von CXCR7 gefunden. Daraufhin wurde im restlichen C-Terminus, den letzten 24 C-terminalen Aminosäuren des CXCR7-Rezeptors nach weiteren bekannten Motiven gesucht, die Einfluss auf die Internalisierung haben könnten.

Im CXCR3-Rezeptor ist am äußersten C-Terminus ein YXXL-Motiv enthalten, das die spontane Internalisierung dieses Rezeptors vermittelt (Meiser et al., 2008). Diese Art von Motiv dient auch in vielen anderen Transmembranrezeptoren als Signal für endosomale und lysosomale Zielführung (Bonifacino und Traub, 2003). Die CXCR7-Aminosäuresequenz enthält ebenfalls ein YXXL-Motiv (YSAL), das neun Aminosäuren vor dem C-terminalen Ende beginnt. Das Übertragen dieses Motivs auf den CXCR4-Rezeptor in der CXCR4-7(C9) Mutante induzierte aber keine Liganden-unabhängige Internalisierung von CXCR4. Des Weiteren konnte durch Untersuchung der CXCR7-Y/A Mutante generell ausgeschlossen werden, dass ein Tyrosin-basiertes Motiv für die spontane Internalisierung von CXCR7 notwendig ist.

Neben Tyrosinen sind Serine und Threonine als potentielle Phosphorylierungsstellen wichtige Aminosäurereste der C-terminalen Rezeptordomäne. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch aller Serine und Threonine im CXCR7 C-Terminus eine deutlich verlangsamte Internalisierung und SDF-1 Aufnahme bewirkt. Diese interessante Erkenntnis erlaubt erstmals detaillierte Rückschlüsse auf den C-terminalen Mechanismus, der die Internalisierung von CXCR7 und SDF-1 reguliert.

Die Tatsache, dass der Verlust von potentiellen Phosphorylierungsstellen starke Auswirkungen auf die spontane und Liganden-abhängige Rezeptorinternalisierung und auf die SDF-1-Aufnahme hat, weist auf einen Mechanismus hin, der auf verschiedenen Proteinkinase-vermittelten Phosphorylierungen der C-terminalen CXCR7-Domäne beruht. Dabei scheint CXCR7 konstitutiver Phosphorylierung zu unterliegen, welche die schnelle spontane Internalisierung von CXCR7 ermöglicht. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits für einen weiteren Chemokinrezeptor, den atypischen Scavenging-Rezeptor D6 berichtet, der an einem bestimmten Serin-Cluster konstitutiv phosphoryliert wird (McCulloch et al., 2008). Dadurch erhöht sich die Stabilität des D6-Rezeptors, es findet inertes Rezeptortrafficking statt und β -Arrestin wird an den D6-Rezeptor rekrutiert. Auch bei CXCR7 könnte die konstitutive Phosphorylierung zur basalen Rekrutierung von β -Arrestin führen, von der bereits berichtet wurde (Rajagopal et al., 2010; Decaillet et al., 2011; Canals et al., 2012; Ray et al., 2012). Diese Annahme wird durch die Ergebnisse bestärkt, dass der CXCR4 C-Terminus starker konstitutiver Phosphorylierung unterliegt, wenn er mit dem CXCR7-Rezeptor fusioniert wurde (CXCR7-4tail). Von Gravel et al. wurde 2010 bereits gezeigt, dass an eine vergleichbare Mutante konstitutiv β -Arrestin 2 rekrutiert wird. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die CXCR7-Basis zu einer Konformation neigt, die konstitutive C-terminale Phosphorylierung begünstigt und dadurch die Rekrutierung von β -Arrestin 2 initiiert.

Durch die Stimulation mit Ligand treten verstärkte C-terminale Phosphorylierung und beschleunigte Internalisierung von CXCR7 auf, mit denen schnelle Aufnahme und Degradation von SDF-1 einhergehen. Durch SDF-1 findet demnach eine Veränderung im CXCR7-Rezeptor statt, welche den C-Terminus für weitere Proteinkinasen zugänglich macht. Durch die Kinasen können weitere Phosphorylierungen an Serin- und/oder Threoninresten initiiert werden, die dann Prozesse in Gang setzen können, welche die Rezeptorinternalisierung beschleunigen. An diesen Prozessen könnte ebenfalls β -Arrestin 2 beteiligt sein, da eine verstärkte Rekrutierung von β -Arrestin 2 nach SDF-1 Behandlung, die mit schneller CXCR7-Internalisierung einhergeht, bereits beschrieben wurde (Canals et al., 2012; Ray et al., 2012). Von einer SDF-1-induzierten Signaltransduktion über CXCR7 und einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, kann, wie bereits unter 4.1.2 diskutiert, aber eher nicht ausgegangen werden.

Überraschenderweise konnten die essentiellen Phosphorylierungsstellen, die für die beschleunigte Internalisierung von CXCR7 verantwortlich sind, nicht auf ein bestimmtes Cluster aus Serin- und Threoninresten im distalen oder proximalen C-Terminus eingegrenzt

werden. Beide Mutanten mit partiell eliminierten Phosphorylierungsstellen wiesen nur eine leichte Beeinträchtigung der Internalisierung auf, die nicht im Vergleich zur Mutante mit vollständig eliminierten Phosphorylierungsstellen steht. Dies legt die Vermutung nahe, dass mehrere Phosphorylierungsstellen zur schnellen CXCR7-Internalisierung beitragen und dass sie kein spezielles Motiv bilden, sondern über den C-Terminus verteilt vorliegen. Für eine korrekte Rezeptorfunktion muss deshalb der gesamte CXCR7 C-Terminus unverändert vorliegen. Diese Hypothese wird durch die aktuellen Erkenntnisse von Ray und Kollegen (2012) unterstützt, deren Studie die Auswirkungen von Deletionen am CXCR7 C-Terminus untersucht. Sie beschreiben, wie die schrittweise Verkürzung des C-Terminus zu reduzierter Internalisierung, β -Arrestin Rekrutierung und Scavenger-Aktivität von CXCR7 führt. Dabei korreliert die fortschreitende Deletion mit der in dieser Studie gezeigten, fortschreitenden Elimination von Phosphorylierungsstellen. Je mehr Aminosäuren und potentielle Phosphorylierungsstellen entfernt werden, desto stärker wird die korrekte Funktion von CXCR7 beeinträchtigt.

5. Schlussfolgerungen

In der durchgeführten Studie konnten viele Erkenntnisse über die Funktion und Regulation des Chemokinrezeptors CXCR7 gewonnen werden. Dabei stellte sich heraus, dass die C-terminale Domäne einen sehr starken regulatorischen Einfluss auf den Rezeptor hat und für eine korrekte Rezeptorfunktion essentiell ist. Der C-Terminus ermöglicht die konstitutive Internalisierung des CXCR7-Rezeptors, der über Clathrin-vermittelte Endocytose ins Zellinnere geschleust wird. Ein Großteil des internalisierten Rezeptorproteins wird dort dem Abbau zugeführt. Der Aufrechterhaltung des Gesamtexpressionsspiegels dienen de novo Synthese und Rezeptorrecycling, durch die ein Fließgleichgewicht entsteht. Der CXCR7-Expressionsspiegel unterliegt auf diese Weise einer strikten Kontrolle. Die CXCR7-Degradation wird ebenfalls durch die C-terminale Domäne vermittelt und ist unabhängig von der Ligandenbindung. Eine CXCR7-vermittelte Signaltransduktion durch Stimulation mit SDF-1, die entweder über G-Proteine oder über alternative Mechanismen verläuft und zu einer Calcium-Antwort oder MAPK-Aktivierung führen könnte, konnte in dieser Studie nicht gezeigt werden. Vielmehr verhindert der CXCR7 C-Terminus die G-Protein Kopplung und MAPK-Aktivierung, da er konstitutiv phosphoryliert vorliegt und der Rezeptor so desensibilisiert ist. Die C-terminale Rezeptorphosphorylierung wird dabei durch die Konformation der Rezeptorbasis vermittelt und kann durch Ligandenbindung moduliert werden. Es konnte ausgeschlossen werden, dass das veränderte DRYLAIV-Motiv in der zweiten cytosolischen Domäne von CXCR7 die G-Protein Kopplung unterbindet. Auch in anderen Studien wird CXCR7 nicht als klassischer G-Protein-gekoppelter Rezeptor beschrieben, sondern ist hauptsächlich als Scavenger bekannt. Er bindet SDF-1 hochaffin, internalisiert es besonders schnell und führt es in großen Mengen dem lysosomalen Abbau zu. Die C-terminale Domäne hat großen Einfluss auf diesen Prozess. Diese Studie zeigt, dass CXCR7 erst durch sie zum effektiven Scavenger wird. Diese Rezeptorfunktion wird vermutlich durch eine verstärkte Phosphorylierung C-terminaler Serin- und/oder Threoninreste ermöglicht, die durch die Bindung von SDF-1 und CXCR7 initiiert wird. Dabei kommt es weniger auf ein konkretes Serin-/Threonin-Motiv an, sondern es muss eine Vielzahl dieser Phosphorylierungsstellen am C-Terminus vorliegen, um eine uneingeschränkte Rezeptorinternalisierung und die damit verbundene Scavenging-Funktion von CXCR7 zu ermöglichen. Der genaue Mechanismus der CXCR7-Phosphorylierung an C-terminalen Serin- und/oder Threoninresten muss in Zukunft aber noch genauer untersucht werden, um seinen genauen Einfluss auf die CXCR7-Funktionen zu charakterisieren.

6 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. 1997. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*, 185 (1):111-120.
- Autelitano DJ. 1998. Cardiac expression of genes encoding putative adrenomedullin/calcitonin gene-related peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 250 (3):689-693.
- Bacon KB, Harrison JK. 2000. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J Neuroimmunol*, 104 (1):92-97.
- Bagri A, Gurney T, He X, Zou YR, Littman DR, Tessier-Lavigne M, Pleasure SJ. 2002. The chemokine SDF1 regulates migration of dentate granule cells. *Development*, 129 (18):4249-4260.
- Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G. 2001. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol*, 22 (3):147-184.
- Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Piccioli P, Costa A, Florio T, Schettini G. 1999. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J Neurochem*, 73 (6):2348-2357.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 280 (42):35760-35766.
- Barker BL, Benovic JL. G protein-coupled receptor kinase 5 phosphorylation of hip regulates internalization of the chemokine receptor CXCR4. *Biochemistry*, 50 (32):6933-6941.
- Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, Wilson D, Xu Q, Raz E. 2008. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*, 132 (3):463-473.
- Bonavia R, Bajetto A, Barbero S, Pirani P, Florio T, Schettini G. 2003. Chemokines and their receptors in the CNS: expression of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 and their role in astrocyte proliferation. *Toxicol Lett*, 139 (2-3):181-189.
- Bonifacino JS, Traub LM. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, 72:395-447.
- Boudot A, Kerdivel G, Habauzit D, Eeckhoutte J, Le Dily F, Flouriot G, Samson M, Pakdel F. Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells. *PLoS One*, 6 (6):e20898.
- Bryson K, McGuffin LJ, Marsden RL, Ward JJ, Sodhi JS, Jones DT. 2005. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res*, 33 (Web Server issue):W36-38.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, 203 (9):2201-2213.
- Canals M, Scholten DJ, de Munnik S, Han MK, Smit MJ, Leurs R. Ubiquitination of CXCR7 Controls Receptor Trafficking. *PLoS One*, 7 (3):e34192.

- Claing A, Laporte SA, Caron MG, Lefkowitz RJ. 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol*, 66 (2):61-79.
- Clore GM, Gronenborn AM. 1995. Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines. *Faseb J*, 9 (1):57-62.
- Conklin BR, Farfel Z, Lustig KD, Julius D, Bourne HR. 1993. Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature*, 363 (6426):274-276.
- Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I. 1997. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *Embo J*, 16 (23):6996-7007.
- Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, McCandless EE, Patel JR, Luker GD, Littman DR, Russell JH, Klein RS. 2011. CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J Exp Med*, 208 (2):327-339.
- Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E, Peled A. 2004. Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *Faseb J*, 18 (11):1240-1242.
- David NB, Sapede D, Saint-Etienne L, Thisse C, Thisse B, Dambly-Chaudiere C, Rosa FM, Ghysen A. 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (25):16297-16302.
- De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, Zhang HH, Fales H, Tosato G. 2004. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood*, 103 (7):2452-2459.
- Decaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem*, 286 (37):32188-32197.
- Delom F, Fessart D. Role of Phosphorylation in the Control of Clathrin-Mediated Internalization of GPCR. *Int J Cell Biol*, 2011:246954.
- Devine SM, Flomenberg N, Vesole DH, Liesveld J, Weisdorf D, Badel K, Calandra G, DiPersio JF. 2004. Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 22 (6):1095-1102.
- Epstein RJ. 2004. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nat Rev Cancer*, 4 (11):901-909.
- Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG. 1996. G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol*, 74 (10):1095-1110.
- Fischer T, Nagel F, Jacobs S, Stumm R, Schulz S. 2008. Reassessment of CXCR4 chemokine receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-2. *PLoS One*, 3 (12):e4069.
- Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG, Lefkowitz RJ. 1995. Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 270 (30):17953-17961.
- Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groopman JE. 1998. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane

- G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem*, 273 (36):23169-23175.
- Gerrits H, van Ingen Schenau DS, Bakker NE, van Disseldorp AJ, Strik A, Hermens LS, Koenen TB, Krajnc-Franken MA, Gossen JA. 2008. Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis*, 46 (5):235-245.
- Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, Bosse F, Greiner-Petter R, Auer J, Muller HW. 2000. Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci*, 12 (6):1857-1866.
- Gravel S, Malouf C, Boulais PE, Berchiche YA, Oishi S, Fujii N, Leduc R, Sinnett D, Heveker N. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *J Biol Chem*, 285 (49):37939-37943.
- Guo Y, Hangoc G, Bian H, Pelus LM, Broxmeyer HE. 2005. SDF-1/CXCL12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, 23 (9):1324-1332.
- Gurevich VV, Gurevich EV. 2006. The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 110 (3):465-502.
- Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, Ali H, Snyderman R. 1997. Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem*, 272 (45):28726-28731.
- Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, Nagler A, Lapidot T, Thelen M, Alon R. 2008. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol*, 84 (4):1130-1140.
- Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, Mentlein R. 2010. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res*, 70 (8):3299-3308.
- Heesen M, Berman MA, Charest A, Housman D, Gerard C, Dorf ME. 1998. Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1. *Immunogenetics*, 47 (5):364-370.
- Holmes WD, Conslor TG, Dallas WS, Rocque WJ, Willard DH. 2001. Solution studies of recombinant human stromal-cell-derived factor-1. *Protein Expr Purif*, 21 (3):367-377.
- Horuk R. 2001. Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 12 (4):313-335.
- Infantino S, Moepps B, Thelen M. 2006. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol*, 176 (4):2197-2207.
- Jones DT. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*, 292 (2):195-202.
- Jones SW, Brockbank SM, Mobbs ML, Le Good NJ, Soma-Haddrick S, Heuze AJ, Langham CJ, Timms D, Newham P, Needham MR. 2006. The orphan G-protein coupled receptor RDC1: evidence for a role in chondrocyte hypertrophy and articular cartilage matrix turnover. *Osteoarthritis Cartilage*, 14 (6):597-608.
- Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. 2009. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol*, 75 (5):1240-1247.

- Kim CH, Broxmeyer HE. 1998. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood*, 91 (1):100-110.
- Kleemann P, Papa D, Vigil-Cruz S, Seifert R. 2008. Functional reconstitution of the human chemokine receptor CXCR4 with G(i)/G(o)-proteins in Sf9 insect cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 378 (3):261-274.
- Klein RS, Williams KC, Alvarez-Hernandez X, Westmoreland S, Force T, Lackner AA, Luster AD. 1999. Chemokine receptor expression and signaling in macaque and human fetal neurons and astrocytes: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J Immunol*, 163 (3):1636-1646.
- Kortesidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. 2005. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood*, 105 (10):3793-3801.
- Kozak SL, Heard JM, Kabat D. 2002. Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol*, 76 (4):1802-1815.
- Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ratajczak MZ. 2005. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*, 23 (7):879-894.
- Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wysoczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ. 2004. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol*, 35 (3):233-245.
- Lapidot T, Petit I. 2002. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*, 30 (9):973-981.
- Lapidot T, Dar A, Kollet O. 2005. How do stem cells find their way home? *Blood*, 106 (6):1901-1910.
- Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M. 2003. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia*, 42 (2):139-148.
- Lazarini F, Casanova P, Tham TN, De Clercq E, Arenzana-Seisdedos F, Baleux F, Dubois-Dalcq M. 2000. Differential signalling of the chemokine receptor CXCR4 by stromal cell-derived factor 1 and the HIV glycoprotein in rat neurons and astrocytes. *Eur J Neurosci*, 12 (1):117-125.
- Lefkowitz RJ, Shenoy SK. 2005. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308 (5721):512-517.
- Levoe A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113 (24):6085-6093.
- Libert F, Parmentier M, Maenhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. 1990. Molecular cloning of a dog thyrotropin (TSH) receptor variant. *Mol Cell Endocrinol*, 68 (1):R15-17.
- Liu FY, Zhao ZJ, Li P, Ding X, Guo N, Yang LL, Zong ZH, Sun CF. NF-kappaB participates in chemokine receptor 7-mediated cell survival in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Rep*, 25 (2):383-391.
- Liu Z, Geng L, Li R, He X, Zheng JQ, Xie Z. 2003. Frequency modulation of synchronized Ca²⁺ spikes in cultured hippocampal networks through G-protein-coupled receptors. *J Neurosci*, 23 (10):4156-4163.

- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. 2001. *Molekulare Zellbiologie*. Vierte Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin; ISBN 3-8274-1077-0
- Luker KE, Luker GD. 2006. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett*, 238 (1):30-41.
- Luker KE, Gupta M, Steele JM, Foerster BR, Luker GD. 2009. Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia*, 11 (10):1022-1035.
- Luker KE, Steele JM, Mihalko LA, Ray P, Luker GD. 2010. Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene*, 29 (32):4599-4610.
- Luttrell LM. 2008. Reviews in molecular biology and biotechnology: transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Mol Biotechnol*, 39 (3):239-264.
- Lysko DE, Putt M, Golden JA. SDF1 regulates leading process branching and speed of migrating interneurons. *J Neurosci*, 31 (5):1739-1745.
- Ma Q, Jones D, Springer TA. 1999. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity*, 10 (4):463-471.
- Martinez A, Kapas S, Miller MJ, Ward Y, Cuttitta F. 2000. Coexpression of receptors for adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide, and amylin in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*, 141 (1):406-411.
- McCulloch CV, Morrow V, Milasta S, Comerford I, Milligan G, Graham GJ, Isaacs NW, Nibbs RJ. 2008. Multiple roles for the C-terminal tail of the chemokine scavenger D6. *J Biol Chem*, 283 (12):7972-7982.
- Meiser A, Mueller A, Wise EL, McDonagh EM, Petit SJ, Saran N, Clark PC, Williams TJ, Pease JE. 2008. The chemokine receptor CXCR3 is degraded following internalization and is replenished at the cell surface by de novo synthesis of receptor. *J Immunol*, 180 (10):6713-6724.
- Mestek A, Hurley JH, Bye LS, Campbell AD, Chen Y, Tian M, Liu J, Schulman H, Yu L. 1995. The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein kinase and protein kinase C. *J Neurosci*, 15 (3 Pt 2):2396-2406.
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ. 2007. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (40):15735-15740.
- Mody SM, Ho MK, Joshi SA, Wong YH. 2000. Incorporation of Galpha(z)-specific sequence at the carboxyl terminus increases the promiscuity of galpha(16) toward G(i)-coupled receptors. *Mol Pharmacol*, 57 (1):13-23.
- Moepps B, Frodl R, Rodewald HR, Baggiolini M, Gierschik P. 1997. Two murine homologues of the human chemokine receptor CXCR4 mediating stromal cell-derived factor 1alpha activation of Gi2 are differentially expressed in vivo. *Eur J Immunol*, 27 (8):2102-2112.
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*, 25 (2):75-84.
- Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410 (6824):50-56.

- Murphy JW, Cho Y, Sachpatzidis A, Fan C, Hodsdon ME, Lolis E. 2007. Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin. *J Biol Chem*, 282 (13):10018-10027.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 52 (1):145-176.
- Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. 1994. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (6):2305-2309.
- Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. 1998. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin Immunol*, 10 (3):179-185.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382 (6592):635-638.
- Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M. 2010. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 5 (2):e9175.
- Neote K, DiGregorio D, Mak JY, Horuk R, Schall TJ. 1993. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell*, 72 (3):415-425.
- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. 2006. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, 5 (12):993-996.
- Papayannopoulou T. 2004. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*, 103 (5):1580-1585.
- Pelus LM, Fukuda S. 2008. Chemokine-mobilized adult stem cells; defining a better hematopoietic graft. *Leukemia*, 22 (3):466-473.
- Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, Bouvier M, Heveker N. 2005. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem*, 280 (11):9895-9903.
- Popik W, Pitha PM. 1998. Early activation of mitogen-activated protein kinase kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun N-terminal kinase in response to binding of simian immunodeficiency virus to Jurkat T cells expressing CCR5 receptor. *Virology*, 252 (1):210-217.
- Qiu Y, Zhu J, Bandi V, Atmar RL, Hattotuwa K, Guntupalli KK, Jeffery PK. 2003. Biopsy neutrophilia, neutrophil chemokine and receptor gene expression in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 168 (8):968-975.
- Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, Lefkowitz RJ. 2009. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2):628-632.
- Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, Lefkowitz RJ. 2010. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2):628-632.
- Ray P, Mihalko LA, Coggins NL, Moudgil P, Ehrlich A, Luker KE, Luker GD. 2011. Carboxy-terminus of CXCR7 regulates receptor localization and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 44 (4):669-678.

- Sanchez-Alcaniz JA, Haeger S, Mueller W, Pla R, Mackay F, Schulz S, Lopez-Bendito G, Stumm R, Marin O. 2011. Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron*, 69 (1):77-90.
- Schier AF. 2003. Chemokine signaling: rules of attraction. *Curr Biol*, 13 (5):R192-194.
- Schols D, Struyf S, Van Damme J, Este JA, Henson G, De Clercq E. 1997. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J Exp Med*, 186 (8):1383-1388.
- Schonemeier B, Kolodziej A, Schulz S, Jacobs S, Hoell V, Stumm R. 2008. Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *J Comp Neurol*, 510 (2):207-220.
- Schutysse E, Su Y, Yu Y, Gouwy M, Zaja-Milatovic S, Van Damme J, Richmond A. 2007. Hypoxia enhances CXCR4 expression in human microvascular endothelial cells and human melanoma cells. *Eur Cytokine Netw*, 18 (2):59-70.
- Shimizu N, Soda Y, Kanbe K, Liu HY, Mukai R, Kitamura T, Hoshino H. 2000. A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol*, 74 (2):619-626.
- Shimizu S, Brown M, Sengupta R, Penfold ME, Meucci O. 2011. CXCR7 protein expression in human adult brain and differentiated neurons. *PLoS One*, 6 (5):e20680.
- Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. 1995. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, 28 (3):495-500.
- Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, Woehl B, Leung H, Groom J, Batten M, Harvey RP, Martinez AC, Mackay CR, Mackay F. 2007. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (37):14759-14764.
- Smit M, Lira SA, Leurs R. 2011. *Chemokine Receptors as Drug Targets*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; ISBN: 978-3-527-32118-6
- Sotsios Y, Whittaker GC, Westwick J, Ward SG. 1999. The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol*, 163 (11):5954-5963.
- Stumm RK, Zhou C, Ara T, Lazarini F, Dubois-Dalcq M, Nagasawa T, Hoell V, Schulz S. 2003. CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex. *J Neurosci*, 23 (12):5123-5130.
- Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, Taichman RS, Pienta KJ, Wang J. 2010. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, 29 (4):709-722.
- Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. 1993. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, 261 (5121):600-603.
- Thelen M, Thelen S. 2008. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol*, 198 (1-2):9-13.
- Triantafyllou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafyllou K. 2002. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci*, 115 (Pt 12):2603-2611.
- von Zastrow M, Kobilka BK. 1994. Antagonist-dependent and -independent steps in the mechanism of adrenergic receptor internalization. *J Biol Chem*, 269 (28):18448-18452.

- Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS. 2008. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*, 283 (7):4283-4294.
- Wang Y, Li G, Stanco A, Long JE, Crawford D, Potter GB, Pleasure SJ, Behrens T, Rubenstein JL. 2011. CXCR4 and CXCR7 Have Distinct Functions in Regulating Interneuron Migration. *Neuron*, 69 (1):61-76.
- Watanabe K, Penfold ME, Matsuda A, Ohyanagi N, Kaneko K, Miyabe Y, Matsumoto K, Schall TJ, Miyasaka N, Nanki T. 2010. Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 62 (11):3211-3220.
- Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. 2003. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (19):10782-10787.
- White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, Widdowson K, Foley JJ, Martin LD, Griswold DE, Sarau HM. 1998. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem*, 273 (17):10095-10098.
- Wise A, Gearing K, Rees S. 2002. Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today*, 7 (4):235-246.
- Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC. 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 330 (6007):1066-1071.
- Zabel BA, Lewen S, Berahovich RD, Jaen JC, Schall TJ. 2011. The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Mol Cancer*, 10:73.
- Zabel BA, Wang Y, Lewen S, Berahovich RD, Penfold ME, Zhang P, Powers J, Summers BC, Miao Z, Zhao B, Jalili A, Janowska-Wieczorek A, Jaen JC, Schall TJ. 2009. Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J Immunol*, 183 (5):3204-3211.
- Zheng J, Thylin MR, Ghorpade A, Xiong H, Persidsky Y, Cotter R, Niemann D, Che M, Zeng YC, Gelbard HA, Shepard RB, Swartz JM, Gendelman HE. 1999. Intracellular CXCR4 signaling, neuronal apoptosis and neuropathogenic mechanisms of HIV-1-associated dementia. *J Neuroimmunol*, 98 (2):185-200.
- Zhou N, Luo Z, Luo J, Liu D, Hall JW, Pomerantz RJ, Huang Z. 2001. Structural and functional characterization of human CXCR4 as a chemokine receptor and HIV-1 co-receptor by mutagenesis and molecular modeling studies. *J Biol Chem*, 276 (46):42826-42833.
- Zlotnik A, Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12 (2):121-127.
- Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. 1998. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 393 (6685):595-599.

7 **Anhang**

Lebenslauf

Danksagung

Ehrenwörtliche Erklärung

Lebenslauf

Hoffmann, Frauke
Diplom-Biologin
*05.10.1981 in Oldenburg

Schule

1988-2001 Schulausbildung in Oldenburg
23.06.2001 Abitur (Allgemeine Hochschulreife)

Studium

2001-2008 Studium der Biologie an der
Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Schwerpunkte: Zellbiologie, Genetik, Biochemie
07.07.2008 Diplom Biologie

Berufserfahrung

2003 Auslandspraktikum, Spanien
2009-2010 wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Klinikum der OvG-Universität Magdeburg
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
2010-2012 wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Klinikum der FS-Universität Jena
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
seit 04.2012 wissenschaftliche Mitarbeiterin am
Klinikum der TU München
Lehrstuhl für Pharmazeutische Radiochemie

Veröffentlichungen

20.03.2012 Vortrag auf der 78. Jahrestagung der DGPT
17.08.2012 wissenschaftliche Veröffentlichung mit Erstautorschaft im
Journal of Biological Chemistry:
“Rapid uptake and degradation of CXCL12 depend on CXCR7
carboxyl-terminal serine/threonine residues”

Jena, den 19.11.2012

Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt. Ich danke Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz, dass ich die Möglichkeit hatte, die beschriebenen Untersuchungen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof Dr. Ralf Stumm für die engagierte Betreuung meiner Arbeit. In vielen Gesprächen gab er stets gute Anregungen und trug mit seinem theoretischen und praktischen Wissen in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Neuropharmakologie möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Insbesondere Frau Wiebke Müller danke ich für die enge und produktive Zusammenarbeit, die immer einen freundschaftlichen Charakter hatte und auf die ich in keinem Fall hätte verzichten wollen.

Frau Dr. Dagmar Schütz möchte ich für ihre kompetente und freundliche Unterstützung bei zahlreichen Fragen und Experimenten danken, die meine Arbeit sehr vorangebracht haben.

Christine Anders danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihr stetes Engagement für eine heitere Arbeitsatmosphäre.

Frau PD Dr. Amelie Lupp möchte ich für die vielen hilfreichen Ratschläge und anregenden Gespräche nach Feierabend danken.

Allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, die hier nicht namentlich erwähnt sind, möchte ich dafür danken, dass ich so freundlich im Institut aufgenommen wurde. Die freundliche Arbeitsatmosphäre und die unzähligen größeren und kleineren Gefälligkeiten haben mir die Arbeit sehr erleichtert und für die nötige Motivation gesorgt.

Ganz herzlichen Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, Motivation, Geduld und Liebe und für die vielen großen Kleinigkeiten.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Wiebke Müller:

Durchführung und Auswertung der Westernblotexperimente (Rezeptoren)

Dr. Dagmar Schütz:

Durchführung und Auswertung der Calcium-Messungen und
Charakterisierung der ST/A-Mutanten,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 19.11.2012
