

Untersuchungen zur genetischen Variabilität der Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und CXCR5

Von dem Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biol. Lars Ohl

geboren am 20.01.1970, in Stade

2004

Referent: Prof. Dr. Reinhold Förster, Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Schwinzer, Medizinische Hochschule Hannover

Tag Der Promotion: 20. August, 2004

I Inhalt

I	Inhalt.....	3
II	Abbildungsverzeichnis	6
III	Tabellenverzeichnis	8
IV	Verzeichnis der Abkürzungen.....	9
1	Zusammenfassung	12
2	Abstract	13
3	Einleitung	15
3.1	DNA, Bauplan des Lebens	15
3.2	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	18
3.2.1	Chemokinrezeptoren.....	19
3.3	Die Rolle des Chemokinsystems bei der Wanderung von Zellen	20
3.3.1	Chemokine in Entzündungsprozessen	21
3.3.2	Chemokine in der Homöostase.....	21
3.3.3	Die Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7	22
3.4	Mutationsanalysen und genetische Studien.....	25
3.5	Chemokinrezeptoren als Zielgene in Mutationsanalysen.....	27
3.6	Zielsetzung	29
4	Material und Methoden	30
4.1	Material.....	30
4.1.1	Probenmaterial.....	30
4.1.2	Gensequenzen.....	31
4.1.3	Zelllinien.....	31
4.1.4	Bakterienstämme	31
4.1.5	Plasmide	31
4.1.6	Materialien, Chemikalien und Enzyme	32
4.1.7	Geräte.....	33
4.2	Methoden	34

4.2.1	Isolation genomischer DNA	34
4.2.1.1	Isolation genomischer DNA aus Tumormaterial	34
4.2.1.2	Isolation genomischer DNA aus Blut	34
4.2.1.3	Isolation genomischer DNA aus Speichel	35
4.2.2	„Multiplex Sequence Comparison“	35
4.2.3	Anwendung des „Multiplex Sequence Comparison“ auf die Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7	37
4.2.3.1	Design der Multiplex-Poole.....	37
4.2.3.2	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	39
4.2.3.3	Horizontal - Gelelektrophorese.....	40
4.2.3.4	Reinigung der PCR-Produkte	40
4.2.3.5	Multiplex-Sequenzierung	41
4.2.3.6	Direkt-Transfer-Gelelektrophorese.....	42
4.2.3.7	Detektion der Multiplex - Sequenzierreaktionen.....	44
4.2.3.7.1	Oligonukleotidmarkierung.....	44
4.2.3.7.2	Hybridisierung der Multiplex-Sequenzierungen	44
4.2.3.7.3	Darstellung und Auswertung der Sequenzierreaktion	46
4.2.4	Klonierung ausgewählter Varianten	46
4.2.4.1	Klonierung von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	46
4.2.4.2	Verwendete Plasmide	46
4.2.4.3	Anzucht der Plasmid-tragenden Bakterien	46
4.2.4.4	Minipräparation von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse).....	47
4.2.4.5	Minipräparation von Plasmid-DNA (Kit).....	47
4.2.4.6	Maxipräparation von Plasmid-DNA (Kit).....	49
4.2.4.7	Analyse der Plasmid-DNA	49
4.2.4.7.1	Konzentrationsbestimmung der DNA	49
4.2.4.7.2	Restriktion der Plasmid-DNA.....	50
4.2.4.8	Präparation von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau	50
4.2.4.9	Ligation von DNA- Fragmenten.....	51
4.2.4.10	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i>	51
4.2.4.11	PCR basierter Einzelnukleotidaustausch in CXCR5 und CCR7	52
4.2.5	Zellkultur und funktionelle Untersuchungen.....	54
4.2.5.1	Zellkultur humaner Zelllinien.....	54
4.2.5.2	Gentechnische Manipulation von Zelllinien.....	55

4.2.5.2.1	Transfektion mit Kalziumphosphat	55
4.2.5.2.2	Transfektion mit Fugene6®	56
4.2.5.3	Durchflusszytometrie.....	56
4.2.5.3.1	Analyse von Oberflächenmolekülen	56
4.2.5.3.2	Färbung intrazellulärer Epitope	57
4.2.5.4	Immunfluoreszente Färbung transfizierter Zellen	57
4.2.5.5	Nachweis von Proteinen im Westernblot	58
4.2.5.5.1	SDS-PAGE	58
4.2.5.5.2	Westernblot.....	59
4.2.5.6	Herstellung stabil transformierter Zelllinien	60
4.2.5.7	Messung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration.....	62
4.2.5.8	Luziferase-Assay zur Bestimmung der MAPK-Aktivierung	63
5	Ergebnisse	65
5.1	Multiplex Sequenz-Vergleich.....	65
5.2	Genetische Variabilität von CCR7, CXCR4 und CXCR5	67
5.2.1	Sequenzvariabilität	67
5.2.2	Genetische Variabilität von CCR7	68
5.2.3	Genetische Variabilität von CXCR4	69
5.2.4	Genetische Variabilität von CXCR5	70
5.3	Polymorphismen bei Patienten und Kontrollen.....	73
5.3.1	Hardy – Weinberg – Verteilung	73
5.3.2	Hardy – Weinberg –Verteilung bei Kontrollen und Patienten	73
5.4	Funktionelle Untersuchungen.....	75
5.4.1	Expressionsanalysen.....	76
5.4.1.1	Expressionsanalyse der CCR7 Variante.....	76
5.4.1.2	Expressionsanalyse der CXCR5-Varianten.....	77
5.4.2	Ligandenbindung und Signaltransduktion.....	80
5.4.2.1	Herstellung stabil transformierter polyklonaler Zelllinien	81
5.4.2.2	Ligandenbindung an Chemokinrezeptoren induziert Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration	81
5.4.2.2.1	Stimulation von CXCR5 auf HEK293-Zellen.....	82
5.4.2.2.2	Stimulation von CCR7 auf HEK293-Zellen.....	87
5.4.2.3	Induktion des MAP-Kinase-Signalweges.....	89

6	Diskussion	92
6.1	Unterschiede in der genetischen Variabilität der untersuchten Chemokinrezeptoren.....	92
6.2	Die Bedeutung von Chemokinrezeptoren bei verschiedenen Erkrankungen .	94
6.2.1	Chemokinrezeptoren und ihre Rolle in der Metastasierung solider Tumoren	94
6.2.2	Chemokinrezeptoren bei Hämatopoetischen Tumorerkrankungen	95
6.2.3	Assoziation von Chemokinrezeptor-Varianten mit Erkrankungen.....	98
6.3	Funktionelle Konsequenzen verschiedener Aminosäureaustausche.....	99
7	Literatur	107
8	Anhang	119
9	Danksagungen	127

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schema der angenommenen Struktur G-Protein gekoppelter Rezeptoren.....	19
Abb. 2	Schema des ‚Multiplex Sequence Comparison‘	36
Abb. 3	Aufteilung der sequenzierten Genabschnitte in PCR-Produkte	38
Abb. 4	PCR-basierte Mutagenese eines Einzelnukleotides in der cDNA eines Expressionsvektors	53
Abb. 5	Beispiel für das Bild einer hybridisierten Sequenzierreaktion auf einer Nylonmembran	66
Abb. 6	Ausschnitt der Sequenzierung von CXCR5, Segment 4 mit Variante +264C/G.....	67
Abb. 7	Polymorphes Spektrum des CCR7-Gens	69
Abb. 8	Polymorphes Spektrum des CXCR4-Gens	70
Abb. 9	Polymorphes Spektrum des CXCR5 Gens.....	71
Abb. 10	Analyse der Expression von CXCR5 und der Variante +1085C/G (Pro274Ala) ..	78
Abb. 11	Konfokale immunhistologische Aufnahme von CXCR5 transfizierten HEP2-Zellen	79

Abb. 12 CXCR5 spezifischer Westernblot mit Membranproteinen transfizierter HEK293 80

Abb. 13 Messung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in HEK293-Zellen 83

Abb. 14 Messung der Kalzium-Konzentration in HEK293-Zellen, die unverändertes CXCR5 exprimieren 84

Abb. 15 Stimulation der mit Antisense-CXCR5 transformierten Kontroll-Zelllinie 85

Abb. 16 Messung der Kalzium-Konzentration in HEK293-Zellen, die Varianten von CXCR5 exprimieren 86

Abb. 17 Stimulation von CCR7 exprimierenden HEK293 durch ELC 88

Abb. 18 Relative Luziferaseaktivität in CXCR5 transfizierten CHO-K1-Zellen..... 90

Abb. 19 Relative Luziferaseaktivität in CCR7 transfizierten CHO-K1 Zellen 91

Abb. 20 Lokalisation der Aminosäureaustausche bei CXCR5..... 102

Abb. 21 CXCR5 Referenzsequenz 125

Abb. 22 CCR7 Referenzsequenz 126

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammensetzung der Patientenproben nach der Häufigkeit der verschiedenen hämatopoetischen Erkrankungen	30
Tabelle 2 Mutagenese-Primer	54
Tabelle 3 Transfektionsansätze für MAPK-Assay.....	64
Tabelle 4 Frequenz der variablen Positionen in CCR7, CXCR4 und CXCR5 pro 1000 bp	68
Tabelle 5 Allelfrequenzen der variablen Positionen im CCR7-Gen (n = Allelanzahl)	69
Tabelle 6 Allelfrequenzen der variablen Positionen im CXCR5-Gen (n = Allelanzahl)....	72
Tabelle 7 Überprüfung der Hardy-Weinberg-Verteilung der Polymorphismen innerhalb der Patienten-Gruppe	74
Tabelle 8 Überprüfung der Hardy-Weinberg-Verteilung der Polymorphismen innerhalb der Kontrollgruppe.....	75
Tabelle I Primer und Proben F-Pool	119
Tabelle II Primer und Proben R-Pool	121
Tabelle III Primerbedingungen Forward Pool CXCR5 , CCR7 und CXCR4	123
Tabelle IV PCR- und Sequenzierbedingungen 21plex Reversepool, CXCR5, CCR7 und CXCR4.....	124

IV Verzeichnis der Abkürzungen

Abb	Abbildung
A	Adenosin
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BLC	<i>B-lymphocyte chemoattractant, CXCL13</i>
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-monophosphat
CCL	CC-Chemokinrezeptor-Ligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalovirus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CXCL	CXC-Chemokinrezeptor-Ligand
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DC	<i>dendritic cell</i>
ddH ₂ O	Doppelt entsalztes Wasser
DMEM	<i>Dubelco's modified eagle's medium</i>
DNA	<i>deoxy-ribonucleic acid</i> (Desoxyribunukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTE	Direkttransfer-Elektrophorese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	<i>Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ELC	<i>EBI 1-ligand chemokine, CCL19</i>
Elk-1	<i>ETS-like transcription factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FURA-2/AM	Fluoreszenzfarbstoff, <i>1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzfuran-5-oxyl]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acidpentaacetoxymethyl ester</i>
G	Guanin
G418	Geneticinsulfat
GAL4	Transkriptionsfaktor von <i>saccharomyces cervisiae</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
G-Protein	GTP-bindendes Protein
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethan-Sulfonsäure
HEV	<i>High endothelial venule</i>
HHV	Humanes Herpersvirus
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>

HZL	Haar-Zell Leukämie
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositoltrisphosphat
IVS	intervenierende Sequenz
Kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
LB-Medium	Bakterien-Medium nach Luria und Bertani
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MEK	MAPK/ERK-Kinase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
N-Terminus	Amino-Terminus
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	<i>Polymerase chain reaktion</i> , Polymerase-Kettenreaktion
<i>plt</i>	<i>Paucity of lymph nodes</i>
PP	Peyer'sche Platten
RFLP	<i>Restriction length polymorphism</i>
RPMI-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i> , CXCL12
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLC	<i>Secondary lymphoid tissue chemokine</i> , CCL21
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SSCP	<i>Single strand conformation polymorphism</i>
T	Thymin
TBE	Tris-Borat/EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TdT	Terminale Desoxynukleotid Transferase
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembran-Domäne
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol	Volumen
WHIM-Syndrom	Warzen, Hypogammaglobulinämie, Infektionen und Myelokathexis-Syndrom

Drei- und Einbuchstaben-Abkürzungen und Codons von Aminosäuren

Alanin.....Ala.....A	GCA, GCT, GCG, GCC
Arginin.....Arg.....R.....	CGA, CGT, CGG, CGC, AAA, AAG
Asparaginsäure.....Asp.....D.....	GAT, GAC
Asparagin.....Asn.....N.....	AAT, AAC
Cystein.....Cys.....C.....	TGT, TGC
Glutaminsäure.....Glu.....E.....	GAA, GAG
Glutamin.....Gln.....Q.....	CAA, CAG
Glycin.....Gly.....G.....	GGA, GGT, GGG, GGC
Histidin.....His.....H.....	CAT, CAC
Isoleucin.....Ile.....I.....	ATA, ATT, ATC
Leucin.....Leu.....L.....	CTA, CTT, CTG, CTC, TTA, TTG
Lysin.....Lys.....K.....	AAA; AAG
Methionin.....Met.....M.....	ATG
Phenylalanin.....Phe.....F.....	TTT, TTC
Prolin.....Pro.....P.....	CCA, CCT, CCG, CCC
Serin.....Ser.....S.....	TCA, TCT, TCG, TCC, AGT, AGC
Threonin.....Thr.....T.....	ACA, ACT, ACG, ACC
Tryptophan.....Trp.....W.....	TGG
Tyrosin.....Tyr.....Y.....	TAT, TAC
Valin.....Val.....V.....	GTA, GTT, GTG, GCT

1 Zusammenfassung

Genetische Variabilität kann die Ursache für viele Erkrankungen sein. Die Assoziation von Varianten bestimmter Gene mit Erkrankungen trägt dazu bei, die genetischen Ursachen hierfür und eine Prädisposition für solche Erkrankungen besser zu verstehen. In dieser Arbeit wurde die genetische Variabilität der Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und CXCR5 im Zusammenhang mit verschiedenen Formen von Leukämie und Lymphomen untersucht. Chemokinrezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Wanderung von Blutzellen und bei der Organisation von lymphatischen Organen. Sie sind auch auf malignen Zellen hämatopoetischer Tumoren exprimiert. Hier tragen Chemokinrezeptoren möglicherweise zur Metastasierung der Tumoren und zur Progression der Erkrankung bei. Die Analyse der Gensequenzen von 135 Patienten und 48 gesunden Kontrollen unter Verwendung des Multiplex-Sequenz-Vergleichs deckte in einer Gesamtsequenz von 7,6 kbp 22 variable Positionen auf, darunter zehn Polymorphismen. Die Variabilität der drei untersuchten Gene war sehr unterschiedlich. Während im CXCR4-Gen nur eine variable Position gefunden wurde, waren es im Fall von CCR7 vier und im CXCR5-Gen konnten 17 veränderte Basen-Positionen festgestellt werden. Die statistische Analyse der Hardy-Weinberg-Verteilung der Polymorphismen zeigte, dass diese für das gesamte Patientenkollektiv und die Kontrollen bei allen Polymorphismen angenommen werden konnte. Betrachtete man aber die Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) oder akuter lymphatischer Leukämie (ALL) getrennt, so wichen die gefundenen Genotypen der im Promotor von CXCR5 liegenden Variante -32C/A in diesen Gruppen signifikant von der Hardy-Weinberg-Verteilung ab. Dies könnte ein Hinweis auf einen Einfluss dieser Promotorvariante auf diese Erkrankungen sein. Fünf Varianten führten zu Aminosäureaustauschen in der Proteinsequenz. Ein Austausch lag im N-Terminus von CCR7, die übrigen vier Austausche betrafen CXCR5. Die funktionelle Analyse dieser Rezeptorvarianten zeigte, dass zwei Aminosäureaustausche in CXCR5 mit einer Veränderung der Rezeptorfunktion assoziiert werden konnten. Die Variante +917T/G führt zu einem Austausch Ser218Ala in der zweiten extrazellulären Schleife. Sie verändert nicht die Mobilisierung von Kalzium in HEK293-Zellen, verhindert aber die Aktivierung eines MAPK-Signalweges in CHO-K1-Zellen. Die Variante +1085C/G hat einen Austausch eines konservierten Prolin an Position 274 zu Alanin in der sechsten TMD zur Folge. Ein derart veränderter Rezeptor wird kaum auf der Zelloberfläche exprimiert, akkumuliert aber intrazellulär. Die Untersuchung des MAPK-Signalweges zeigte, dass Expression dieser

Rezeptorvariante zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalweges in CHO-K1-Zellen führte. Auf der Grundlage dieser Arbeit kann in weiteren Studien ein Einfluss der hier identifizierten Varianten auf andere Erkrankungen, für die die Chemokinrezeptoren zu Kandidatengenomen zählen, untersucht werden.

2 Abstract

Genetic variations frequently represent the cause for diseases. Thus, the association of genetic variants with disorders contributes to our understanding for the predisposition and eventually development of diseases. In the present study we analyzed the genetic variability of the chemokine receptors CCR7, CXCR4, and CXCR5 and their association with leukemias and lymphomas. Chemokine receptors are known to control leukocyte trafficking and the functional organization of lymphoid organs. Since some of them have also been reported to be expressed on haematopoietic malignancies, it has been speculated that these chemokine receptors might contribute to tumor metastasis and progression of disease. Using multiplex sequencing on samples derived from 135 patients with haematopoietic disorders as well as from 48 healthy individuals 22 variable positions were identified within a total genetic sequence of 7.6 kbp. Ten of these variable positions represent polymorphisms. The genetic variability of the three chemokine receptors investigated showed considerable differences: While the CXCR4-gene contained only one variable site, four were found in the CCR7-gene and 17 were identified in the gene for CXCR5. Statistical analysis revealed that all polymorphisms met the Hardy-Weinberg distribution in both patients as well as controls. However, analysis of patients grouped by disease revealed significant discrepancies within the non-Hodgkin-Lymphoma patients and the acute-lymphoid-leukemia patients. In both groups the promoter polymorphism -32C/A did not meet the criteria for Hardy-Weinberg distribution. This finding might point to an association of this variant with both diseases. Five of the variants led to an altered protein sequence. One amino acid substitution affected in the N-terminal region of CCR7, while the other four affected CXCR5. Two of the variants found in the CXCR5-gene could be associated with altered receptor function. The variant +917T/G led to a Ser218Ala substitution in the second extra cellular loop of the receptor. The calcium mobilization in HEK293 cells carrying this receptor variant was not affected, however the MAP-Kinase signaling of this receptor was impaired. The second variant, +1085C/G, resulted in the substitution of a conserved proline at position 278 with alanine in trans-membrane domain

VI. The mutated receptor lacked significant surface expression but accumulated at intercellular stores. Transfection of CHO-K1 cells with this mutant receptor revealed increased intrinsic MAP-Kinase activity leading to activation levels similar to those observed after activating the wild type receptor with its cognate ligand. The results obtained in the present study will build the basis for further genetic analysis where polymorphisms of CCR7, CXCR4 and CXCR5 are suspected to be associated with certain diseases.

Schlagworte:

Chemokinrezeptoren, genetische Variabilität, haematopoetische Tumoren

Chemokine receptors, genetic variation, haematopoietic tumors

3 Einleitung

3.1 DNA, Bauplan des Lebens

Die Grundsteine des Lebens und der Funktion jeder Zelle sind die Informationen, die in den Genen des Organismus festgelegt sind. Diese sind in langkettigen, doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure-Molekülen (DNS) kodiert, welche aus einer Verknüpfung von Nukleotiden (Adenin, A, Guanin, G, Thymin, T und Cytosin, C) bestehen. Dieses extrem lange DNA-Molekül ist in Verbindung mit zahlreichen Proteinen zu einem Chromosom organisiert, wodurch die Stabilität des Makromoleküls gewährleistet wird. Die Anzahl der Chromosomen variiert von Spezies zu Spezies - der Mensch z.B. besitzt 46 Chromosomen, 22 sog. Autosomen, die doppelt vorliegen, jeweils eine Kopie von jedem Elternteil, und 2 Geschlechtschromosomen, XX oder XY. Der eigentliche DNA-Doppelstrang besteht aus zwei zu einander revers komplementären Einzelsträngen, die über Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleotiden zusammengehalten werden. Hierbei paaren immer Adenin und Thymin, beziehungsweise Guanin und Cytosin miteinander. Diese Struktur der DNA erlaubt vor jeder Zellteilung die exakte Erstellung einer Kopie, indem die beiden Stränge getrennt werden und der jeweils fehlende Strang durch die komplementären Nukleotide ergänzt wird (Seyffert, Balling et al. 2003).

Dieses geschieht vor jeder Zellteilung, da die gesamte genetische Information auf beide Tochterzellen verteilt werden muss. Trotz der vorhandenen Korrekturmechanismen kommt es hierbei gelegentlich zu Fehlern, die eine Änderung der Nukleotidsequenz zur Folge haben können. Diese Veränderungen werden Mutation (lat. mutare, vertauschen) genannt. Neben solchen spontanen Ereignissen können Mutationen auch durch äußere Einflüsse auf den Organismus entstehen. Veränderungen können hierbei durch elektromagnetische Strahlungen (radioaktive, Röntgen- und UV-Strahlung), aber auch chemische Verbindungen (z.B. Ethidiumbromid und Schwermetallverbindungen), ausgelöst werden (Seyffert, Balling et al. 2003).

Bei einem einzelligen Organismus können Mutationen direkte Folgen auf das Fortbestehen des Organismus haben, wenn beispielsweise die Funktion eines Gens gestört wird, das im Stoffwechsel eine wichtige Rolle einnimmt. Bei mehrzelligen Organismen, wie dem Menschen, treten die meisten dieser Mutationen in den somatischen Körperzellen auf und haben in der Regel eine geringe Auswirkung auf den Gesamtorganismus. Sind jedoch

Gene betroffen, die zum Beispiel eine Funktion in der Regulation des Zellzyklus innehaben, so können diese Veränderungen zur Entstehung von Tumoren beitragen. Auch in Zellen der Keimbahn kommt es gelegentlich zu Mutationen, die dann an die Nachkommen weitergegeben werden können. Diese Keimbahnmutationen sind ein Quelle für eine enorme genetische Variabilität innerhalb einer Spezies und Grundlage der Artenvielfalt.

Mutationen können in drei verschiedenen Formen auftreten. Handelt es sich um den Austausch eines einzelnen Nukleotids durch ein anderes, so spricht man vom Einzelnukleotidaustausch (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Es können aber auch größere Bereiche von Genen betroffen sein. Fehlen ein oder mehrere Nukleotide, so nennt man dies Deletion. Sind Nukleotide eingefügt worden, wird die Mutation als Insertion bezeichnet. Diese lokalen Mutationen beeinflussen in der Regel nur ein Gen direkt. Dem gegenüber stehen Veränderungen ganzer Chromosomen, bei denen durch Deletion, Dislokation oder Duplikationen eine Vielzahl von Genen betroffen sein können (Seyffert, Balling et al. 2003).

Die DNA-Sequenz, die für ein Gen codiert, wird über ‚messenger‘ RNA (mRNA) in eine Proteinsequenz translatiert. Da DNA und RNA nur aus vier verschiedenen Nukleotiden bestehen, aber für 20 Aminosäuren codieren müssen, besteht ein Codon, das in eine Aminosäure translatiert wird, aus drei Nukleotiden. Daraus ergeben sich 4^3 , also 64, verschiedene Codons. Der Überschuss an Codons führt dazu, dass einige Aminosäuren von mehreren Basen-Triplets codiert werden. Man spricht deshalb auch von einem degenerierten Code. SNP in der DNA-Sequenz können also zu einer Veränderung der Proteinsequenz führen, wenn ein Basen-Triplet so verändert wird, dass es für eine andere Aminosäure codiert. Wird das Basen-Triplet in eines der drei Stopcodons geändert, kommt es zu einem C-terminal verkürzten Protein. Insertionen und Deletionen können zu einer gänzlich anderen Proteinsequenz führen, wenn durch die zusätzlichen fehlenden Nukleotide das Triplet-Leseraster verschoben wird (Stryer 1994).

Chromosomenmutationen sind schon seit langem als Ursache vieler Erkrankungen bekannt, da sich diese Veränderungen während der Zellteilung im Karyogramm erkennen lassen. Durch verfeinerte Analysetechnik konnten in jüngster Zeit viele weitere Krankheiten (vor allem Krebserkrankungen) auf solche Mutationen zurückgeführt werden. Die sogenannte FISH-Analyse (*fluorescent in situ hybridization*) hat hierbei eine wichtige Rolle gespielt. Dabei werden fluoreszent markierte Sonden auf Zellkernen, die sich in der

Metaphase befinden, hybridisiert und so Dislokationen, Duplikationen oder Deletionen sichtbar gemacht (Lawrie and Gosden 1980; Tkachuk, Westbrook et al. 1990; Bentz, Dohner et al. 1994). SNP oder lokale Deletionen sowie Insertionen lassen sich hingegen weit schwieriger entdecken. Viele bekannte Erbkrankheiten beruhen allerdings auf eben solchen lokalen Mutationen. In vielen Fällen war zwar die Vererbbarkeit der Krankheit schon lange bekannt, aber weder die betroffenen Gene noch die zu Grunde liegenden Mutationen konnten identifiziert werden. Durch ausgedehnte Stammbaumanalysen und Untersuchungen mit Mikrosatellitenmarkern konnten zunächst die betroffenen Chromosomen und später auch die entsprechenden Gene und Mutationen aufgeklärt werden. Typische Beispiele hierfür sind die Cystische Fibrose oder die verschiedenen Formen der Muskeldystrophie (Dallaire and Destine 1969; Edwards, Jonasson et al. 1984; Love, Forrest et al. 1989). Die Analyse des humanen Genoms, mit der Aufklärung der Sequenz aller Gene und deren Funktion, birgt ein enormes Potential für die Verbesserung der Lebensqualität und die Linderung und Heilung vieler Krankheiten (Roberts 1989; Lander, Linton et al. 2001; Venter, Adams et al. 2001). Es ermöglicht die Identifizierung neuer Angriffsziele für Medikamente und die exakte Diagnose genetisch bedingter Krankheiten (Jimenez-Sanchez, Childs et al. 2001).

Schon vor Beendigung des Humanen Genomprojekts zeigte die Analyse von Gensequenzen homologer Gene bei verschiedenen Arten, dass sich manche Gene im Laufe der Evolution kaum verändert haben (z.B. Cytochrom C, ein Protein der mitochondrialen Zellatmung), während andere im Laufe der Evolution immer mehr Veränderungen erfahren haben. Auch innerhalb einer Art weichen die Gensequenzen voneinander ab. Neben Unterschieden in den Gensequenzen, deren Phänotyp nach außen offensichtlich ist, die die Menschen voneinander unterscheiden und zu unverwechselbaren Individuen machen, gibt es Variationen in nahezu allen Genen, welche unscheinbar bleiben und doch einen Einfluss auf das Individuum haben können. Diese genetische Variabilität kann dazu führen, dass Medikamente, die im Allgemeinen gut vertragen werden und exzellente kurative Wirkungen haben, lebensbedrohliche Nebenwirkungen hervorrufen können oder schlicht wirkungslos bleiben, weil die Zielstruktur verändert ist. Die genetische Variabilität ist aber auch Ursache der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen, wie dem familiären Brustkrebs (Venkitaraman 2003), oder kann mit dem Auftreten eines erhöhten Blutdrucks assoziiert sein (Timmermann, Mo et al. 1998).

3.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (engl. *G-Protein coupled receptors*, GPCR) besteht aus einer Vielzahl von Rezeptoren, die sich durch ihre siebenfach die Zellmembran durchspannende Struktur auszeichnen. Die Vermittlung intrazellulärer Signale erfolgt bei allen G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch heterotrimere G-Proteine. Zunächst konnte eine Kristallstruktur nur für Bacteriorhodopsin beschrieben werden, das selber kein G-Protein gekoppelter Rezeptor ist (Pebay-Peyroula, Rummel et al. 1997). Das Bacteriorhodopsin ist allerdings funktionell mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor Rhodopsin verwandt. Das hieran entwickelte Modell zur Struktur der G-Protein gekoppelten Rezeptoren wurde später anhand der Kristallstruktur des Rhodopsins bestätigt (Palczewski, Kumasaka et al. 2000).

Die Aminosäuresequenz der G-Protein gekoppelten Rezeptoren weist sieben Bereiche auf, in denen sich hydrophobe Aminosäuren sammeln. Analog zum Bacteriorhodopsin geht man davon aus, dass sich in diesen Bereichen α -helicale Strukturen ausbilden, welche die Membran insgesamt siebenmal durchspannen (Transmembrandomänen, TMD). Dadurch entstehen je drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schlingen (engl. *loops*) sowie ein N-terminales extrazelluläres und ein C-terminales intrazelluläres Ende. Während die Aminosäuresequenzen der Transmembrandomänen innerhalb der gesamten Superfamilie konserviert sind, sind das N- und C-terminale Ende und die extra- und intrazellulären *loops*, die für die Bindung der Ligationspartner bzw. für die Kopplung der intrazellulären G-Proteine verantwortlich sind, höchst variabel (Probst, Snyder et al. 1992).

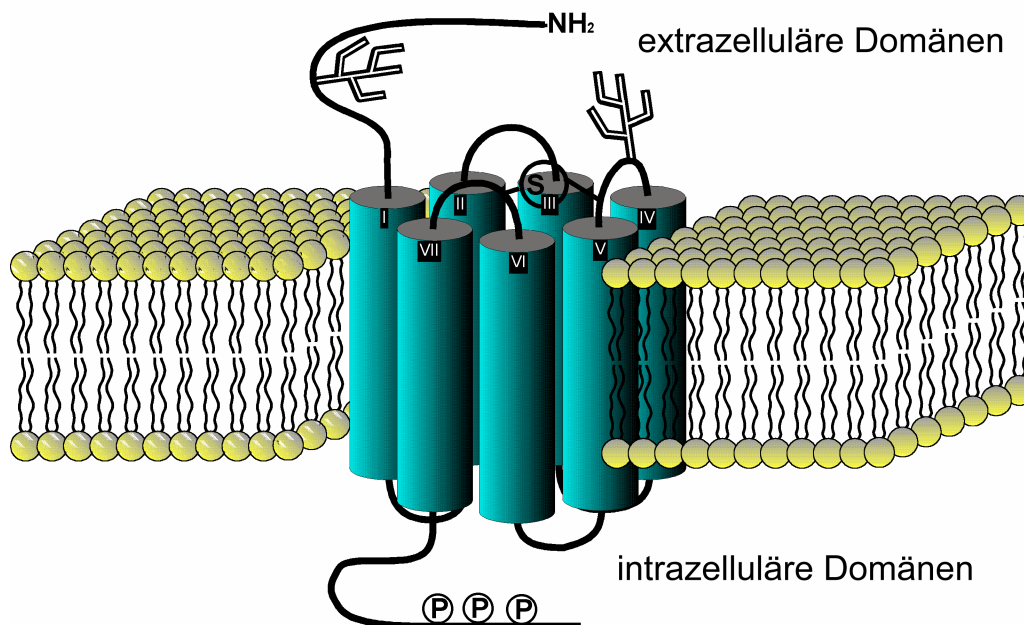


Abb. 1 Schema der angenommenen Struktur G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Als Beispiel CXCR5 mit symbolisierten Glycosylierungen und Phosphorylierungen (modifiziert nach R. Förster)

In den unterschiedlichen intra- und extrazellulären Bereichen der Rezeptoren liegt der Grund für die unglaubliche Vielfalt an Ligationspartnern und der Funktionen dieser Proteinsuperfamilie. Liganden für G-Protein gekoppelte Rezeptoren können Moleküle unterschiedlichster Stoffklassen sein, z.B. Geruchs- und Geschmacksstoffe, Hormone, Neurotransmitter oder Phospholipide. Die Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren wird grob in die drei Familien der Rhodopsin- und Calcitoninrezeptoren sowie der metabotropen Rezeptoren unterteilt. Diese werden dann anhand von Ligandenstrukturen, Funktionen und konservierten Aminosäuresequenzen in weitere Unterfamilien aufgeteilt.

3.2.1 Chemokinrezeptoren

Eine dieser Unterfamilien wird durch die Chemokinrezeptoren gebildet. Chemokine, Liganden dieser Rezeptoren, sind kleine Proteine aus der Stoffklasse der *chemotaktisch* wirkenden *Cytokine*. Cytokine sind auf Grund ihrer Funktion zu einer Gruppe zusammengefasst worden und spielen eine wichtige Rolle in der Signalübertragung zwischen Zellen des Immunsystems bei der Abwehr von Erregern und Infektionen. Während die Rezeptoren dieser Cytokine im Allgemeinen nicht zu der Familie der G-

Protein gekoppelten Rezeptoren gehören, wird die Signaltransduktion aller Chemokine über die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermittelt.

Chemokine werden anhand der Lage zweier konservierter Cysteine in Untergruppen aufgeteilt. Liegen diese Cysteine direkt nebeneinander, so spricht man von einem CC-Chemokin, während man es als CXC-Chemokin bezeichnet, wenn die Cysteine durch eine beliebige Aminosäure getrennt sind. Diese beiden Formen bilden die Hauptgruppen der Chemokine und werden durch das CX₃C-Chemokin Fractalkin und das XC-Chemokin Lymphoactin ergänzt. Entsprechend der Liganden, die an die Rezeptoren binden, werden die Chemokinrezeptoren entsprechend CC-Chemokinrezeptor (CCR) oder CXC-Chemokinrezeptor (CXCR) genannt. Derzeit sind zehn CC-Chemokinrezeptoren (CCR1 bis CCR10) sowie sechs CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR1 bis CXCR6) bekannt. Weitere Chemokinrezeptoren sind CX₃CR1, der Fractalkin bindet und XCR1, der Bindungspartner von Lymphoactin (Zlotnik and Yoshie 1999; Sallusto, Mackay et al. 2000; Bacon, Baggiolini et al. 2002). Darüber hinaus gibt es noch eine Anzahl von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die aufgrund von Sequenzhomologien zu den Chemokinrezeptoren gezählt werden, deren Bindungspartner aber noch unbekannt sind (*orphan receptors*) sowie viral exprimierte Chemokinrezeptoren (z.B. US28 des Cytomegalovirus (Gao and Murphy 1994) oder der humane Herpesvirus-8 (HHV8)-Chemokinrezeptor (Bais, Santomasso et al. 1998)).

3.3 Die Rolle des Chemokinsystems bei der Wanderung von Zellen

Chemokinrezeptoren und ihre Liganden übernehmen eine zentrale Rolle bei der Steuerung der gerichteten Wanderung von Zellen. Dies ist vor allem der Fall bei der Wanderung von Immunzellen durch den Körper und die sekundären lymphatischen Organe (Campbell, Kim et al. 2003). Neben den Zellen des Immunsystems nutzen auch andere Zellen das Chemokinsystem für die zielgerichtete Wanderung. Chemokinrezeptoren tragen zum Beispiel während der Embryonalentwicklung zu der Organisation sich entwickelnder Strukturen bei (McGrath, Koniski et al. 1999; Knaut, Werz et al. 2003); Nervenzellen exprimieren Chemokinrezeptoren (Stumm, Zhou et al. 2003), und nicht zuletzt ist gezeigt worden, dass die Orte der Metastasenbildung bei verschiedenen Tumoren von der Chemokinrezeptorexpression der metastasierenden Zellen abhängig ist (Muller, Homey et al. 2001; Robledo, Bartolome et al. 2001; Dellacasagrande, Schreurs et al. 2003).

3.3.1 Chemokine in Entzündungsprozessen

Bei den Chemokinen unterscheidet man zwischen solchen, die vor allem bei Entzündungsprozessen induziert werden und jenen, die ständig exprimiert werden und bei der Homöostase eine zentrale Funktion übernehmen (Baggiolini and Loetscher 2000). Die Wirkungsweise der Chemokine beruht darauf, dass Zellen, die den passenden Chemokinrezeptor exprimieren, entlang eines ansteigenden Konzentrationsgradienten wandern können und so zu der Zielstruktur, zum Beispiel einem Entzündungsherd, gelangen. Diesen Mechanismus nennt man Chemotaxis (Keller, Wissler et al. 1979), allerdings ist dies bisher nur *in vitro* belegt. Bei der Migration, die durch an Epithel gebundene Chemokine vermittelt wird, spricht man von Haptotaxis (Carter 1967). Dieser Mechanismus spielt eine Rolle bei der Wanderung von Leukozyten aus dem Blut über die Endothelien in sekundäre lymphatische Organe und bei der Rekrutierung von Immunzellen an den Entzündungsherde (Wiedermann, Reinisch et al. 1995). Die induzierbaren Chemokine wirken vor allem auf Zellen die Teil der angeborenen Immunantwort sind, wie zum Beispiel Makrophagen und Granulozyten.

3.3.2 Chemokine in der Homöostase

Die konstitutiv exprimierten Chemokine hingegen tragen wesentlich zur Rezirkulation von naïven Lymphozyten und der Organisation der lymphatischen Organe bei. Für die Funktion der Chemokine bei der Wanderung von Lymphozyten aus dem Blutstrom in die Lymphknoten wird mehrstufiges Modell postuliert. Dieses Modell geht davon aus, dass Chemokinrezeptoren nach Ligandenbindung andere an der Zellwanderung beteiligte Proteine, die sog. Integrine, von einer inaktiven in eine aktive Form überführen können und somit den Wanderungsprozess aus dem Blutstrom in die Lymphknoten initialisieren. Dieser Schritt ist Teil eines mehrstufigen Prozesses und geschieht an spezialisierten postkapillären Venolen mit hohem kubischem Endothel (engl. *High endothelial venules*, HEV). Die Interaktion von L-Selectin (CD62L) auf den Lymphozyten mit Adressinen auf den Endothelzellen führt zu einer reversiblen Bindung der Lymphozyten an das Endothel (Gallatin, Weissman et al. 1983). Dies bedingt ein verlangsamtes Entlangrollen der Zellen auf dem Endothel (von Andrian 1996). Im nächsten Schritt löst die Ligandbindung auf dem Endothel gebundenen Chemokinen an den entsprechenden Rezeptor die Aktivierung von Integrinen aus (Warnock, Askari et al. 1998). Diese werden auf der Oberfläche in einer inaktiven Form exprimiert und erst durch das Signal des Chemokinrezeptors in eine aktive Form überführt. Hierdurch wird die feste Bindung des Lymphozyten an das Endothel

bewirkt. Dieses feste Anhaften des Lymphozyten an das Endothel ist eine Voraussetzung für die Extravasation der Lymphozyten. Als der zentrale Chemokinrezeptor in diesem Prozess wurde CCR7 identifiziert (Förster, Schubel et al. 1999). Zahlreiche Versuche mit transgenen Mäusen, die defizient für einzelne Komponenten dieses postulierten Ablaufs sind, haben eine Beteiligung der angesprochenen Moleküle bei diesem Prozess belegt. Der Verlauf dieses Vorgangs ist bereits durch intravitale Mikroskopie gezeigt worden (von Andrian 1996).

3.3.3 Die Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7

Innerhalb des homöostatischen Chemokinsystems nehmen die Rezeptor/Liganden-Paare CXCR4/CXCL12, CXCR5/CXCL13 und CCR7/CCL19 bzw. CCL21 eine besondere Position ein. Obgleich bei den meisten Chemokinrezeptoren und ihren Liganden vielfältige Kreuzinteraktionen vorliegen, bilden diese drei Rezeptoren mit ihren Liganden spezifische Paare. Der einzige bekannte Ligand von CXCR4 ist CXCL12 (*stromal cell derived factor 1*, SDF1) (Shirozu, Nakano et al. 1995; Bleul, Farzan et al. 1996; Oberlin, Amara et al. 1996), während an CXCR5 nur CXCL13 (*b-cell attracting chemokine-1*, BCA-1 oder *B-Lymphocyte-Chemoattractant*, BLC) bindet (Gunn, Ngo et al. 1998; Legler, Loetscher et al. 1998). Für CCR7 hingegen sind zwei Liganden identifiziert worden: CCL19 (*EBL-1 ligand chemokine*, ELC) und CCL21 (*secondary lymphoid tissue chemokine*, SLC), die allerdings, soweit bekannt, spezifisch nur an diesen Rezeptor binden (Nagira, Imai et al. 1997; Yoshida, Imai et al. 1997; Campbell, Bowman et al. 1998; Ngo, Tang et al. 1998).

Diesen Chemokinrezeptoren und ihren Liganden kommen bei der Homöostase unterschiedliche Aufgaben zu. Die oben beschriebene Extravasation von Lymphozyten an den HEVs wird wohl vor allem durch CCR7 und seine Liganden vermittelt. Die Analyse von CCR7 defizienten Mäusen hat gezeigt, dass die Wanderung von T-Zellen über die HEVs gestört und in den Lymphknoten die Anzahl der T-Zellen deutlich vermindert ist (Förster, Schubel et al. 1999). Die Liganden von CCR7 werden von subepithelialen Stromazellen und dendritischen Zellen im Lymphknoten gebildet und lumenseitig auf den Endothelzellen der HEV präsentiert. Hier sind CCL19 und CCL21 an heparinbindende Strukturen gebunden (Campbell, Bowman et al. 1998; Breitfeld, Ohl et al. 2000). Der Phänotyp der *plt*-Maus (engl. *paucity of lymph node T cells*) entspricht dem der CCR7 defizienten Maus. Diese Mäuse besitzen eine natürlich aufgetretene Deletion im Locus von CCL19 und CCL21 (Nakano, Mori et al. 1998). Dadurch gibt es in diesen Tieren keine lymphatisch exprimierten Liganden von CCR7, und auch hier ist die Wanderung von

Lymphozyten über die HEVs gestört, was ein Beleg für die wechselseitige Spezifität dieses Rezeptor-Liganden Trios ist.

Die Verteilung der B-Zellen in CCR7-defizienten Mäusen ist mit der in Wildtypmäusen vergleichbar. Kurzzeit-Migrationsexperimente mit auf Wildtypempfänger transferierten CCR7 defizienten B-Zellen belegen aber, dass auch die Wanderung von B-Zellen durch CCR7 beeinflusst wird. Während B-Zellen von Wildtypmäusen zum Teil in der T-zellreichen Zone der Milz verweilen, wandern CCR7 defiziente B-Zellen direkt durch die T-zellreiche Zone der weißen Pulpa der Milz in die B-Zell-Follikel (Förster, Schubel et al. 1999). Neben diesen Funktionen bei der Wanderung von Lymphozyten spielt CCR7 auch eine Rolle bei der Wanderung aktivierter dendritischer Zellen (DC). Zu den DC der Haut gehören u.a. die sogenannten Langerhans-Zellen. Diese liegen im ausdifferenzierten aber unreifen Zustand in der Epidermis. Die unreifen Langerhans-Zellen finden den Weg in die Epidermis vermittelt durch andere Chemokinrezeptoren (CCR6, CCR4, CXCR2) und exprimieren dort zunächst kein CCR7 auf der Oberfläche. Die Aktivierung durch entsprechende Entzündungsreize führt dann allerdings zu einer Änderung des Chemokinrezeptorrepertoires. Neben CXCR4 wird vor allem die Oberflächenexpression von CCR7 stark hochreguliert (Sallusto, Schaalli et al. 1998). Dies ermöglicht den Zellen über afferente Lymphgefäße in die Lymphknoten einzuwandern. Hier bleiben sie, vermutlich ebenfalls vermittelt durch die Expression von CCR7, in der T-zellreichen Zone des Paracortex liegen, wo die Expression der beiden Liganden CCL19 und CCL21 nachgewiesen werden kann. Auch die Wanderung der DC aus der Haut ist bei CCR7-defizienten Mäusen maßgeblich gestört (Förster, Schubel et al. 1999).

Diese Zellpopulationen übergreifenden Funktion von CCR7 bei der Wanderung von Zellen in die Lymphknoten führte dazu, dass der Rezeptor auch als *homing receptor* bezeichnet wird (Förster, Schubel et al. 1999).

Funktionen von CXCR5 und CXCL13 sind ebenfalls durch die Analyse transgener Mäuse aufgeklärt worden. Der weitestgehend gleiche Phänotyp der CXCR5 defizienten und der CXCL13 defizienten Mäuse hat den Schluss nahe gelegt, dass CXCL13 der einzige funktionelle Bindungspartner von CXCR5 ist (Förster, Mattis et al. 1996; Ansel, Ngo et al. 2000)). Während die Wanderung von T-Zellen in diesen Mäusen nur partiell beeinflusst wird, zeigt sich eine zentrale Rolle dieses Chemokin/Rezeptor Paares bei der Organisation der Follikel in den sekundären lymphatischen Organen. CXCR5 wird im Wesentlichen auf rezirkulierenden naiven B-Zellen exprimiert, aber auch auf einer Subpopulation von

T-Helfer-Zellen (Breitfeld, Ohl et al. 2000; Schaerli, Willimann et al. 2000). Untersuchungen an CXCR5- bzw. CXCL13-defizienten Mäusen belegten, dass die Interaktion von CXCR5 mit seinem Liganden CXCL13 essentiell für die Wanderung von B-Zellen und T-Zellen im Follikel ist, die folliculäre dendritische Zellen (FDC) enthalten. Transferexperimente zeigten, dass B-Zellen, isoliert aus Milzen CXCR5-defizienter Mäuse, nicht mehr in diese Follikel in den Lymphknoten und ebenfalls nicht in die Follikel der Milz einwandern können. Die B-Zellen bleiben in der T-Zell-reichen Zone liegen (Förster, Mattis et al. 1996). Dieser Organisationsdefekt führt in der CXCR5 defizienten Maus zu einer Veränderung im Aufbau der weißen Pulpa der Milz. Die sonst asymmetrisch angeordneten B-Zell-Follikel sind desorganisiert und werden im Querschnitt als schmaler Ring um die PALS (engl. *periarteriolar lymphoid sheath*) sichtbar. Gesäumt wird die weiße Pulpa von einer verbreiterten Marginalzone (Förster, Mattis et al. 1996; Ansel, Ngo et al. 2000). Die Keimzentriumbildung findet in CXCR5-defizienten Mäusen zwar statt, allerdings befinden sich die Keimzentren nicht wie üblich im B-Zell-Follikel, sondern die proliferierenden Keimzentrumzellen ordnen sich um die Zentralarteriole in der PALS an und sind von T-Zellen umgeben. Es wurde aber gezeigt, dass die Keimzentrumreaktion funktionell einen normalen Verlauf nimmt, d.h. es finden offenbar sowohl Hypermutation als auch Affinitätsreifung statt (Voigt, Camacho et al. 2000).

Darüber hinaus ist die Anlage lymphatischer Organe in hohem Maße sowohl von CXCR5, als auch von CCR7 abhängig. Bereits in CXCR5-defizienten Mäusen unterbleibt die Anlage verschiedener peripherer und organdrainierender Lymphknoten, während die Peyer'schen Platten (PP), lymphatische Strukturen des Darms, nur in stark verminderter Anzahl gebildet werden (Förster, Mattis et al. 1996). Mäuse, die defizient für beide Rezeptoren sind, bilden nur noch den mesenterischen Lymphknoten und wenige PP. Diese Defekte in der Anlage lymphatischer Strukturen werden auf die gestörte Wanderung von Vorläuferzellen während der Embryonalentwicklung und nach der Geburt zurückgeführt (Finke, Acha-Orbea et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass diese potentiellen Vorläuferzellen sowohl CXCR5 als auch CCR7 exprimieren, während an den Stellen, die später zu Lymphknoten werden, die Liganden der beiden Rezeptoren gebildet werden (Luther, Ansel et al. 2003; Ohl, Henning et al. 2003).

Ein weiterer homöostatischer Chemokinrezeptor, CXCR4, wird auf einer ganzen Reihe Lymphozyten exprimiert. Neben der Wanderung von Lymphozyten steuert CXCR4 auch die Entwicklung von zerebralen Strukturen während der Embryogenese und die

Vaskularisierung in bestimmten Bereichen des Magen-Darm-Traktes (Tachibana, Hirota et al. 1998; Zou, Kottmann et al. 1998). CXCR4 defiziente Mäuse zeigen bereits in der Embryonalentwicklung starke morphologische Veränderungen, zum Beispiel am Herzen und am zentralen Nervensystem. Dies führt dazu, dass etwa die Hälfte dieser Tiere schon während der fötalen Entwicklung am Tag 17.5 nach der Empfängnis stirbt, während die Tiere, die bis zur Geburt überleben bereits eine bis wenige Stunden nach der Geburt sterben. Dies erschwert die nähere Analyse der Funktionen von CXCR4. Die Untersuchungen dieser Tiere haben belegt, dass die B-Zell-Entwicklung an die Signale von CXCR4 und seinem Liganden CXCL12 gekoppelt ist. Die Interaktion von CXCR4 und CXCL12 hält die sich entwickelnden B-Zellen im Knochenmark. Fehlt der Rezeptor oder der Ligand, verlassen die B-Zellen im pro-B-Zell-Stadium das Knochenmark und können nicht vollständig ausdifferenzieren (Tachibana, Hirota et al. 1998). Neben den Effekten bei der Embryonalentwicklung konnte kürzlich gezeigt werden, dass CXCR4 bei der Positionierung und Migration von Antikörper sezernierenden Plasmazellen aus den B-Zell-Follikeln in das Knochenmark und die rote Pulpa eine zentrale Rolle spielt (Hargreaves, Hyman et al. 2001). T-Lymphozyten exprimieren während der Entwicklung im Thymus CXCR4, und Transplantationsexperimente haben gezeigt, dass die auch die Entwicklung CXCR4-defizienter T-Zellen verändert ist (Ara, Itoi et al. 2003).

Über diese Funktionen bei der Migration von Immunzellen und der wichtigen Rolle in der Embryonalentwicklung hinaus, ist eine der meist beachteten Eigenschaften von CXCR4 dessen Funktion als Co-Rezeptor, der neben CD4 den Eintritt des humanen-Immundefizienz-Virus-(HIV)-I in Lymphozyten vermittelt (Feng, Broder et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass nur die gleichzeitige Expression von CD4 und CXCR4 zu einer Infektion von Zellen durch die lymphotropen HIV-I Stämme führt. Die Bindung des Liganden CXCL12 an CXCR4 kann *in vitro* die Infektionsrate der Lymphozyten deutlich senken (Oberlin, Amara et al. 1996).

3.4 Mutationsanalysen und genetische Studien

Genetische Variationen sind die Ursache für zahlreiche Erkrankungen des Menschen. Hierbei können sowohl Chromosomenaberrationen, kleinere Deletionen und Insertionen oder auch Einzelnukleotidaustausche und –polymorphismen eine Rolle spielen. Die Analyse genetisch bedingter Krankheiten erfolgte in vielen Fällen anhand von

Familienstudien, in denen über genetische Kartierungen die chromosomalen Bereiche eingegrenzt wurden, die für die Erkrankung verantwortlich waren. So konnten Kandidatengene festgelegt werden, die dann näher analysiert wurden. Dieser Ansatz war vor allem für Erkrankungen geeignet, die durch eine einzelne genetische Veränderung hervorgerufen wurden. Handelt es sich hingegen um eine Erkrankung mit einem komplexen genetischen Hintergrund, so erreicht man mit einem solchen Ansatz wenig, da sich die Auslöser möglicherweise auf einen weiten Bereich im Genom erstrecken, bzw. mehrere Loci umfassen. Ist keine Einschränkung auf chromosomale Bereiche möglich, bietet sich die Analyse von funktionellen Kandidatengenen an. Hierbei werden solche Gene zur genetischen Analyse herangezogen, die auf Grund ihrer Funktion mit der zu untersuchenden Erkrankung assoziiert sein könnten.

Die Untersuchung der Gene großer Kohorten von erkrankten Patienten und gesunden Personen kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. Viele Studien nutzen das Wissen um bereits vorhandene Polymorphismen in Frage kommender Kandidatengene. Diese lassen sich mit relativ einfachen Methoden nachweisen und erlauben die Untersuchung großer Gruppen, um so eine Assoziation mit einer bestimmten Erkrankung nachzuweisen. Sind in dem Kandidatengen bisher keine Variationen bekannt oder hofft man weitere zu entdecken, so gibt es verschiedene Methoden, sich diesen zu nähern. Zu Beginn der Untersuchungen genetischer Variationen wurden oft Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) gesucht (Reilly and Thomas 1980). Hierbei werden kleine per PCR amplifizierte DNA Fragmente mit Restriktionsendonukleasen gespalten, wobei durch das Auftreten von Sequenzänderungen Schnittstellen hinzukommen oder wegfallen können, was zu einer Änderung der Fragmentlängen oder der Anzahl der Spaltungsprodukte führt. Aufgrund der begrenzten Anzahl von Restriktionsendonukleasen kann mit dieser Methode aber nur ein sehr eingeschränktes, wenn auch einfach zu analysierendes Spektrum von Variationen erfasst werden.

Genauer, wenn auch aufwendiger, ist die Untersuchung von sogenannten Einzelstrang-Konformations-Polymorphismen (engl. *single strand conformation polymorphism*, SSCP) (Orita, Iwahana et al. 1989). Hierbei macht man sich zu nutze, dass sich einzelsträngige DNA zu einer sequenzabhängigen Sekundärstruktur faltet, wenn sie unter bestimmten Bedingungen erhitzt und abgekühlt wird. Je nach Sekundärstruktur zeigt die einzelsträngige DNA ein unterschiedliches Laufverhalten in der Gelelektrophorese und ergeben so spezifische Bandenmuster. Die SSCP-Analyse ermöglicht die effiziente

Untersuchung großer Gruppen bei einer relativ hohen Genauigkeit, erfordert aber für die einzelnen Varianten ein hohes Maß an methodischer Optimierung. Die Untersuchung eines breiten Spektrums an Variationen erhöht den Arbeitsaufwand proportional. Zudem gibt es auch hier Varianten, die nicht detektiert werden können.

Die genaueste Methode zur Untersuchung genetischer Variabilität ist die direkte Sequenzierung der Zielgene. Hierbei können alle auftretenden Variationen identifiziert werden, und somit ist die Methode nicht auf bekannte Varianten beschränkt. Eine etablierte Methode der DNA-Sequenzbestimmung ist die Strangabbruchsequenzierung nach Sanger (Sanger, Nicklen et al. 1977). Die Synthese der DNA wird zufällig durch den Einbau von Didesoxynukleotiden, die im Reaktionsansatz in einem bestimmten Verhältnis (meist 1:100) zu den Desoxynukleotiden vorliegen, beendet. Es ergeben sich DNA-Fragmente jeder möglichen Länge, die über eine Gelelektrophorese aufgetrennt werden können. Man kann hierfür mit Fluorochromen markierte Didesoxynukleotid-Terminatoren verwenden, die dann durch Anregung mit einem Laser über das emittierte Licht detektiert werden. Dies ermöglicht eine schnelle und direkte Analyse der Gensequenzen durch Sequenzierautomaten. Der Einsatz dieser Terminatoren ist allerdings kostspielig und für die Detektion von SNP nur eingeschränkt geeignet. Zur Kostensenkung und aufgrund der guten Detektierbarkeit wurde in der vorliegenden Arbeit die Detektion durch radioaktiv markierte Oligonukleotide verwendet. Da die Sequenzierung die aufwendigste Methode zur Analyse von Kandidatengenomen ist, war es nötig, diese Anwendung für die Analyse großer Kohorten möglichst effizient zu gestalten. Hierfür bietet die Multiplex-Sequenzierung ein hohes Potential, da die zeitaufwendigen und kostenintensiven Sequenzreaktionen in einer einzelnen Reaktion zusammengeführt werden können (Church and Gilbert 1984). Für die vergleichende Sequenzanalyse von Kandidatengenomen wurde diese Methode zum Multiplex-Sequenzvergleich weiterentwickelt (Hoehe, Kopke et al. 2000). Die auf der gleichzeitigen Sequenzierung von PCR-Produkten basierende Methode des Multiplex-Sequenzvergleiches wurde für die Analyse der drei zu untersuchenden Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und CXCR5 adaptiert.

3.5 Chemokinrezeptoren als Zielgene in Mutationsanalysen

Wie bereits ausgeführt, werden Chemokinrezeptoren auf vielen Lymphozyten exprimiert und sind an der Wanderung und Homöostase der Lymphozyten beteiligt. Dies legt nahe, dass genetische Veränderungen dieser Rezeptoren bei Erkrankungen, an denen diese Zellen beteiligt sind, eine Rolle spielen können. Neben dem möglichen Einfluss auf das

Wanderungsverhalten der betroffenen Zellen ist ein weiterer Aspekt, dass zum Beispiel viral codierte GPCR oder genetische Veränderungen bei verschiedenen GPCR mitogene Signale auslösen und somit direkt zur Tumorbildung beitragen können (Allen, Lefkowitz et al. 1991; Burger, Burger et al. 1999; Schwarz and Murphy 2001).

Mutationsanalysen bei Chemokinrezeptoren wurden bisher vor allem im Zusammenhang mit HIV-Infektionen durchgeführt. Nachdem neben CD4 CXCR4 als Co-Rezeptor für HIV-Infektionen von Zellen identifiziert wurde, erhielt die Forschung an Chemokinrezeptoren erhöhte Aufmerksamkeit. In kurzer Zeit wurden mit CCR2 und CCR5 weitere Chemokinrezeptoren identifiziert, die von verschiedenen HIV-Stämmen als Co-Rezeptoren genutzt werden konnten (Alkhatib, Combadiere et al. 1996; Deng, Liu et al. 1996; Doranz, Rucker et al. 1996). Nachdem nun diese Rezeptoren in ihrer Rolle bei der HIV-Infektion identifiziert waren, begann die intensive Suche nach Variationen und Polymorphismen in diesen Genen und der möglichen Assoziation solcher Varianten mit einem Schutz vor einer HIV-Infektion. Tatsächlich konnte bei CCR5 eine Deletion von 32 Basenpaaren ($\Delta 32$) entdeckt werden, die zu einem funktionslosen Rezeptor führte. Das Fehlen des Chemokinrezeptors scheint keine gravierenden Nachteile für den Träger der Mutation zu haben. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Träger der $\Delta 32$ -Variante von CCR5 signifikant seltener an HIV erkranken, und dies auch schon für heterozygote Träger mit abgeschwächter Wirkung gilt (Samson, Libert et al. 1996). In CCR2 konnte ein SNP identifiziert werden, der mit der Progression der HIV Infektion assoziiert ist (Kostrikis, Huang et al. 1998). Diese Variante von CCR5 bietet aber nicht nur bei der HIV-Infektion einen Vorteil. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Transplantatabstoßung nach Nierentransplantationen bei Trägern der $\Delta 32$ -Variante von CCR5 deutlich verringert war (Fischereder, Luckow et al. 2001).

Da Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle in Entzündungsprozessen spielen, wurden sie auch auf Variationen untersucht, die mit Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA) verknüpft sein könnten. Bei der systematischen Untersuchung der codierenden Regionen von CCR3, CCR4, CXCR1, CXCR2 und CXCR3 wurden zwar zahlreiche neue Varianten aufgedeckt, aber keine dieser Varianten war mit RA assoziiert (Kato, Tsuchiya et al. 1999; Kato, Tsuchiya et al. 2000).

3.6 Zielsetzung

Bei Leukämien und Lymphomen entstehen aus entarteten Lymphozyten maligne Zellen. Bei vielen Leukämien sind genetische Ursachen als Auslöser der Veränderung bekannt. So kommt es häufig zu chromosomalen Veränderungen wie Translokationen und Deletionen, die eine veränderte Aktivität von Protoonkogenen nach sich ziehen. Bei den malignen Tumorzellen bleiben viele der Eigenschaften der ursprünglichen Zelle erhalten. Hierzu gehört in vielen Fällen auch die Expression von Chemokinrezeptoren. Die Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und CXCR5 steuern die Wanderung von Lymphozyten und werden in Abhängigkeit des entarteten Zelltyps auch auf den malignen Leukämiezellen exprimiert (Burger and Kipps 2002; Barretina, Junca et al. 2003; Ghobrial, Bone et al. 2004; Lopez-Giral, Quintana et al. 2004). Deshalb ist ein Einfluss dieser Rezeptoren auf Prozesse wie Metastasierung und Lokalisation der Tumorzellen wahrscheinlich. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass genetische Veränderungen zu einer veränderten Signaltransduktionsaktivität der Rezeptoren führen und so auch zur Entstehung der Tumoren beitragen können. Ob genetische Veränderungen dieser Chemokinrezeptoren eine Rolle bei der Entstehung und Progression von Leukämien und Lymphomen spielen, ist bisher ungeklärt. Deshalb sollte die genetische Variabilität von CCR7, CXCR4 und CXCR5 in der kaukasischen Population analysiert und ein möglicher Zusammenhang mit verschiedenen Formen von Leukämien geprüft werden. Hierzu sollten bei Proben von Leukämiepatienten und gesunden Kontrollpersonen die Promotorbereiche, codierende Regionen und Intro-Exon-Übergänge der drei Gene mittels Multiplex-Sequenzvergleich untersucht werden. Die funktionelle Relevanz der gefundenen Varianten sollte experimentell geprüft und eine mögliche Assoziation von Varianten mit bestimmten Leukämien statistisch analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Probenmaterial

Bei dem untersuchten Material handelte es sich um genomische DNA. Diese wurde aus weißen Blutzellen von Patienten isoliert, welche an verschiedenen hämatopoetischen Tumorerkrankungen litten. Hierbei handelte es sich um verschiedene Formen von Leukämie und Lymphomen: Akute myeloischen Leukämie (AML); akute lymphatischen Leukämie (ALL); chronisch myeloische Leukämie (CML); chronische lymphatische Leukämie (CLL); Non-Hodgkin-Lymphom (NHL). In Tabelle 1 ist dargestellt, welche Häufigkeiten die Erkrankungen in der Gruppe der 135 untersuchten Patienten hatten. Die Proben wurden im Rahmen einer multizentrischen Studie, an der die Robert-Rössle-Klinik Berlin-Buch unter Leitung von Prof. W. Ludwig beteiligt war, mit dem Einverständnis der Patienten gesammelt.

Tabelle 1 Zusammensetzung der Patientenproben nach der Häufigkeit der verschiedenen hämatopoetischen Erkrankungen.

Erkrankung	Anzahl der Proben
ALL	29
AML	42
CML	1
CLL	43
NHL	13
Immunozytom	6
Reakt. Veränderungen	1
Summe	135

Als Kontrollgruppe stellten sich 48 Personen aus dem Raum Berlin-Brandenburg zur Verfügung. Die genomische DNA dieser Personen wurde entweder aus Blutproben oder aus Speichelproben isoliert.

Alle untersuchten Probanden gehörten ethnisch gesehen zur weißen kaukasischen Bevölkerungsgruppe.

4.1.2 Gensequenzen

Die DNA-Sequenzen von CCR7, CXCR4 und CXCR5 wurden aus den Sequenzdatenbanken GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>) sowie der Genom-Datenbank des Sanger Institute (<http://www.ensembl.org>) bezogen. Die Referenzsequenzen für CCR7 und CXCR5 sind im Anhang angegeben. Als Referenzsequenz für CXCR4 diente die unter AF005058 bei EMBL abgelegte Sequenz (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/emblfetch?AF005058>, Caruz, Samsom et al. 1998; Wegner, Ehrenberg et al. 1998).

4.1.3 Zelllinien

Die funktionellen Untersuchungen wurden in vitro an den unten aufgeführten Zelllinien durchgeführt. In allen Fällen handelte es sich um adhärent wachsende Zellen, die standardmäßig in der Zellkultur verwendet werden.

Zelllinien:

- HEK 293 humane embryonale Nierenzellkarzinomzelllinie
- HEP 2 Leberkarzinomzelllinie
- CHO K1 *chiniese hamster ovary* Klon K1

Diese Linien bieten den Vorteil, dass sie durch Standardmethoden mit einer hohen Effizienz transformiert werden können.

4.1.4 Bakterienstämme

Klonierungsarbeiten mit Plasmid DNA wurden, wenn nicht speziell vermerkt, in chemokompetenten *E. coli*, DH5 α , subcloning eff. (Gibco Invitrogen) durchgeführt.

4.1.5 Plasmide

Zur Umklonierung der vorhandenen cDNA wurde pBlueskript[®] verwendet, da dieses Plasmid eine blau/weiß Färbung zur Identifizierung positiver Kolonien erlaubt. Als Expressionsvektoren wurden pRC/CMV[®] (Stragtagene) und pcDNA3.1[®] (Invitrogen) eingesetzt. In beiden Fällen wird die Expression der rekombinanten cDNA durch den ‚cytomegalovirus early promotor‘ (CMV-Promotor) gesteuert. Es handelt sich hierbei um einen in Säugerzellen konstitutiv aktiven Promotor, der zu einer hohen Expression des rekombinanten Gens führt.

4.1.6 Materialien, Chemikalien und Enzyme

Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA:	Zentrifugationsröhrchen, 15 und 50 ml
Biochrom AG, Berlin:	Phosphat-Buffered-Saline (PBS); Trypsin
Bio-Rad, München:	Kaleidoskop Proteinmarker
BIOTEZ, Berlin:	Oligonukleotide
Biozym, Hess. Oldendorf:	GTG Agarose; PCR-Reaktionsgefäße
Boehringer, Mannheim:	dNTP; EDTA; KCL; Tris; Tris-HCL; Alkalische Phosphatase
Eppendorf, Hamburg:	Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml
Carl Roth GmbH, Karlsruhe:	Ethidium-Bromid; NaCl; NEEO Agarose; Rotiphorese 40; SDS; Phenol; Rotiphorese 30; Tween 20
Chemicon, Temecula, USA:	BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat; NBT, p-nitro blau Tetrazolium
DIFCO, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA; :	Agar-Agar; Bacto-Trypton; Hefe-Extrakt
Eurogentec, Seraing, Belgien:	SmartLadder, DNA Größenstandard
Gibco Invitrogen, Karlsruhe:	DMEM; G418; Penicillin/Streptomycin
Glücksklee:	Magermilchpulver
InViTek, Berlin:	CombiPol DNA Polymerase
Invitrogen, Karlsruhe:	Pfu DNA Polymerase
Merck, Darmstadt:	Borsäure; Chloroform; Glucose; Glycin; Harnstoff, Ultragrade; Isoamylalkohol; Kaliumacetat; MgCl ₂ ; CaCl ₂ ; Eisessig; H ₃ PO ₄
Millipore, Billerica, MA, USA:	Microcon 100
Molecular Probes, Leiden, Niederlande:	FURA-2/AM
Nalgene, Serijse, Belgien:	Sterilfilter, 0,2µm
NEN, PerkinElmer, Boston, MA, USA:	α ³² P-dATP
New England Biolabs, Beverly, MA, USA:	Apa I; BamHI; T4 Ligase; Xba I
PALL, Dreieich:	Nylon-Membran Biodyne A1.2µm
Promega, Mannheim:	Dual-Luziferase-Assay
Qiagen, Hilden:	Gelextraktion Kit; Plasmid Reinigungs Kit (Mini und Maxi); Qiagen, Hilden Blood Kit; Qiagen, Hilden Tissue Kit; QIAquick 96 PCR Aufreinigungs-Kit
Roche, Basel, Schweiz:	Fugene6
Serotec, Berlin:	Fötale Kälberserum, FKS
Serva, Heidelberg:	Ampicillin; APS; Ethanol; Glycerin; Methacrylpropyltrimethoxysilan; Na ₂ -EDTA; Orange G; TEMED
Sigma-Aldrich, München:	Digitonin; Paraformaldehyd; Ziege-anti- Ratte-Antikörper-AP-Konjugiert; Na ₂ HPO ₄ ; NaOH; Polyethylenglycol, PEG
Stratagene, La Jolla, CA, USA:	Path-Detect-Elk1-reporting System
Thermo DAKO Cytomation, Dreieich:	Esel-Anti-Ratte-FITC
TPP, Trasadingen, Schweiz:	Zellkulturgefäße
USB Amersham, Piscataway, NJ, USA:	Formamid; TdT; Thermosequenase Cycle Sequencing Kit; Xylen-Cyanol

4.1.7 Geräte

AGS, Heidelberg:	Horizontalelektrophorese Kammer
Beckmann Coulter GmbH, Krefeld:	Zentrifuge J2-21
Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA:	CellQuest; FACS Vantage; FACSScan; Vacutainer
Berthold, Bad Wildbad:	Lumat 9507
Bio-Rad, München:	Mini-Gel-Elektrophoreses-System; UV- Spektrometer
CONSORT, Turnhout, Belgien:	Spannungsversorgung E752
DNASar Inc., Madison, WI, USA:	DNASar
Eppendorf, Hamburg:	Tischzentrifuge
Hamilton, Bonaduz, Schweiz:	8-Kanal Micro-Pipette
Harvard Machine Shop, Boston, USA:	Direkttransfer-Elektrophorese-System
Heraeus, Deutschland:	Megafuge 1.0, Zentrifuge; Megafuge 3.0, Zentrifuge
Herolab GmbH, Weisloch:	E.S.A.Y. Geldokumentationssystem
Kodak, Stuttgart:	Storage Phosphor Screen
Leica, Mannheim:	Laserscanning Mikroskop, LSM I
MJ Research, Reno, NV, USA:	Peltier Thermal Cycler PTC 225
Molecular Dynamics Amersham, Piscataway, NJ, USA :	ImageQuaNT 4.0; Storm 860, Phosphor- Imager
MYTRON, Heilbad Heiligenstadt:	Hybridisierungs-ofen
PerkinElmer, Boston, MA, USA:	GenAmp 9600, PCR Thermal Cycler
Scientific Industries Inc., Philadelphia, PA, USA:	Vortex Genie 2
Shimadzu, Duisburg:	Fluorimeter
Sigma-Aldrich, München:	Vakuumzentrifuge
Stratagene, La Jolla, CA, USA:	UV-Crosslinker
Thermo HAAKE, Dreieich:	Wasserbad
UIT, Dresden:	Membran-Waschautomat
Verity Software Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA:	Winlist, Analysesoftware

4.2 Methoden

4.2.1 Isolation genomischer DNA

4.2.1.1 Isolation genomischer DNA aus Tumormaterial

Bei dem Probenmaterial der Patienten handelte es sich um Aliquots der aus dem Blut gewonnenen Zellfraktionen, die zur klinischen Diagnostik verwendet wurden. Auf Grund der starken Vermehrung bestimmter Zellpopulationen bei der Leukämie, enthielten die Proben viele Tumorzellen.

Die DNA wurde unter Verwendung des ‚Mini Blood Kit‘ (Qiagen) oder des analog verwendbaren Tissue Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Von dem Probenmaterial wurden 200 µl in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 200 µl des im Kit enthaltenen Puffer AL vermischt und mit 20 µl Proteinase versetzt. Durch schütteln auf einem Vortex Genie 2[®] (Scientific Industries Inc) wurde eine homogene Mischung erzielt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 70°C im Wasserbad wurde das Gemisch auf die im Kit enthaltene ‚Spin column‘ gegeben und für zwei Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule zweimal mit 500 µl Puffer AW (Kit) gewaschen. Dabei wurde jeweils 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert, das Eluat jeweils verworfen. Anschließend wurde nochmals für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert um ein vollständiges Abtrocknen des im Säulenmaterial verbliebenen Ethanol zu erreichen, da dieses nachfolgende Reaktionen behindern könnte. Anschließend wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die genomische DNA mit 200 µl Puffer AE (10mM Tris, pH 8,5) eluiert.

4.2.1.2 Isolation genomischer DNA aus Blut

Die Isolation genomischer DNA aus Vollblut ist prinzipiell möglich. Da aber der Anteil an kernhaltigen Zellen im Blut nur gering ist, wurde hier zunächst der Buffy Coat aus dem Blut isoliert und dieser nachfolgend zur Präparation verwendet. Blut lässt sich durch Zentrifugation in drei Phasen trennen. In der unteren Phase sammeln sich die Erythrocyten, darauf bildet sich eine dünne Schicht aus kernhaltigen Leukozyten, während die obere Phase aus Serum besteht. Mit einer Eppendorfpipette wurden 200 µl der dünnen Zwischenschicht abgesaugt, und die Präparation der DNA erfolgte auf die gleiche Weise

wie im Fall des Materials der Patientenproben. Als Antikoagulant wurde dem Blut direkt bei der Blutabnahme EDTA zugesetzt (Vacutainer, Becton Dickinson).

4.2.1.3 Isolation genomischer DNA aus Speichel

Da zur Gewinnung genomischer DNA alle kernhaltigen Körperzellen eingesetzt werden können, bietet sich gerade für Kontrollzwecke Speichel als Quelle an (van Schie and Wilson 1997). Anders als bei Blutproben kann hier auf invasive Maßnahmen verzichtet werden, da sich im Speichel ausreichend viele Zellen der Mundschleimhaut befinden. Für die Isolation wurden 5 ml Speichel in einem 50 ml Falconzentrifugenröhrchen gesammelt. Es war lediglich darauf zu achten, dass der Spender 15 min vor Beginn den Mund gründlich mit Wasser spült, um eventuelle Speisereste zu entfernen. Der Speichel wurde mit 20 ml PBS versetzt und gründlich durchmischt. Durch Zentrifugation bei 2000 rpm in einer Heraeus Megafuge 1.0 wurden die Schleimhautzellen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nochmals mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend in 200 µl PBS aufgenommen. Die Präparation wurde nun wie für das Tumormaterial beschrieben fortgesetzt (4.2.1.1).

4.2.2 ‚Multiplex Sequence Comparison‘

Die Sequenzierung von Genen oder Genabschnitten in einer großen Anzahl von Individuen ist ein aufwendiges und kostenintensives Unterfangen. Mit konventionellen Methoden und selbst mit modernen Sequenzierautomaten ist dies nur mit einem enormen Aufwand an Zeit und Geld zu bewerkstelligen. Die Methode des ‚Multiplex Sequence Comparison‘ ermöglicht eine Reduzierung des Aufwandes bei gleichbleibender Qualität der Untersuchung. Durch die Zusammenführung der Proben bei der Sequenzierreaktion sowie der nachfolgenden Auftrennung über eine Gelelektrophorese kann Aufwand erheblich vermindert werden.

Das ‚Multiplex DNA Sequencing‘ wurde von G. Church etabliert (Church and Kieffer Higgins 1988). Mittels der Sanger-Sequenzierung, die auf Kettenabbruchreaktionen beruht (Sanger, Nicklen et al. 1977), wurden multiple unbekannte Fragmente, die in verschiedene Plasmid-Vektoren kloniert waren, gleichzeitig in einer Reaktion sequenziert. Dieses Protokoll wurde von M.R. Hoehe zur PCR basierten Sequenzierung multipler Gene oder Genabschnitte modifiziert (Hoehe, Kopke et al. 2000).

'Multiplex Sequence Comparison'

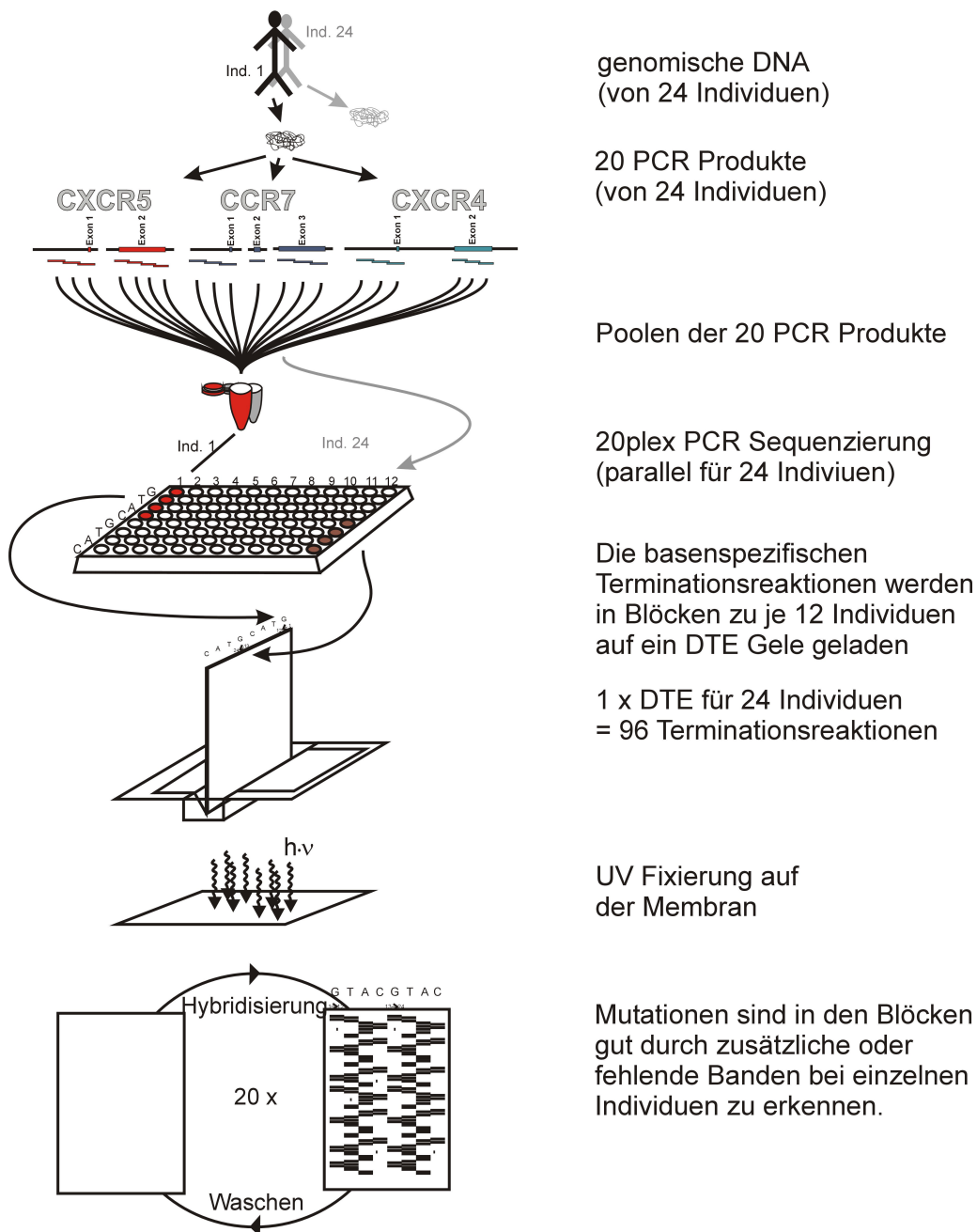


Abb. 2 Schema des ‚Multiplex Sequence Comparison‘

Zur Untersuchung der genomischen Sequenz wurden von jeder Probe 20 bzw. 21 PCR Produkte hergestellt. Diese 20 bzw. 21 PCR Produkte wurden vereinigt und anschließend in einer Multiplex-Sequenzierreaktion sequenziert. Die Sequenzreaktionen von 24 Proben wurden auf einem Direkttransfer-Elektrophorese (DTE)-Gel aufgetrennt und die Sequenz mittels radioaktiver Hybridisierung detektiert.

Die Gene oder Genabschnitte, die untersucht werden sollten, wurden per PCR an genomischer DNA amplifiziert. Je nach Struktur der untersuchten Gene können diese

PCR-Fragmente ca. 400 bp bis einige kbp groß sein. Diese PCR-Produkte wurden für jedes einzelne Individuum gemischt und aufgereinigt.

In einer Sequenzierreaktion mit multiplen Sequenzierprimern wurden diese Produkte sequenziert, wobei die Reichweite jedes einzelnen Sequenzierprimers technisch bedingt ca. 400 bp betrug. Diese Sequenzierreaktion wurde über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und hierbei direkt auf eine Nylonmembran transferiert (Direkttransfer-Elektrophorese, DTE). Anschließend wurde die DNA durch UV-Licht auf der Nylonmembran fixiert. Zur Detektion der Sequenzierreaktion jedes einzelnen Sequenzierprimers wurde die Membran mit genspezifischen radioaktiv markierten Oligonukleotiden hybridisiert und mit Röntgenfilmen oder einem Storm 860 Phosphor-Imager[®] (Molecular Dynamics) visualisiert. Die radioaktiven Oligonukleotide wurden danach abgelöst und ein neuer Zyklus der Detektion konnte beginnen. Diese Zyklen wurden so oft wiederholt, bis die Reaktionen aller verwendeten Sequenzierprimer detektiert waren (Abb 2).

4.2.3 Anwendung des ‚Multiplex Sequence Comparison‘ auf die Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7

4.2.3.1 Design der Multiplex-Poole

Die Struktur der zu untersuchenden Gene spielte eine wesentliche Rolle bei der Anwendung des ‚Multiplex Sequence Comparison‘. Im Fall von CXCR4 und CXCR5 besteht das Gen jeweils aus zwei Exons und einem Intron, während bei dem CCR7-Gen drei Exons und zwei Introns vorliegen. Die Verwendung von PCR-Produkten, welche größer als 400 bp waren, schien zunächst nicht zweckmäßig, da die maximale Lesereichweite der DTE-Gele ca. 400 bp betrug. Demnach basierte das Design der Multiplex-Poole, in denen jeweils der codierende bzw. der komplementäre Strang aller drei Gene sequenziert wurde, auf PCR-Fragmenten von ca. 400 bp, die einander um wenige Basenpaare überlappten bzw. aneinander stießen. Die PCR-Fragmente des Multiplex-Pools, mit dem der komplementäre Strang sequenziert wurde (R-Pool) waren dabei jeweils um ca. 200 bp versetzt zu denen, des Multiplex-Pools für den codierenden Strang (F-Pool). Auf diese Weise wurden mit zwei Sequenzierreaktionen ca. 6.7 kbp je Individuum untersucht. Im Fall des F-Pool wurden 20 PCR-Fragmente und Sequenzierprimer verwendet, für den R-Pool lag der Plexfaktor bei 21. Abb. 3 stellt schematisch die Aufteilung der untersuchten Bereiche drei Gene dar.

Für die Auswahl der Primer wurde das Programm Primerselect[®] aus dem DNASTAR[®] Paket der Firma Lasergene verwendet. Die Suche wurde unter den Standardeinstellungen bei Zulassung von Dimer- und Haarnadelbildung bis drei bp durchgeführt.

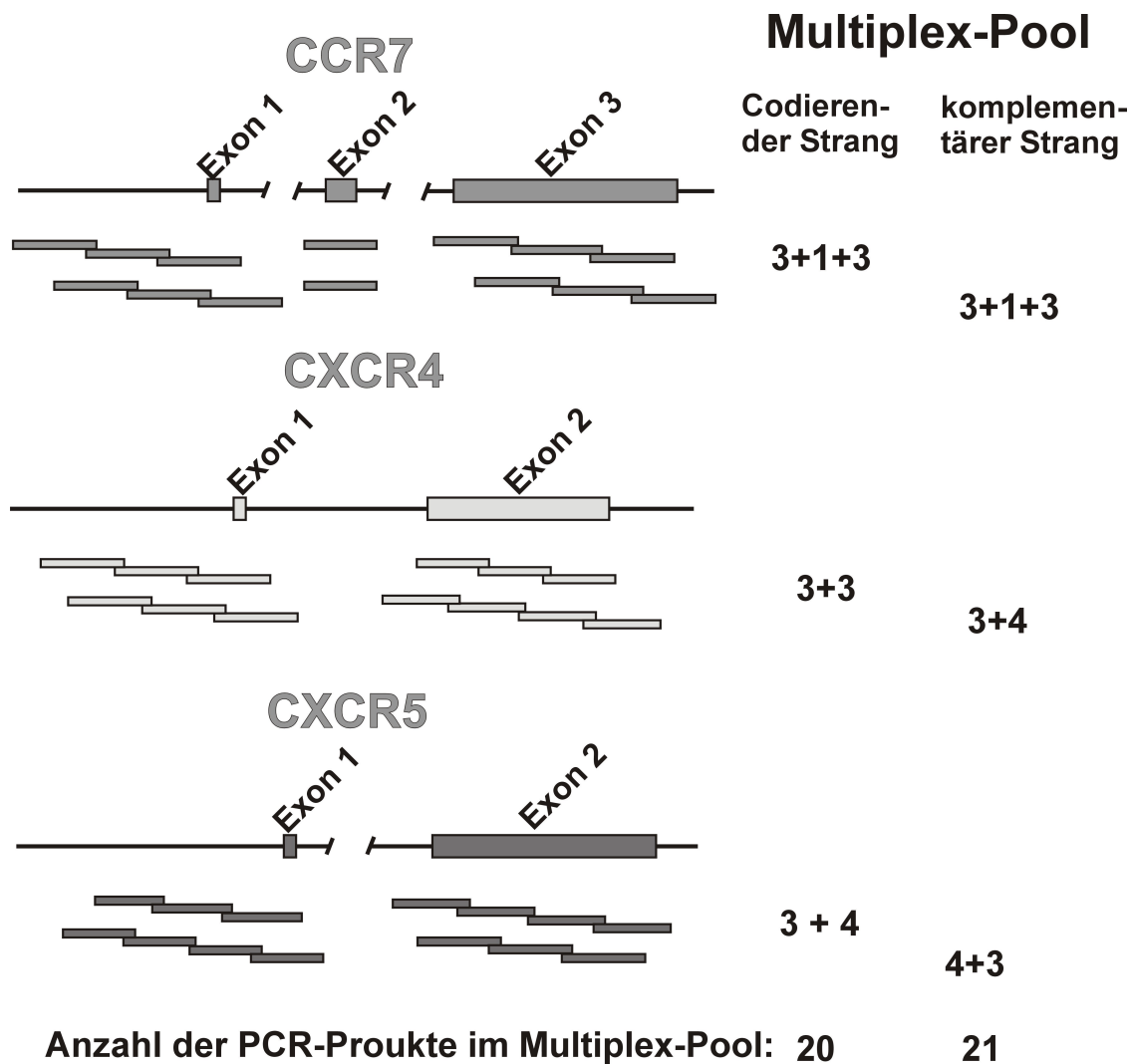


Abb. 3 Aufteilung der sequenzierten Genabschnitte in PCR-Produkte

Die 5'-regulatorische, codierende und 3'-untranslatierte Region sowie die Übergänge von Intron zu Exon der drei Gene wurden mit 20 PCR-Produkten für den codierenden und 21 PCR-Produkten für den komplementären Strang an genomischer DNA amplifiziert. Die Lage der PCR-Produkte in der Sequenz ist durch die Balken symbolisiert

4.2.3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde 1986 von K. Mullis erstmals erfolgreich durchgeführt (Mullis, Faloona et al. 1986). Abschnitte genomischer DNA oder einer anderen DNA-Matrize werden durch zwei flankierende Oligonukleotide amplifiziert. Durch Erhitzen auf 94-95°C wird der Doppelstrang der Matrize getrennt. Die Temperatur wird dann so weit erniedrigt, dass die kurzen Oligonukleotide spezifisch an die Einzelstränge binden können (engl. *Annealing*). Die Oligonukleotide werden durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei 68-72°C in 3' Richtung verlängert, bis über den Punkt hinaus, an dem der flankierende Primer des Gegenstrangs binden kann (Extension). Die neu entstandenen Doppelstränge werden wiederum durch Temperaturerhöhung getrennt. Der neu synthetisierte Strang steht jetzt ebenfalls als Matrize zur Verfügung. Da hierdurch im Prinzip eine logarithmische Amplifikation möglich ist, bei der aber die Position der beiden Primer zueinander von entscheidender Bedeutung ist, können auf diese Weise hoch spezifisch DNA-Abschnitte vermehrt werden, so dass sie zu einer weiteren Untersuchung zur Verfügung stehen.

Die, für die Multiplex-Sequenzierung verwendeten, PCR-Fragmente wurden alle in einer Dreischritt-PCR aus einem Denaturierungsschritt bei 94°C, einem Annealingschritt bei variabler T_A und einem Extensionschritt bei 72°C amplifiziert. Die PCR-Reaktionen wurden mit einer Standard Taq-Polymerase (aus eigener Herstellung) an ca. 100 ng genomischer DNA in einem 50 µl Ansatz durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in den Tabellen I und II im Anhang aufgeführt.

Ein typischer PCR-Ansatz war wie folgt zusammengesetzt:

100 ng genomische DNA	10,0 µl
30 pmol 5'-Primer [20µM]	1,5 µl
30 pmol 3'-Primer [20µM]	1,5 µl
10fach PCR Puffer	4,5 µl
dNTP's [je 2mM]	5,0 µl
ddH ₂ O	17,5 µl

Dieser Ansatz wurde in einem Heißstart zunächst vier Minuten auf 94°C erhitzt und dann auf 88°C temperiert. Durch die Zugabe des ‚Taq-Mix‘ wurde die Reaktion gestartet.

Taq-Mix	5 U Taq DNA Polymerase	1,0 µl
	10fach PCR Puffer	0,5 µl
	ddH ₂ O	8,5 µl

Nach Zugabe des Taq-Mixes begann die PCR Reaktion mit dem Denaturierungsschritt. In der Regel wurden 35 Amplifikationszyklen durchgeführt. Abweichungen sind im Anhang in Tabelle III, in der die Bedingungen aller PCR-Reaktionen aufgeführt sind, vermerkt.

10x PCR Puffer:	Tris-HCl	100 mM
	MgCl ₂	15 mM
	KCl	500 mM
	pH	8.3

4.2.3.3 Horizontal - Gelelektrophorese

Die Qualität und Quantität der PCR-Produkte wurde in einer Horizontal-Gelelektrophorese bestimmt. Hierzu wurden 3 µl der PCR-Reaktion mit 3 µl Auftragspuffer vermischt und auf einem 2% Agarosegel (NEEO[®] Agarose, C. Roth, Deutschland) bei 140 Volt in einer Centipede[®] Gelkammer (AGS, Heidelberg) aufgetrennt. Als quantitaiver Größenmarker wurde die Smartladder[®] (Eurogentec) verwendet. 250ml Agarosegellösung wurden mit 15 µl Ethidium-Bromid [1%] (C. Roth, Deutschland) gefärbt. Als Laufpuffer wurde DTE-TBE verwendet. Die aufgetrennten PCR-Produkte wurden anschließend auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht.

10 X DTE-TBE Buffer	Borsäure	52.4 g
	Na ₂ -EDTA	18.0 g
	ddH ₂ O	1620.6 g
Auftragspuffer	Orange G	0,05% (w/v)
	Glyzerin	50% (v/v)
	1xTBE	50% (v/v)

4.2.3.4 Reinigung der PCR-Produkte

Für die Multiplex-Sequenzierung mussten nach der PCR die Primer sowie Salze und verbliebene dNTPs abgetrennt werden. Hierzu wurden je 150 ng PCR-Produkt aller 20 bzw. 21 PCR-Produkte eines Individuums vermischt und gemeinsam mit dem PCR Purification Kit 96[®] (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers mit einem zusätzlichen Schritt gereinigt.

Die PCR-Produkte werden mit 5 Volumen Puffer PB versetzt und gemischt. Mit einer Vakuumpumpe wurde das Gemisch durch das Säulenmaterial gesaugt. Es folgten zwei Waschschrte mit je 900 µl Puffer PW. Zusätzlich zu den Angaben des Herstellers wurden die 96-Well Kassetten kurz in einer Zentrifuge mit Microtiterplatteneinsatz zentrifugiert

(2000rpm, 1 min), um Tropfen von Puffer PW abzuschleudern. Danach wurde zum Trocknen des Säulenmaterials 10 min maximales Vakuum an die Kassette angelegt. Die gepoolten PCR-Produkte wurden mit 60 µl Puffer EB eluiert, wobei man ein Endvolumen von 30 µl erhielt.

4.2.3.5 Multiplex-Sequenzierung

Die Multiplex-Sequenzierung wurde mit dem Thermosequenase-Kit[®] (Amersham) durchgeführt. Hierbei wurde im Wesentlichen nach den Angaben des Herstellers verfahren. Um Bandenkompressionen während der Gelelektrophorese zu vermeiden, wurden nur die im Kit vorhandenen 7-deaza GTP Nukleotidgemische in den Terminationsreaktionen benutzt. Von den gereinigten PCR-Produkten wurden 10 µl zur Sequenzierung verwendet; das entsprach in etwa der üblichen Menge von 40-50 ng pro 400 bp. Je Sequenzierprimer wurden 0,5 pmol eingesetzt. Die PCR-Produkte, Enzym, Reaktionspuffer sowie die Mischung der Sequenzierprimer wurden in einem Gesamtvolumen von 17,5 µl zu einem Mastermix vermischt. Ein typischer Ansatz sah wie folgt aus:

10,0 µl	gereinigte PCR Produkte
2,0 µl	Thermosequenase [®]
2,0 µl	Reaktionspuffer
1,0 µl	Sequenzierprimermix, 0,5 µM je Primer
<u>2,5 µl</u>	<u>ddH₂O</u>
17,5 µl	Gesamtvolumen

Die Terminationsmischung des Kits enthielt die vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP), sowie jeweils eines der Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP) im Verhältnis 1:100 zum entsprechenden dNTP. Je 4 µl der Terminationsmischungen wurden in einer 96-Well PCR-Platte vorgelegt und dann mit je 4 µl des Mastermixes durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vermischt. Bei der verwendeten Thermosequenase handelte es sich um eine modifizierte Polymerase. Sie diskriminierte ddNTPs im Einbau nicht gegenüber dNTPs und musste durch eine Inkubation bei 95°C zunächst aktiviert werden. Dies ermöglichte einen Heißstart der Reaktion trotz vorheriger Enzymzugabe. Die Bedingungen waren für beide Sequenzierpools gleich:

	4 min	95°C	Enzymaktivierung und Matrizendenaturierung
50 Zyklen	30 sec	95°C	denaturieren
	30 sec	55°C	„Annealing“
	60 sec	72°C	Kettenverlängerung
	∞	4°C	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 µl, des im Kit enthaltenen Stop-Mixes beendet. Neben den Farbstoffen Bromphenolblau und Xylencyanol enthielt der Puffer EDTA, wodurch die Reaktion gestoppt wurde, sowie 50% Formamid, das zur Denaturierung der Probe und der Auflösung von Sekundärstrukturen beitrug.

4.2.3.6 Direkt-Transfer-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Sequenzierprodukte erfolgte über eine Direkt-Transfer-Gelelektrophorese (DTE). Hierbei wurden die Produkte der Sequenzierreaktion der Länge nach über ein ultradünnes Polyacrylamidgel (PAA-Gel) getrennt. Die Stärke des Gels betrug 0,125 mm. Die Sequenzierprodukte wurden über die gesamte Länge des Gels aufgetrennt und an der Unterkante direkt auf eine Nylonmembran transferiert. Diese Membran lag auf einem Nylonnetz, das durch einen Schrittmotor über zwei Walzen langsam transportiert wurde. Der Transfer war in zwei Geschwindigkeitssegmente aufgeteilt, um einen gleichmäßigen Abstand der Banden zu erhalten. Im ersten Segment betrug die Geschwindigkeit 11 cm pro Stunde für eine Strecke von 15 cm. Der Rest des Transfers wurde mit 8 cm pro Stunde durchgeführt. Für die DTE wurden spezielle Glasplatten verwendet, die an der Unterseite eine abgerundete Kante besaßen. Diese Kante wurde bei jedem Plattenpaar von Hand geschliffen, um einen möglichst schmalen Spalt zu erhalten. Eine Glasplatte besaß eine Aussparung an der Oberkante, in die der Kamm eingesetzt wurden. Auf beide Glasplatten waren Pufferkammern aufgesetzt, in die der Elektrophoresepuffer, bzw. dH₂O eingefüllt wurde. In die Pufferkammern wurden PE-Schläuche, welche in Schlangen auf eine starke Plastikfolie geklebt waren, eingesetzt. Diese dienten zur Temperaturregelung des Gels. Sie waren an einen Wasserkreislauf angeschlossen, der auf 55°C temperiert wurde.

PAA-Gel	450 mm X 450 mm X 0,125 mm	
	Polyacrylamid (1: 39 Crosslinkerratio)	5 % (w/v)
	Harnstoff	7 M
	in 1x DTE-TBE	

Zur Herstellung der Gellösung wurden 63 g Harnstoff (Merck, Ultragrade) mit 15 ml 10xDTE-TBE und 18,75 ml Polyacrylamidlösung Rotiphorese 40[®] (40% Acrylamid 1:39 Crosslinkerratio, C. Roth) versetzt und auf ca. 140 ml mit ddH₂O aufgefüllt. Die Lösung wurde für 30 s in der Mikrowelle bei 900 W erwärmt, damit sich der Harnstoff vollständig lösen konnte. Hiernach wurde die Lösung auf das Endvolumen von 150 ml mit ddH₂O aufgefüllt und durch einen 0,2 µm Sterilfilter (Nalgene) gefiltert. Die Gellösung konnte im Kühlschrank 3 bis 4 Tage gelagert werden. Zur Auslösung einer langsamen Polymerisation wurden 70 ml Gellösung mit 56 µl TEMED (Merck) und 196 µl 10% APS versetzt und durch vorsichtiges Rühren vermischt.

Um das Laufverhalten der DTE-Gele zu verbessern und ein frühes Ablösen des PAA-Gels von den Glasplatten zu verhindern wurden beide Glasplatten mit einer Methacryloxypropyltrimethocysilane-Lösung (Haft-Silan) vorbehandelt. Hierzu wurden die Glasplatten mit 2ml Haft-Silan eingerieben und für 5 min getrocknet.

Haft-Silan:	Methacryloxypropyltrimethocysilan	0.5 ml
	Essigsäure	0.3 ml
	Ethanol	100 ml
	ddH ₂ O	3 ml

Die fertige Gellösung wurde auf die untere horizontal liegende Platte gegossen und die obere Platte dann langsam luftblasenfrei aufgelegt. Der glatte Vorkamm wurde zuvor mit Klebeband ca. 0,4 mm unterhalb der Kante der oberen Glasplatte befestigt. Die Polymerisation war nach zwei Stunden abgeschlossen, in der Regel verlief sie jedoch über Nacht. Als Probenkamm kam ein Sägezahnkamm mit ca. 100 Zähnen zum Einsatz.

Die abgestoppten Sequenzierreaktionen wurden zunächst 5 min bei 70°C im Wasserbad denaturiert und dann auf Eis gelagert. Nach einem 30 minütigen Vorlauf wurden 1,2 µl je Sequenzierreaktionen mit einer 8-Kanal Hamilton-Pipette aufgetragen. Hierbei wurden die spezifischen Terminationsreaktionen von je zwölf Individuen nebeneinander aufgetragen, so dass Blöcke von je zwölf, G-, T-, A- und C-Terminationsreaktionen entstanden. Dadurch wurde die spätere Auswertung deutlich erleichtert, da Variationen, die bei einzelnen Individuen auftraten, als zusätzliche oder fehlende Banden in den Zwölferblöcken zu erkennen waren.

Die noch leicht feuchten Nylonmembranen wurden zum fixieren der DNA auf der Nylonmembran in einem Stratalinker[®] (Stratagene) mit UV Licht mit ca. 4kJ /cm² bestrahlt.

4.2.3.7 Detektion der Multiplex - Sequenzierreaktionen

Zur Detektion der einzelnen Sequenzierreaktionen der beiden Multiplexpools wurden sequenzspezifische Oligonukleotide verwendet. Diese wurden mit radioaktivem α -ATP markiert. Die Hybridisierung der Oligonukleotide erfolgte in der Regel über Nacht. Nach dem Abwaschen ungebundener Oligonukleotide wurden die Membranen auf Phosphor Storage Screens[®] (Kodak) für 12-36h exponiert. Die Screens wurden dann mit einem Storm Phosphor Imager 860[®] (Molecular Dynamics) gescannt und die Bilddaten elektronisch gespeichert.

4.2.3.7.1 Oligonukleotidmarkierung

Die Oligonukleotidsonden wurden durch eine terminale Desoxynukleotidtransferase (TdT, Boehringer) mit radioaktivem ^{32}P α -ATP (NEN) markiert. Da sich von jeder einzelnen Sequenzierreaktion relativ wenig Material auf der Membran befand, wurde ein ^{32}P α -ATP (NEN DuPont) mit einer hohen spezifischen Aktivität von 6000 μCi verwendet (im Gegensatz zur Standardaktivität von 3000 μCi).

Markierungsansatz: Oligonukleotid (10 μM = 10 pmol)	1 μl
TdT Reaktionspuffer	2 μl
ddH ₂ O	3,5 μl
TdT	1 μl
^{32}P α -ATP	2,5 μl

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend direkt in den Hybridisierungspuffer gegeben.

4.2.3.7.2 Hybridisierung der Multiplex-Sequenzierungen

Die zur Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide sind in den Tabellen I und II im Anhang aufgelistet. Wenn die Qualität der Hybridisierung es zuließ, lag die Sonde einige Basen vor dem Sequenzierprimer. Da hier in manchen Fällen aber kein befriedigendes Ergebnis zustande kam, wurde als Alternative die Sonde komplementär zum Sequenzierprimer gelegt.

Die Nylonmembranen wurden in Glasröhren hybridisiert. Dazu wurde eine Membran alleine oder zwei Membranen mit einem Gazenetzt dazwischen mit Hybridisationspuffer befeuchtet und aufgerollt. Die Rolle wurde in die Glasröhre geschoben und an der Wand der Röhre abgerollt. Dann wurden 25 ml Hybridisationspuffer hinzugefügt, und die fest verschlossene Röhre wurde für 30 min zur Prähybridisierung bei 42°C im Rollofen inkubiert. Hiernach wurde der Puffer abgekippt und durch 10 ml des mit der markierten

Sonde versehenen Hybridisationspuffers ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C im Rollofen. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Hybridisierungslösung wieder in ein Falconröhrchen zurückgekippt. Die Lösung konnte ohne sichtbaren Qualitätsverlust innerhalb einiger Tage für eine zweite Hybridisierung verwendet werden.

Die Membranen wurden in einem Waschautomaten (UIT) bei Raumtemperatur gewaschen. Es konnten bis zu 16 Membranen zugleich gewaschen werden. Der Automat pumpte definierte Mengen Puffer hinzu, inkubierte die Membranen für eine frei wählbare Zeit unter leichtem horizontalem Schütteln und pumpte die Waschlösung wieder ab. In der Regel wurden 4-6 Zyklen dieser Waschschrte mit einer Inkubationsdauer von je 3 min durchgeführt.

Die gewaschenen Membranen wurden auf einen Kunststoffbogen gelegt und in Folie verpackt auf den Phosphor Storage Screens (Kodak/Molecular Dynamics) für 12-36 h exponiert.

Wenn die Hybridisierung erfolgreich war, wurden die radioaktiv markierten Oligonukleotide wieder von den Membranen abgetrennt. Hierzu wurde ‚Strippuffer‘ in einem Temperierbad auf 72°C erhitzt, technisch bedingt betrug die Temperatur in der Wanne aber nur ca. 55°C, da die Lösung zunächst durch die Zuleitungen des Waschautomaten gepumpt wurde, wo sie sich abkühlte. Nach 4-6 Zyklen konnten die Membranen dann für die nächste Hybridisierung verwendet werden.

Hybridisierungspuffer:	PEG	100 g
	NaCl	14,8 g
	Na ₂ HPO ₄ X 2H ₂ O	14,6 g
	85% H ₃ PO ₄	0,6 ml
	20% SDS	350 ml
	EDTA (freie Säure)	2,9225 g
	NaOH	1,28 g
	Add H ₂ O	1 l
Waschpuffer:	NaH ₂ PO ₄	201 g
	85% H ₃ PO ₄	5,4 ml
	20% SDS	1,05 l
	EDTA (freie Säure)	61,36 g
	NaOH	26,88 g
	Add ddH ₂ O	21 l
Strippuffer:	Tris	121,1 g
	EDTA(free acid)	73,05 g
	20% SDS	200 ml
	Add ddH ₂ O	20L

4.2.3.7.3 Darstellung und Auswertung der Sequenzierreaktion

Die Phosphor Storage Screens wurden mit einem Strom 860 Phosphorimager unter Verwendung des ImageQuaNT-Programmpakets V4.2 (Molecular Dynamics) gescannt und ausgewertet. Die Phosphor Storage Screens haben gegenüber Röntgenfilmen den Vorteil einer deutlich höheren Sensitivität und eines weiten linearen Bereiches. Mittels der ImageQuaNT-Software konnten Bereiche des Bildes vergrößert und im Kontrast angepasst werden. Die Bilder wurden mit 100µm/Zeile gescannt, was einer Auflösung von 254 dpi entspricht.

Sequenzvariationen konnten durch die Gruppierung der Terminationsreaktionen in Blöcken zu je zwölf Individuen als zusätzliche oder fehlende Banden identifiziert werden.

4.2.4 Klonierung ausgewählter Varianten

4.2.4.1 Klonierung von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die Plasmid-DNA ist eine zirkuläre DNA, die einen bakteriellen Replikationsursprung (ori) besitzt. Zur Selektion von Zellen, die das Plasmid besitzen, befindet sich auf dem Plasmid ein Gen, das eine Resistenz gegen ein Antibiotikum (z.B. gegen Ampizillin oder Tetracyclin) vermittelt. Dem Medium, in dem die Bakterien angezogen werden, wird das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt, so dass sich nur jene Zellen vermehren, die auch das Plasmid besitzen. In dem Plasmid können sich noch weitere Sequenzen befinden, die auf diese Weise vermehren werden können.

4.2.4.2 Verwendete Plasmide

Die cDNA von CXCR5 lag bereits kloniert in dem Expressionsvektor pRC/CMV (Stratagene) vor. Die cDNA von CCR7 war bereits in pcDNA3.1 (Invitrogen) kloniert worden. PCR-Produkte, die während der PCR-basierten Mutation der cDNA erzeugt wurden, sind zunächst in pBlueskript[®] und dann später in pRc/CMV bzw. pcDNA3.1 kloniert worden.

4.2.4.3 Anzucht der Plasmid-tragenden Bakterien

Mit 50 µl einer Glyzerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte wurden 5 ml LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, als Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden 500 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit 1 ml der Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37°C mit 120-150 rpm geschüttelt. Durch Zentrifugation bei RT mit 5000 rpm (Beckman J2-21, Rotor JA - 10) wurden die Bakterien zur Ernte pelletiert.

4.2.4.4 Minipräparation von Plasmid-DNA (Alkalische Lyse)

Die Minipräparation von Plasmid-DNA aus 2-5 ml Bakteriensuspension wurde nach einem Protokoll von Birnboim durchgeführt (Birnboim and Doly 1979). Hierbei wurden die unterschiedlichen Eigenschaften von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA in alkalischer Lösung ausgenutzt.

Zur Anzucht der Bakterien wurden 5 bis 10 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 130 rpm geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und für 2 min bei 8000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, und der Vorgang wurde wiederholt. Das Sediment wurde hiernach in 100 µl eiskaltem GTE-Puffer resuspendiert, mit 200 µl einer frisch angesetzten 2% SDS / 0,2 N NaOH Lösung versetzt und durch Umschütteln des Reaktionsgefäßes vorsichtig durchmischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde das Lysat mit 150 µl eiskaltem 3 M Kaliumacetat versetzt, vorsichtig durchmischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Zellwände und daran assoziierte chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Dem Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß ein Vol Phenol:Chlorform:Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1 (v/v)) hinzugefügt und auf einem Vortex-Genie gründlich durchmischt. Die Phasen wurden anschließend durch 5 min Zentrifugation bei 14000 rpm getrennt. Die wäßrige Oberphase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, durch Zugabe von zwei Vol 99 % Ethanol für 5 min bei RT gefällt und 5 min mit 14000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert. Nachdem die DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet worden war, wurde sie in 25-50 µl ddH₂O aufgenommen.

4.2.4.5 Minipräparation von Plasmid-DNA (Kit)

Sollte die Plasmid-DNA direkt zur Sequenzierung oder zu anderen empfindlichen Reaktionen eingesetzt werden, wurde die DNA mittels eines Plasmid-DNA Mini-Kits (Qiagen) isoliert. Auch hier wurden 3 ml einer über Nacht Kultur in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer P1

Material und Methoden

resuspendiert und mit 300 µl Puffer P2 versetzt und durch Umschütteln gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 300 µl eiskalter Puffer P3 zugesetzt und wiederum durch Umschütteln durchmischt. Die Mischung wurde dann 5 min auf Eis inkubiert und danach 30 min bei 4°C mit 20000g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die zuvor mit 2 ml Puffer QBT equilibrierte Säule gegeben. Es folgten zwei Waschschrirte mit je 2 ml Puffer QW. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß mit 800 µl Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde mit 0,7 Vol (560 µl) Isopropanol versetzt und die Plasmid DNA für 30 min bei 4°C und 20000g pelletiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft für 5 min getrocknet und dann in 25-50 µl ddH₂O gelöst.

Puffer (Resuspension)	P1	Tris/HCl Na ₂ -EDTA (RNase) bei 4°C lagern	(pH 8)	50 10 100	mM mM µg/ml
Puffer (Lysis)	P2	NaOH SDS bei RT lagern		200 1	mM % (w/v)
Puffer (Neutralisation)	P3	Kaliumacetat/Essigsäure bei RT lagern	(pH 5,5)	3,2	M
Puffer (Equilibrierung)	QBT	NaCl Natriumacetat/Essigsäure Triton bei RT lagern	(pH 5)	600 100 X-100 0,15	mM mM % (v/v)
Puffer (Waschen)	QW	NaCl Natriumacetat/Essigsäure bei RT lagern	(pH 5)	800 100	mM mM
Puffer (Elution)	QF	NaCl Tris/HCl bei RT lagern	(pH 8)	1,25 100	mM mM

4.2.4.6 Maxipräparation von Plasmid-DNA (Kit)

Zur Maxipräparation aus 500-1000 ml Bakteriensuspension wurde ein Maxi Plasmid-Isolations-Kit (Qiagen) benutzt. Die geernteten Bakterien wurden in 10 ml Puffer P1 (mit RNase A) vorsichtig resuspendiert. Zu der Suspension wurden 10 ml der Puffer P2 pipettiert, durch vorsichtiges Schwenken vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch den alkalischen Puffer P2 wurden die Bakterienzellen lysiert. Das Lysat wurde dann mit 15 ml Puffer P3 versetzt, durch vorsichtiges Umschütteln vermischt und dadurch neutralisiert. Es folgte eine Zentrifugation für 15-30 min bei 20°C mit 14000 rpm (Beckman J2-21, Rotor JA - 20). Da oft noch Zellwandbestandteile und Proteine auf der klaren Lösung schwammen, wurde diese durch ein sterilisiertes Netz mit 60 µm Porenweite filtriert. Die nunmehr völlig klare Lösung wurde auf die zuvor mit 30 ml Puffer QBT equilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Die Flüssigkeit mußte ohne Druck oder Sog durch die Säule laufen. Hiernach wurde die Säule mit 60 ml Lösung Puffer QW gewaschen und die Plasmid-DNA dann mit 15 ml Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde mit 0,7 Vol (10,5 ml) Isopropanol versetzt und die Nukleinsäuren dadurch gefällt. Nach 10 min Inkubation bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 30-60 min bei 4°C mit 8000 rpm (Beckman J2-21, Rotor JA - 20). Das Pellet wurde mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die DNA wurde dann bei RT oder unter Vakuum getrocknet, in ddH₂O aufgenommen und die Konzentration im Spektrophotometer bestimmt.

4.2.4.7 Analyse der Plasmid-DNA

4.2.4.7.1 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration von DNA kann photometrisch bestimmt werden. Bei der photometrischen Messung wird die Extinktion bei 260 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Man berechnet die Konzentration nach folgender Formel: $OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnung} / 1000 = \text{Konzentration der DNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$. Da auch RNA das Absorptionsmaximum bei 260 nm hat, misst man im Spektrophotometer oft viel RNA mit, wodurch die Konzentration höher erscheint als sie tatsächlich ist. Dies wird aber durch die Zugabe von RNase A während der Plasmidpräparation vermindert. Durch die RNase A wird die bakterielle RNA degradiert und wird im Spektrophotometer nicht mehr bei 260nm detektiert.

4.2.4.7.2 Restriktion der Plasmid-DNA

Um zu überprüfen, ob die Plasmid-DNA der Plasmidkarte entspricht, wurde ein Aliquot der DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmentgrößen in einem Agarosegel bestimmt.

Die Aktivität der Enzyme wird in Units [U] angegeben, wobei ein Unit der Menge an Enzym entspricht, die in einer Stunde 1 µg Standard-DNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl unter optimalen Bedingungen vollständig verdaut. In der Regel wurde eine Enzymmenge von 1 U pro µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Hersteller der Restriktionsenzyme liefern verschiedene Puffer, welche jeweils die für die Enzyme optimalen Salzkonzentrationen und pH-Werte haben. Wurde mehr als ein Enzym zur Restriktion eingesetzt, wurde ein Puffer gewählt, der möglichst für alle, in der Regel nicht mehr als zwei, Enzyme optimale Bedingungen darstellte. Eine Restriktion wurde je nach eingesetzter DNA-Menge in einem Volumen von 50-200 µl durchgeführt.

Ein Ansatz bestand z.B. aus

- 10 µl DNA in ddH₂O gelöst (1µg/µl)
- 1 µl Restriktionsenzym (10 U)
- 5 µl 10fach konz. Restriktionspuffer
- 34 µl A. bidest.

Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Hitzedenaturierung (10 min 65°C) gestoppt. Danach wurden die Fragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt.

4.2.4.8 Präparation von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau

Um die gewünschten DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau von den unerwünschten zu trennen, wurde in der Regel eine präparative Horizontal-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurde ein 0,8-1% Agarosegel mit Seakem GTG Agarose (Biozym) verwendet. Als Puffer kam auch hier DTE-TBE zum Einsatz. Nach der Trennung im Agarosegel wurden die mit Ethidiumbromid angefärbten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit eines Gelextraction Kit[®] (Qiagen) aus dem Gel eluiert. Zu je 100 mg Agarosegel wurden 300 µl Puffer QX gegeben und bei 55°C für 10 min inkubiert. Durch gelegentliches Schütteln wurde die Auflösung der Agarose beschleunigt. Die Lösung wurde dann auf eine SpinColumn[®] gegeben und 2 min in einer Tischzentrifuge bei 6000g zentrifugiert. Die DNA bindet dabei an die Säulenmatrix. Die Säule wurde dann einmal mit 500 µl Puffer QX und zweimal mit je 500 µl Puffer QW

gewaschen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 20000g für 3 min, um Reste des ethanolhaltigen Puffers QW zu entfernen. Die DNA wurde dann mit 30 µl Puffer QE eluiert.

4.2.4.9 Ligation von DNA- Fragmenten

Nach einem Restriktionsverdau mit einer Restriktionsendonuklease entstehen, abhängig vom Restriktions-Enzym, DNA-Fragmente, die entweder glatte Enden (engl. *blunt ends*) oder 3'- bzw. 5'-Überhänge von einigen Basen haben (engl. *sticky ends*). Da die Sequenzen der Überhänge komplementär zueinander sind, können sich diese bei entsprechender Behandlung wieder aneinander anlagern. Durch die Zugabe eines Enzyms, das solche Brüche in DNA-Doppelsträngen verbinden kann, können diese Enden wieder kovalent miteinander verknüpft werden (Ligation). Hier wurde für solche Reaktionen die T4 Ligase (NEB) verwendet.

Um zu verhindern, dass die Enden des Plasmides, in das das Fragment ligiert werden soll sich verbinden, kann man das linearisierte Plasmid mit einer Phosphatase behandeln. Diese spaltet die 5'-Phosphatgruppe ab, die zur Ligation benötigt wird. Hier wurde eine alkalische Phosphatase aus Shrimps (Boehringer Mannheim) eingesetzt, welche in vielen Puffern, die auch für die Restriktionsendonukleasen verwendet werden, eine ausreichende Aktivität besitzt.

Im Idealfall wurden auf beiden Seiten des zu ligierenden Fragmentes und des Vektors verschiedene Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die keine kompatiblen Überhänge erzeugen. Auf diese Weise entstehen fast ausschließlich Ligationsprodukte, die das Fragment in der gewünschten Orientierung enthalten. In diesem Falle wurden in der Regel equimolare Mengen von Fragment und Plasmidvektor eingesetzt. Wenn es sich um eine Ligation nach Restriktionsverdau mit nur einem Enzym handelte, wurden Fragment und Vektor im Verhältnis von 1:1 bis 5:1 eingesetzt. Als Kontrolle wurde immer auch eine Ligation des Plasmides ohne zu ligierendes Fragment durchgeführt. Nur so konnte abgeschätzt werden, ob die Ligation erfolgreich war, denn im Idealfall sollten bei dem dephosphorylierten Plasmid alleine keine Ligationsprodukte entstehen.

4.2.4.10 Transformation von kompetenten *E.coli*

Für die Transformationen wurde kompetente *E. coli* des Stammes DH5α (Gibco BRL) verwendet. Diese Zellen können durch einen Hitzeschock mit Plasmid-DNA transformiert werden. Die Zellen wurden in Aliquots zu 50 µl aufgeteilt. Es wurden 2-4 µl des

Ligationansatzes hinzugegeben und vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße für 30 s im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Inkubation von 2 min auf Eis. Die Bakterien wurden dann mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 60 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Von der Bakteriensuspension wurden Aliquots von 50 µl und 500 µl auf eine Petrischale mit LB-Agar, der das entsprechende Antibiotikum enthielt, platiert. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.4.11 PCR basierter Einzelnukleotidaustausch in CXCR5 und CCR7

Alle Varianten, die zu einem Aminosäureaustausch führten, wurden in die cDNA der vorhandenen Expressionsplasmide kloniert. Hierzu wurde eine PCR-basierte Mutationsstrategie angewendet, in der vier Primer benötigt wurden (Maloy 1996). Je ein Primer lag flankierend zu einer geeigneten Klonierungsstelle 5' und 3' des zu mutierenden Bereichs. Die beiden anderen Primer lagen auf der zu mutierenden Position und waren exakt komplementär zueinander. Die zu mutierende Position lag in der Mitte der beiden Primer und wurde von jeweils 13 bis 15 Basen 5'- und 3'-flankiert. Diese Überhänge waren notwendig, da zur Amplifikation der DNA eine Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität verwendet wurde (Pfu Polymerase, Invitrogen). Diese hat eine deutlich geringere Fehlerrate als z.B. Taq-Polymerasen ohne eine solche Eigenschaft, da falsch eingebaute Nukleotide wieder entfernt werden können.

Durch Amplifikation an dem Originalplasmid, wurden mit je einem Mutationsprimer und dem entsprechenden flankierenden Primer des Vektors zwei Produkte hergestellt, die in einem Agarosegel vom Originalplasmid getrennt wurden. Nachdem diese zwei Produkte aus dem Agarosegel eluiert worden waren, dienten sie in einer zweiten PCR-Reaktion als Matrize. In dieser zweiten PCR wurden neben den beiden PCR-Produkten nur die beiden flankierenden Primer des Vektors eingesetzt. In den ersten Zyklen dieser PCR entstanden zunächst einzelsträngige Produkte. Im Laufe der Reaktion wurden diese dann, wegen der komplementären 3'-Bereiche, die den beiden Mutationsprimern entsprechen, zu einem Produkt verlängert, das dem kompletten Bereich zwischen den flankierenden Primern entsprach. An dieser Matrize fand die eigentliche PCR-Reaktion mit einer exponentiellen Vermehrung dieses Produktes statt. Schematisch ist dieser Ansatz in Abb. 4 dargestellt.

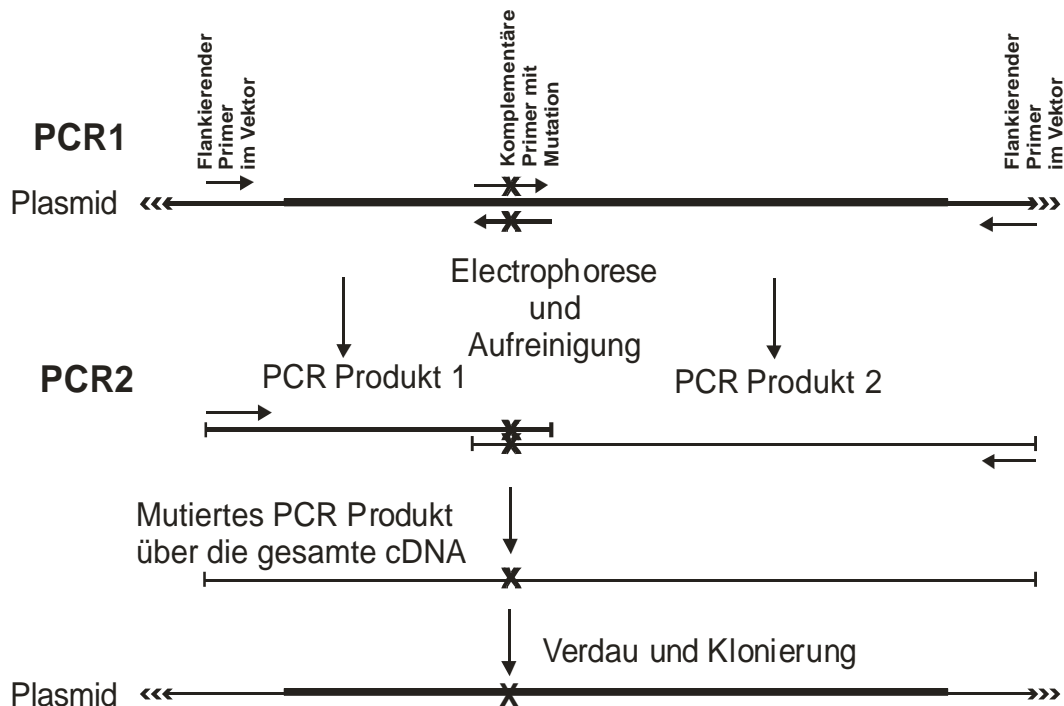


Abb. 4 PCR-basierte Mutagenese eines Einzelnukleotids in der cDNA eines Expressionsvektors

Durch die Verwendung von Primern mit einer veränderten Basenposition in der Mitte konnte über eine mehrere PCR-Reaktionen ein Einzelnukleotidaustausch in die cDNA eingeführt werden.

Das entstandene PCR-Produkt wurde erneut über ein Agarosegel aufgereinigt, mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut und in das entsprechende Plasmid ligiert. Die nach der Transformation von *E. coli* entstandenen Plasmidklone wurden per Sequenzierung überprüft.

Für die Einführung der Einzelnukleotidaustausche in die Expressionsplasmide, welche die cDNA der beiden Chemokinrezeptoren enthielten, wurden die in Tabelle 2 dargestellten Primer verwendet. Im Falle der Variante +82 A/G in der cDNA von CCR7 wurde aufgrund der endständigen Lage der Variante die Mutation durch eine einzelne PCR mit dem aufgeführten Primer und SP6 eingeführt. Der verwendete Primer enthält eine BamH I-Restriktionsschnittstelle, und somit konnte das PCR-Produkt direkt in den Expressionsvektor kloniert werden.

Tabelle 2 Mutagenese-Primer

CXCR5	Mutationsprimer 3'	Mutationsprimer 5'
+461	5'-CTT CCT CCT GGG CAT GAT CGG CAA CGT C	5'-GAC GTT GCC GAT CAT GCC CAG GAC GAA G
+917	5'-TGC CTG GTT CAC CGC CCG ATT CCT CTA C	5'-GTA GAG GAA TCG GGC GGT GAA CCA GGC A
+1085	5'-CCT CTG CTG GTC AGC CCA CAT CGT C	5'-GAC GAT GTG GGC TGA CCA GCA GAG G
+1295	5'-CTG GGC TGT ACC AGC CCT GCC TCC C	5'-GGG AGG CAG GGC TGG TAC AGC CCA G
CCR7	Mutationsprimer 3'	Mutationsprimer 5'
+82	entfällt	5'-GCT CGG ATC CAT GGA CCT GGG GAA ACC AGT GAA AAG CGT GCT G
Vektor		
T7	5'-CTC GAG TAA TAC GAC TCA CTA TAG G	
SP6	5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC	

4.2.5 Zellkultur und funktionelle Untersuchungen

4.2.5.1 Zellkultur humaner Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wuchsen adhären. Die Kultur erfolgte in einem CO₂-Inkubator bei 37°C und mit 5% CO₂. Als Medium wurde Dubelco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco), dem 10% fetales Kälberserum (FCS, Serotec, Berlin), 100U Penicillin/ml, 100 µg Streptomycin/ml und 2 mM L-Glutamin zugesetzt wurden, verwendet.

Die Zellen wurden 2-3mal wöchentlich geteilt, wenn der Boden der Zellkulturgefäße zu 80-90% mit Zellen bedeckt war. Hierzu wurden das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit sterilem PBS gespült. Danach wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Boden ablösten. Dieser Prozess wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Die vereinzelt Zellen wurden dann 1:5 bis 1:10 verdünnt und auf neue Kulturgefäße ausgesät.

PBS	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,44 g	Na ₂ PO ₄
	0.2 g	KH ₂ PO ₄
	pH 7.2	
Trypsin-EDTA	0,25 %	Trypsin (w/v)
	0.05 %	EDTA (w/v)
	in PBS	

4.2.5.2 Gentechnische Manipulation von Zelllinien

Durch das Einbringen von zusätzlicher DNA, z.B. in Form von Plasmid-DNA, kann eine Zelle gentechnisch manipuliert werden. Um fremde Gene in einer Zelle zu exprimieren, wird das zu exprimierende Gen in einen Plasmid-Vektor kloniert, der einen, in der Zelllinie aktiven, Promotor enthält. Für eukaryotische Zelllinien kann z.B. der konstitutiv aktive Cytomegalovirus-Promotor (CMV-Promotor) verwendet werden, welcher Teil der hier verwendeten Expressions-Plasmide war. Um die Plasmid-DNA in die Zellen zu bringen, gibt es verschiedene Methoden, von denen hier zwei verwendet wurden.

4.2.5.2.1 Transfektion mit Kalziumphosphat

Diese Methode beruht auf der Bildung von DNA-Kalziumphosphat Präzipitaten, die auf die adhären wachsenden Zellen herabsinken und von diesen aufgenommen werden (Übersicht über verschiedene Protokolle in Jordan and Wurm 2004). Die Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen ausgesät, so dass sie am folgenden Tag in etwa halbkonfluent gewachsen waren. Zur Herstellung des Präzipitats wurden 2-10 µg Plasmid-DNA mit 50 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung versetzt und mit TE-Puffer, pH 7,1 auf 500µl aufgefüllt. Unter ständigem Mischen auf einem Vortex-Genie2 wurde die DNA-CaCl₂-Mischung langsam tropfenweise zu 500µl 2xHEBS Puffer gegeben. Diese Mischung wurde dann für 5 min bei RT inkubiert und die Bildung möglichst feiner Kalziumphosphatkristalle am Mikroskop kontrolliert. Das Präzipitat wurde dann unter Schwenken der Schale tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Die Expression der durch die Plasmid-DNA eingebrachten cDNA wurde i.d.R. 24 h nach der Transfektion untersucht.

2 X HEBS-Puffer	280 mM	NaCl
	1 mM	KCl
	1,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	10 mM	Dextrose
	40 mM	HEPES
	pH	7,08

4.2.5.2.2 Transfektion mit Fugene6[®]

Fugene6[®] (Roche) ist ein Hilfsmittel zur Transfektion von eukaryotischen Zellen. Es können sowohl adhären wie auch in Suspension wachsende Zellen transfiziert werden. Hierbei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren und jeweils 2 µg DNA mit 6 µl Fugene6 zur Transfektion eingesetzt. In einem Reaktionsgefäß wurden 100 µl serumfreies Medium vorgelegt und 6 µl Fugene6[®] direkt in das Medium gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 2 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und die Mischung für weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Mischung tropfenweise unter Schwenken der Kulturschale zu den Zellen gegeben.

4.2.5.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse von einzelnen Zellen nach der Anfärbung mit spezifischen Antikörpern an die unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind. Die einzelnen Zellen werden hierbei in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrahl durch eine Messküvette geführt. Die Fluorochrome der Antikörper werden mit einem oder mehreren Laserstrahlen angeregt, und das emittierte Licht wird von Detektoren aufgefangen und mit einem Rechner ausgewertet. Dabei wird neben der Emission der Fluorochrome auch das Streulicht, das von der Zelle erzeugt wird, aufgenommen. Gegenüber der Laserquelle wird der *forward scatter* (FSC) als das Licht, das von der Zelle wenig abgelenkt wurde, detektiert und seitlich wird im *sideward scatter* (SSC) Licht aufgenommen, das im 90°-Winkel gestreut wurde. Der FSC ist vor allem von der Größe der Zelle abhängig, während der SSC von Eigenschaften wie der Oberflächenstruktur und intrazellulären Komponenten beeinflusst wird. Hierbei führen eine zerklüftete Zelloberfläche und in der Zelle eingeschlossene Granula zu einer Erhöhung des SSC. Um die transfizierten Zellen auf Expression der entsprechenden Chemokinrezeptoren zu untersuchen, wurden diese mit den spezifischen monoklonalen Antikörpern gefärbt. Dies war für hCXCR5 der Klon 8B2 (Förster, Mattis et al. 1996) und für hCCR7 der Klon 3D12 (Förster, Schubel et al. 1999). Alle Messungen wurden an einem FACS-Scan[®] (Becton Dickinson) durchgeführt und mit Cellquest[®] (Becton Dickinson) und Winlist[®] (VeritySoftware) ausgewertet.

4.2.5.3.1 Analyse von Oberflächenmolekülen

Um Oberflächenmoleküle auf einer Zelle nachzuweisen, verwendet man monoklonale oder polyklonale Antikörper. Die Zellen wurden vom Boden der Zellkulturgefäße durch

Inkubation mit EDTA/Glucose abgelöst. 2×10^6 Zellen/ml wurden mit 5% Ziegen Serum in FACS-Puffer bei 4°C für 15 min inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Immunglobuline (Ig) zu verhindern. Anschließend wurde der entsprechende Antikörper hinzugefügt und die Zellen für 20 min bei 4°C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen entfernt. Die Zellen wurden hierzu mit 350g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in einem möglichst großen Volumen aufgenommen.

Da es sich bei den verwendeten Antikörpern gegen hCXCR5 und hCCR7 um Ratten-Ig handelte, wurden diese unmarkierten Antikörper durch die Verwendung eines Fluorochrom-markierten Sekundär-Antikörpers, der spezifisch für Ratten-Ig, war nachgewiesen.

EDTA/Glucose	Na ₂ -EDTA	2 mM
	Glucose	10 mM
	in PBS, pH 7,2	
FACS-Puffer	Na ₂ -EDTA	5 mM
	FCS	5 % (w/v)
	in PBS, pH 7,2	
	(optional mit 0,1 % NaN ₃)	

4.2.5.3.2 Färbung intrazellulärer Epitope

Da die Zellmembran im unversehrten Zustand undurchlässig für Ig ist, müssen Zellen für eine Färbung intrazellulärer Epitope fixiert und permeabilisiert werden. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst. 2×10^6 Zellen/ml wurden in 1 ml 2 % Paraformaldehyd (in PBS) aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 8 ml kaltem FACS-Puffer aufgefüllt und abzentrifugiert. Für die Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen danach 3 min in 0,0025 % Digitonin (Sigma) in PBS bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Zellen nochmals mit 8 ml FACS-Puffer gewaschen und dann wie oben beschrieben gefärbt.

4.2.5.4 Immunfluoreszente Färbung transfizierter Zellen

Auf den Boden einer Zellkulturschale wurde ein Deckgläschen gelegt. Darauf wurden HEP2 Zellen ausgesät und nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert, als die Zellen etwa halb konfluent waren. Nach 24 h wurde das Deckgläschen entnommen und die Zellen für 5 min mit eiskaltem Aceton fixiert. Anschließend wurden die Zellen in TBST für 5 min bei RT rehydriert. Das im TBST enthaltene Detergenz Tween20 permeabilisiert die Zellmembran. Die Zellen wurden anschließend mit 5 % Ziegen Serum blockiert und dann

mit anti-hCXCR5 (8B2) für 1 h bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBST wurde der CXCR5 mAk mit einem Esel-anti-Ratte-FITC Antikörper (DAKO) nachgewiesen. Anschließend wurden die Präparate mit Moviol auf einem Objektträger eingedeckt. Die Aufnahme der transfizierten Zellen erfolgte an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM1 (Leica).

TBST	Tris-HCl	100mM
	NaCl	0,9% (w/v)
	Tween20	0,01% (w/v)
	pH 7,2	
Moviol	Tris-HCL	100mM
	Moviol	17.5% (w/v)
	Glycerin	25% (v/v)
	pH 7.2	

4.2.5.5 Nachweis von Proteinen im Westernblot

4.2.5.5.1 SDS-PAGE

Bei der Elektrophorese von Proteinen gibt es diverse Verfahren, die eine Trennung der Proteine in Abhängigkeit ihrer verschiedenen Eigenschaften wie Größe, isoelektrischer Punkt oder Konformation ermöglichen. Um Proteine ausschließlich in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts zu trennen, ist es notwendig, Tertiärstrukturen aufzulösen und für eine gleichmäßige Ladung der Proteine, unabhängig von der Aminosäuresequenz, zu sorgen. Hierfür wird die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierenden Bedingungen verwendet. Durch den Einsatz des negativ geladenen SDS, das sich an die Proteine anlagert, wird eine gleichmäßige Ladung der Proteine erzeugt. Zugleich wird durch kurzes Erhitzen auf 95°C zusammen mit SDS und β -Mercaptoethanol das Protein denaturiert und Disulfidbrücken werden gelöst. Anschließend werden die Proteine in einem elektrischen Feld in einem Polyacrylamid-Gel der Größe nach aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde ein vorgefärbter Protein-Marker (BioRad) mit aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wurde in einer Minigel-Kammer (BioRad) durchgeführt. Hierzu wurde ein ca. 5 cm langes Trenngel mit einem ca. 2 cm langen Sammelgel überschichtet. Je 5 μ l der Protein-Proben wurden mit 2 μ l reduzierendem Auftragspuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis überführt. 5 μ l

der denaturierten Probe wurde dann auf das Gel geladen und die Elektrophorese für 50 min bei konstanten 12 W durchgeführt.

Trenngel	Tris 1,5 M pH8,8	3ml
	H ₂ O	5ml
	Rotipohorese 30	4ml
	TEMED	20µl
	APS 10%	100µl
Sammelgel	Tris 1 M pH6,8	1,8ml
	H ₂ O	4,08ml
	Rotipohorese 30	1,2ml
	TEMED	2µl
	APS 10%	100µl
5 X Laufpuffer	Tris	15,1g
	Glycin	72g
	SDS	5g
	pH ca. 8,6	
	ad 1l ddH ₂ O	
Auftragsprobenpuffer	0,1M DTT	0,15g
	SDS	5,0% (v/v)
	Glycerin	10,0% (v/v)
	Tris	0,06M
	Spatelspitze Bromphenolblau pH 6,8	

4.2.5.5.2 Westernblot

Die Technik des Westernblots wird angewendet, um die, der Größe nach aufgetrennten, Proteine spezifisch nachzuweisen. Der Westernblot wurde als Wortspiel in Analogie zum „Southern“-Blot benannt, der von Edwin Southern entwickelt wurde (Southern 1974). Hierbei werden die in der PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und dann mit spezifischen Antikörpern hierauf nachgewiesen.

Für den Transfer wird das PAA-Gel luftblasenfrei auf die befeuchtete Nitrozellulosemembran gelegt und beide Seiten werden mit Whatman3M-Papier bedeckt. In einer Transferkammer werden die Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte bei 75 V für 45 min. Nach dem Transfer wurde die Membran mit Westernblock-Puffer für 1 h bei RT unter Schwenken blockiert. Danach wurde die Membran zweimal mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem anti-CXCR5-Antikörper (Klon 8B2) in TBST für 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit TBST wurde der Blot mit

einem Ziege-anti-Ratte Antikörper an den eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war (Sigma) für 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Danach wurde der Blot zunächst zweimal für 5 min mit TBST gewaschen und dann noch einmal mit TBS und einmal mit AP-Puffer. Im Anschluss wurde der Blot mit NBT/BCIP entwickelt und eingescant.

Transferpuffer	4 Teile Laufpuffer 1 Teil Methanol	
10 X TBS	Tris-HCl NaCl pH 7,2	1 M 9%
TBST	1x TBS Tween 20	0,05% (v/v)
Blockpuffer	Magermilchpulver FCS in TBST	1% (w/v) 10% (v/v)
AP-Puffer	Tris NaCl MgCl ₂ pH 9,57 ad 1l ddH ₂ O	12,1g 5,8g 1g
NBT/BCIP	NBT BCIP in 10ml AP-Puffer	66µl 33µl

4.2.5.6 Herstellung stabil transformierter Zelllinien

Bei der transienten Transfektion gelangt das transfizierte Plasmid in den Zellkern und wird dort transkribiert, so dass die transfizierte Zelle das fremde Protein exprimiert. Allerdings verteilen sich die in der Zelle befindlichen Plasmide bei jeder Zellteilung auf die Tochterzellen oder gehen verloren und werden so ausgedünnt. Bei jeder transienten Transfektion kommt es aber in einigen Zellen durch nicht homologe Rekombination zu einer stabilen Integration des Plasmides in das Genom der Zelle. Diese Zellen vererben nun die auf dem Plasmid enthaltenen Gene an alle Tochterzellen. Diese sehr seltenen Zellen können durch Verwendung eines Selektionsmediums von den transient oder nicht transfizierten Zellen getrennt werden. Zu diesem Zweck enthält das Plasmid auch ein Gen, das eine Resistenz gegen ein Antibiotikum, das auch gegen eukaryotische Zellen wirkt, vermittelt. In vielen Fällen wird hierfür eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase verwendet, die durch Phosphorylierung Aminoglycosid-Antibiotika, wie z.B. G418, inaktivieren kann. Neben dem Resistenz-Gen wird bei diesem Prozess auch das in der

MCS des Vektors enthaltene Gen in das Zellgenom integriert. Wird durch die Rekombination die Expression diese Genes nicht verhindert, so erhält man Zellen, welche die fremden Gene stabil exprimieren.

HEK293-Zellen wurden wie oben beschrieben transient transfiziert und nach 24 h in DMEM mit 600 µg/ml G418 (Gibco) kultiviert. Nach ca. 7 Tagen begannen die nicht stabil transformierten Zellen abzusterben. Um einen gemischten Pool aus stabil transformierten Zellen zu erhalten, die eine deutliche Expression von CXCR5 oder CCR7 zeigten, wurden die Zellen zweimal mit einem Zell-Sorter (FACS-Vantage, Becton Dickinson) auf die Expression des Chemokinrezeptors sortiert. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben mit anti-hCXCR5 oder anti-hCCR7 gefärbt und anschließend positive Zellen im Zellsorter von negativen getrennt. Im Zellsorter werden die Zellen ebenfalls in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrahl vereinzelt. Anders als im FACS-Scan erfolgt die Anregung durch das Laserlicht aber nicht in einer Messküvette, sondern in einem frei fliegenden Tropfen. Je nachdem, ob in dem Tropfen eine Zelle mit den gewünschten Eigenschaften detektiert wird, wird der Tropfen statisch aufgeladen. In einem elektrischen Feld zwischen zwei Ablenkplatten wird der geladene Tropfen dann aus dem geraden Hauptstrahl herausgelöst und in einem Gefäß aufgefangen. Die sortierten Zellen wurden anschließend wieder in Kultur genommen. Für die weitere Kultur der Zellen wurde die G418 Konzentration auf 400 µg/ml herabgesetzt.

4.2.5.7 Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

Die Freisetzung von Kalzium-Ionen in das Cytosol ist ein verbreiteter Weg der Signaltransduktion nach der Bindung von Liganden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die Konzentration von intrazellulärem Kalzium kann mittels eines Farbstoffs ermittelt werden, dessen Fluoreszenzspektrum sich verändert, wenn Kalzium an den Farbstoff gebunden ist. Hier wurde FURA 2 verwendet (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985). Die Emission dieses Farbstoffs wird bei 510 nm gemessen. Angeregt wird der Farbstoff bei 340 oder 380 nm. Bei Anregung mit 340 nm erhöht sich die Intensität der Fluoreszenzemission des Farbstoffs, wenn Kalzium daran gebunden ist. Wird der Farbstoff hingegen mit 380 nm angeregt, ist die Fluoreszenzemission des kalziumfreien Farbstoffs höher. Durch die Bildung des Quotienten beider Messwerte können Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration bestimmt werden. Damit der Farbstoff in die Zellen und das Cytosol gelangt, wird FURA-2-Acetomethylester (FURA-2/AM) verwendet. Der Acetomethylester-Rest macht den hydrophilen Farbstoff membrangängig. Im Cytosol wird die Esterbindung durch zytosolische Esterasen gespalten und der Farbstoff akkumuliert in der Zelle.

Für die Messung der Kalziumkonzentrationsänderungen wurden die stabil transformierten Zelllinien mit einer Oberflächenexpression der unveränderten oder mutierten Chemokinrezeptoren verwendet. Als Kontrolle diente eine stabil transformierte Zelllinie, die mit dem Plasmid transformiert worden war, das die cDNA von CXCR5 in inverser Orientierung enthielt.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit EDTA/Glucose von den Zellkulturschalen gelöst und zweimal mit kalziumfreiem HBSS gewaschen. Danach wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^7 / ml in HBSS eingestellt und FURA/2-AM in einer Endkonzentration von 1 μ M hinzugefügt. Zum Beladen wurden die Zellen dann für 30 min im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden die Zellen zweimal mit kalziumfreiem HBSS gewaschen, auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml eingestellt und bis zur Messung bei RT dunkel gelagert. Vor der Messung wurden die Zellen 5 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. 2 ml der Zellsuspension wurde in die Quarzmessküvette gegeben und nach Erreichen einer stabilen Basislinie wurden die Liganden oder Kontrolllösungen in einem Volumen von 10 μ l hinzugegeben. Die Messung erfolgte in einem Fluoreszenzspektrometer RS1502 (Shimadzu).

Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)

KCl	5,4mM
Na ₂ PO ₄	0,3mM
KH ₂ PO ₄	0,4mM
NaHCO ₃	4,2mM
CaCl ₂	1,0mM (fehlt im kalziumfreien HBSS)
MgCl ₂	0,5mM
MgSO ₄	0,6mM
NaCl	137mM
D-Glucose	5,6mM
pH	7,4

4.2.5.8 Luziferase-Assay zur Bestimmung der MAPK-Aktivierung

Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der nach Ligandenbindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren ausgelöst werden kann, ist die Induktion von der „*mitogen activated protein kinase*“ (MAPK) – Kaskade. Die Aktivität der MAPK kann mit dem *Path Detect Elk-1 trans-Reporting System* (Stratagene) nachgewiesen werden. In dem System wird die Expression einer Luziferase nachgewiesen, die über die Aktivierung eines chimären Transkriptionsfaktors, dessen DNA-Bindungsdomäne gegen die des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 ausgetauscht wurde, gesteuert wird. Das auf einem getrennten Plasmid co-transfizierte Luziferasegen wird durch einen synthetischen Promotor reguliert, der eine mehrfache Wiederholung der GAL4 Bindungssequenz enthält. Der chimäre Transkriptionsfaktor wird durch den MAPK Signalweg aktiviert und die Höhe des erhaltenen Luziferasesignals spiegelt somit die Aktivität dieses Signalweges wieder. Da es sich um eine Co-Transfektion verschiedener Plasmide handelt, wurde zur Standardisierung eine weitere getrennt messbare Luziferase co-transfiziert, welche von einem konstitiven Promotor exprimiert wird, und als Basis für die Transfektionseffizienz verwendet wurde.

Für den Assay wurden CHO-K1 Zellen einen Tag vor der Transfektion in so einer Dichte in 3 cm Zellkulturschalen ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 20-30 % konfluent waren. Die Zellen wurden mit DMEM, das lediglich 2,5 % FCS enthielt, kultiviert, um die Induktion des MAPK-Signalweges durch im FCS enthaltene Wachstumsfaktoren zu reduzieren.

Es wurden verschiedene Kombinationen von folgenden Plasmiden transfiziert:

pFR-Luc *Firefly*-Luziferase unter Kontrolle des synthetischen Promotors

pFA-Elk chimärer Transkriptionsfaktor

pFC-dbd Leervektor

pFC-Mek1 MAPK (als Positivkontrolle für die Luziferase-Induktion)

pRL-TK *Renilla*-Luziferase

Expressionsvektoren mit unveränderten oder mutierten Chemokinrezeptorgen

Tabelle 3 Transfektionsansätze für MAPK-Assay

Plasmid	Chemokinrezeptoranalyse	Positivkontrolle	Negativkontrolle
pFR-Luc	500 ng	500 ng	500 ng
pFA-Elk	25 ng	25 ng	-
pFC-MEK1	-	25 ng	-
pRL-TK	100 ng	100 ng	100 ng
pFC-dbd	-	-	25 ng
Chemokinrezeptor	15 ng	-	-

Die Menge der zu transfizierenden DNA wurde mit pBlueskript gegebenenfalls auf 675ng aufgefüllt. Die Transfektion erfolgte wie oben beschrieben unter Verwendung von Fugene6[®]. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 3 h in DMEM ohne Zusatz von FCS kultiviert. Danach wurden die für die Rezeptoren spezifischen Liganden in einem Volumen von 50 µl hinzugefügt und die Zellen für weiter 5 h im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Der Nachweis der Luziferase-Aktivitäten erfolgte unter Verwendung des Dual-Luziferase-Assays (Promega). Die Zellen wurden hierfür im der Kulturschale einmal mit PBS gewaschen und dann durch Zugabe von 300 µl des Lysis-Puffers unter Schwenken für 30 min bei RT lysiert. Die Luziferaseaktivität der *Firefly*-Luziferase wurde mit 20µl des Lysats nach Zugabe von 50 µl des Reagenz I in einem Luminometer (Lumat 9507, Berthold) gemessen. Durch Zugabe des Reagenz II (*Stop and Glow*) wurde die Aktivität der *Firefly*-Luziferase unterdrückt und die der *Renilla*-Luziferase bestimmt.

5 Ergebnisse

5.1 Multiplex Sequenz-Vergleich

Die vergleichende Analyse von Gensequenzen ist die konsequente Fortführung der Arbeiten, die zur Erstellung einer humanen Referenzsequenz geführt haben. Auch wenn zu Beginn dieser Studie die systematische Sequenzierung des humanen Genoms erst am Anfang stand, waren doch schon viele Gene und exprimierte Sequenzabschnitte (engl. *expressed sequence tags*, EST) bekannt. Hierzu gehörten auch die Sequenzen der drei Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und CXCR5. Allerdings waren zunächst nur die kompletten codierenden Sequenzen sowie 5'-regulatorische Bereiche und Teile der Intronsequenzen bekannt. Anhand der vorhandenen Informationen wurden PCR-Produkte ausgearbeitet, welche die Sequenzierung im Multiplex-Sequenzierungsverfahren erlaubten. Es wurden für die Sequenzierung der gesamten codierenden Region sowie der nahen 5'-regulatorischen Bereiche und der Exon-Intron Übergänge der drei Chemokinrezeptor-Gene insgesamt 41 PCR-Produkte je Probe hergestellt, die die Sequenzierung der beiden komplementären DNA-Stränge in zwei Multiplex-Sequenzier-Reaktionen von 20 bzw. 21 Produkten zur gleichen Zeit ermöglichten.

Es wurden hierbei insgesamt ca. 2,5 Mega-Basen an Sequenzdaten erzeugt und nahezu 1,1 Mega-Basen DNA-Sequenz von 183 Individuen vollständig doppelsträngig analysiert. Die spezielle Adaptation der Multiplex Sequenzierung auf diese drei Gene und die Etablierung des hohen Plex-Faktors waren zur Durchführung einer vergleichenden Sequenzierung dieser Größenordnung ein wichtiger Meilenstein.

Die spezielle Anordnung der Proben auf den Sequenziergelen und den dazugehörigen Membranen machte die Identifikation von Sequenzvariationen in der vergleichenden Sequenzierung einfacher. Abb. 5 und 6 zeigen ein Beispiel von Sequenzvariationen, die aber nur symbolisch für alle untersuchten Proben stehen kann.

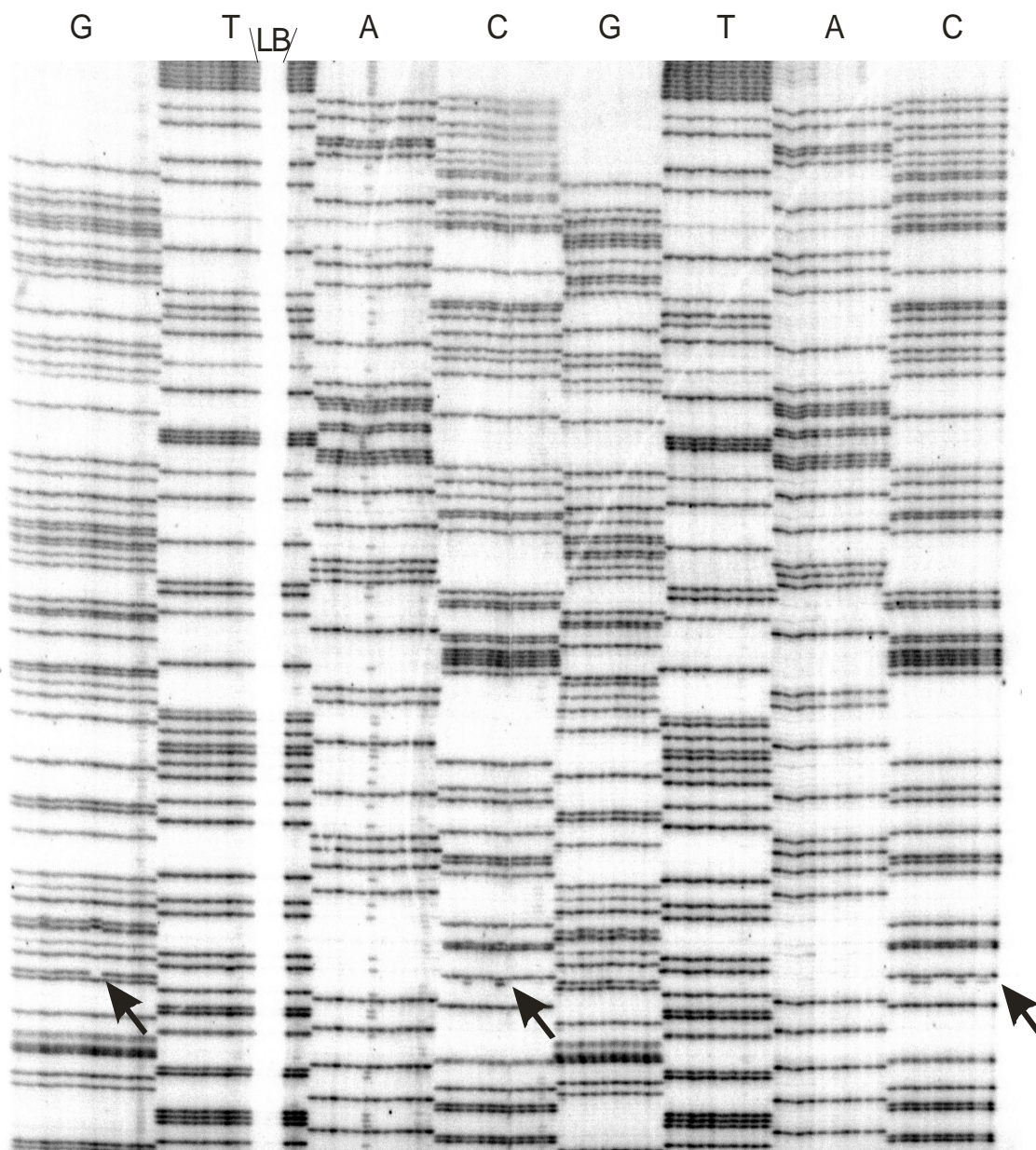


Abb. 5 Beispiel für das Bild einer hybridisierten Sequenzierreaktion auf einer Nylonmembran

Sequenzierung des vierten Segments von CXCR5, das den kompletären Strang eines Teils der 5'-Region und den Anfang des codierenden Bereichs abdeckt. Die im DTE-Verfahren erzeugte Membran wurde mit Sonde 11-4P1F hybridisiert. Im zweiten Block mussten beim Auftragen auf das DTE-Gel wegen einer Luftblase (LB) einige Zähne des Kamms ausgelassen werden, wodurch hier zwischen Proben 9 und 10 in der Terminationsreaktion T eine Lücke entsteht. Auf einem Gel wurden 24 Proben in Blöcken zu je 12 aufgetragen. Die Pfeile markieren die Variation +264C/G.

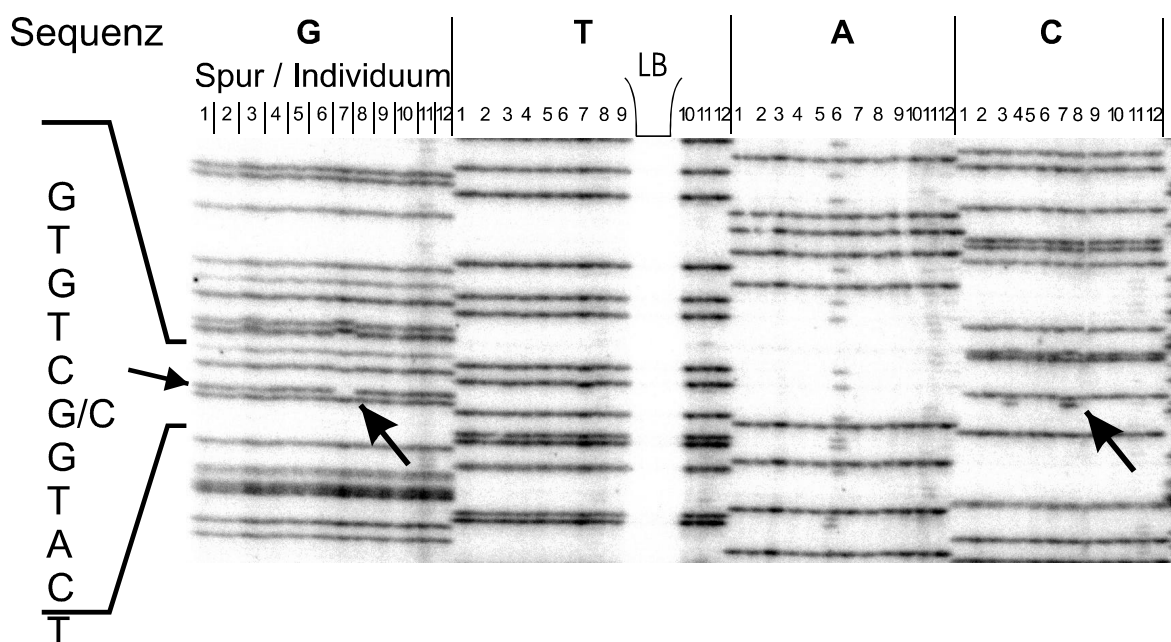


Abb. 6 Ausschnitt der Sequenzierung von CXCR5, Segment 4 mit Variante +264C/G

Beim Beladen des DTE-Gels wurden die jeweiligen Terminationsreaktionen G, T, A und C der Proben 1-12 direkt nebeneinander aufgetragen. Hierdurch wurden Sequenzvariationen leicht als zusätzliche oder fehlende Banden in der Reihe der übrigen Proben identifizierbar. Hier ist in Spur 7 in der Terminationsreaktion G eine Lücke zu erkennen, die in Spur 7 des Blocks C als zusätzliche Bande auftaucht (Pfeile). Es handelt sich hier also um einen homozygoten Austausch von G zu C. Daneben ist in der Spur 3 des Blocks C eine zusätzliche Bande zu erkennen, ohne dass die Bande im Block G fehlt. Somit handelt es sich hier um eine heterozygote Variation.

5.2 Genetische Variabilität von CCR7, CXCR4 und CXCR5

Ziel der durchgeführten Studie war die Aufdeckung der genetischen Variabilität dreier Gene der Chemokinrezeptor-Familie, die zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören. Hierbei wurden DNA-Proben von Patienten untersucht, die an verschiedenen Leukämie- und Lymphomformen erkrankt waren. Als Vergleichsgruppe wurden DNA-Proben von Spendern aus dem Raum Berlin-Brandenburg gesammelt. Im Rahmen der Studie sollte eine mögliche Verbindung genetischer Varianten der untersuchten Gene mit bestimmten malignen Erkrankungen des haematopoetischen Systems aufgedeckt werden.

5.2.1 Sequenzvariabilität

Die Untersuchungen der regulatorischen 5'-Region sowie der codierenden Bereiche und der Übergänge von Exons und Introns der Gene von CCR7, CXCR4 und CXCR5 hat 22 variable Positionen aufgedeckt. Viele dieser Varianten sind bisher nicht beschrieben,

während einige Varianten bereits aus den Sequenzen, die im Rahmen des Humanen Genomprojekts erstellt und in Datenbanken verzeichnet wurde, vorhergesagt werden konnten. Diese Varianten konnten jetzt durch die direkte vergleichende Sequenzierung einer großen Kohorte bestätigt werden. Darüber hinaus konnten die Allelfrequenzen in der untersuchten Population der Kaukasier ermittelt werden.

Die insgesamt 22 variablen Positionen, die bei der Analyse der generierten Sequenzbilder in der untersuchten Sequenz offenbar wurden, verteilen sich auf eine Gesamtsequenz von ca. 7900 Basenpaaren (bp). Dies entspricht einer Frequenz von 2,8 variablen Basen pro 1000 bp. Bezieht man sich bei der Berechnung der Frequenz auf die vier unterschiedlichen Sequenztypen (5'-regulatorische Sequenz, Intron-Sequenzen, codierende Sequenz, 3'-untranslatierte Sequenz), so liegen hier die Frequenzen bei 2,5 für die 5'-regulatorischen Bereiche, 1,4 in intronischen Sequenzen, 3,3 im codierenden Bereich und 1,8 im 3'-untranslatierten Bereich. Vergleicht man die Variationsfrequenz der einzelnen Gene untereinander, so wird offenbar, dass diese sich in den drei Genen stark unterscheiden. Mit 6,8 pro 1000bp liegt die Variationsfrequenz bei der Gesamtsequenz von CXCR5 am höchsten, während die Frequenz bei CCR7 und CXCR4 mit 1,5 bzw. 0,4 pro 1000 bp deutlich niedriger liegt. Die einzelnen Frequenzen sind in Tabelle 4 gegenübergestellt.

Tabelle 4 Frequenz der variablen Positionen in CCR7, CXCR4 und CXCR5 pro 1000 bp

Bereich	Frequenz pro 1000 bp			
	gesamte untersuchte Sequenz	CCR7	CXCR4	CXCR5
Gesamt	2,8	1,5	0,4	6,8
5'-regulatorisch	2,5	3,3	0,0	4,1
Intron	1,4	0,0	1,5	2,7
codierend	3,3	0,9	0,0	8,9
3'-untranslatiert	1,8	0,0	0,0	7,1

5.2.2 Genetische Variabilität von CCR7

In der untersuchten Gensequenz von CCR7, die eine Gesamtlänge von ca. 2600 Basenpaaren (2,6 kbp) umfasste, wurden vier variable Positionen identifiziert. Es handelte sich hierbei um drei Varianten in der 5'-Region des Gens sowie eine Variante im Bereich des ersten Exons. An Position -745, gezählt vom Transskriptionsstartpunkt aus, konnte

eine Insertion von vier Basenpaaren nachgewiesen werden. Bei den übrigen Varianten handelte es sich um Einzelnukleotidaustausche (Abb. 7).

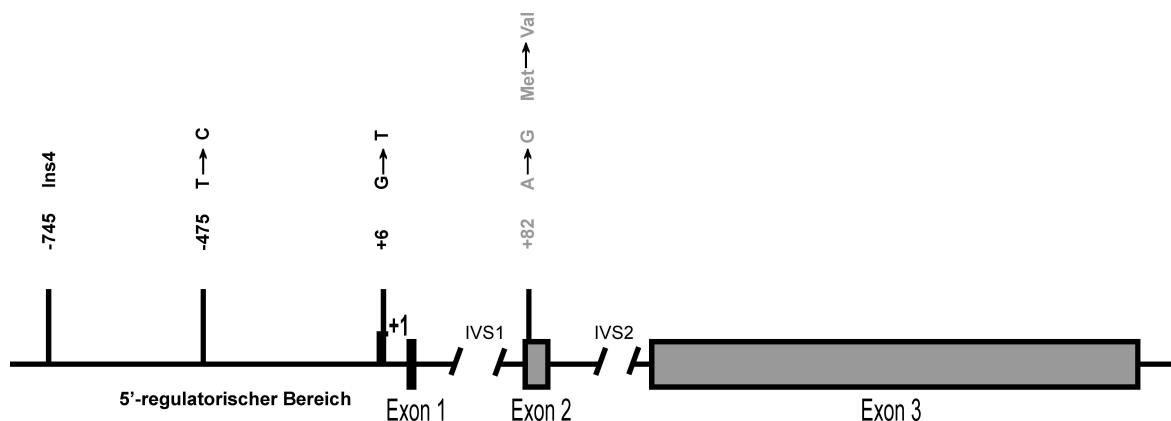


Abb. 7 Polymorphes Spektrum des CCR7-Gens

Die untersuchte Sequenz des CCR7-Gens enthielt vier variable Positionen, deren Lage im Gen hier dargestellt ist. Drei der Varianten liegen im 5'-regulatorischen Bereich des Gens, während die vierte Variation im zweiten Exon liegt und zu einem Austausch in der Aminosäuresequenz des Proteins von Methionin zu Valin an Pos. 6 führt.

An Position -475 ist T der Referenzsequenz durch C ersetzt, an Position +6 G durch T. Der Austausch von A zu G der im ersten Exon an Position +82 liegenden Variante führt zu einer Änderung der Proteinsequenz. An Position 6 des Proteins codiert das Basentriplet des Gens nun für Valin anstatt für Methionin (Met6Val). Die Allelfrequenzen sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 Allelfrequenzen der variablen Positionen im CCR7-Gen (n = Allelzahl)

Referenzsequenz	Allelfrequenz	Variante	Allelfrequenz	n
-745 ohne Insertion	98,1 %	-745 4 bp Insertion	1,9 %	318
-475 T	26,6 %	-475 C	73,4 %	308
+6 G	99,7 %	+6 T	0,3 %	380
+82 A	97,1 %	+82 G	2,9 %	374

5.2.3 Genetische Variabilität von CXCR4

Der Chemokinrezeptor CXCR4 zeichnet sich, anders als die beiden anderen untersuchten Gene, durch eine geringe Variabilität der analysierten Gensequenz aus. In dem gesamten untersuchten Bereich von ca. 2,8 kbp wurde in der untersuchten kaukasischen

Bevölkerungsgruppe lediglich eine variable Position entdeckt. Diese liegt im Bereich des Introns nahe des zweiten Exon (IVS1 +2065).

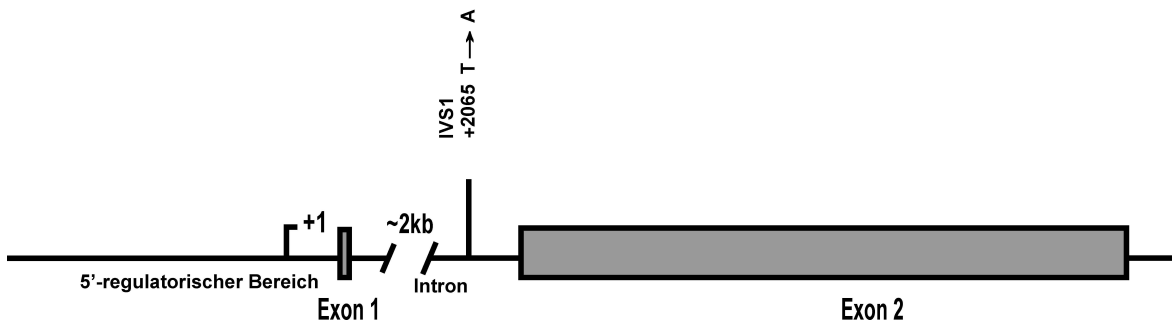


Abb. 8 Polymorphes Spektrum des CXCR4-Gens

Die untersuchte Sequenz des CXCR4-Gens enthielt eine variable Position, deren Lage im Gen hier dargestellt ist. Die Variante führt zu einem Austausch von Thymin zu Adenin in der Mitte einer Sequenz von fünf Adenin gefolgt von acht Thymin.

Es handelt sich um einen Bereich, in dem in der Referenzsequenz fünf Adenin von acht Thymin gefolgt werden. Der Polymorphismus besteht aus einer Variation des ersten Thymin zu Adenin, wodurch eine Abfolge von sechs A und sieben T entsteht. Die Position dieser Variante im CXCR4-Gen ist in Abb. 8 dargestellt. Sie tritt in der kaukasischen Population mit einer Allelfrequenz von 49,7 % auf (n=284).

5.2.4 Genetische Variabilität von CXCR5

Vom CXCR5-Gen wurden insgesamt 2,5 kbp untersucht, die ebenfalls 5'-regulatorische Regionen sowie beide Exons und Exon-Intron-Übergänge enthielten. Im CXCR5-Gen wurden die meisten variablen Positionen festgestellt. In der untersuchten Population konnten 17 Varianten identifiziert werden. Hiervon liegen vier im 5'-regulatorischen Bereich, eine davon im 5'-untranslatierten Abschnitt. Eine Variante liegt im Intron, nahe dem zweiten Exon, während eine Variante im 3'-untranslatierten Bereich liegt. Die übrigen 11 Varianten liegen alle im zweiten Exon. Hiervon führen vier zu Änderungen in der Aminosäuresequenz des Proteins (Abb. 9).

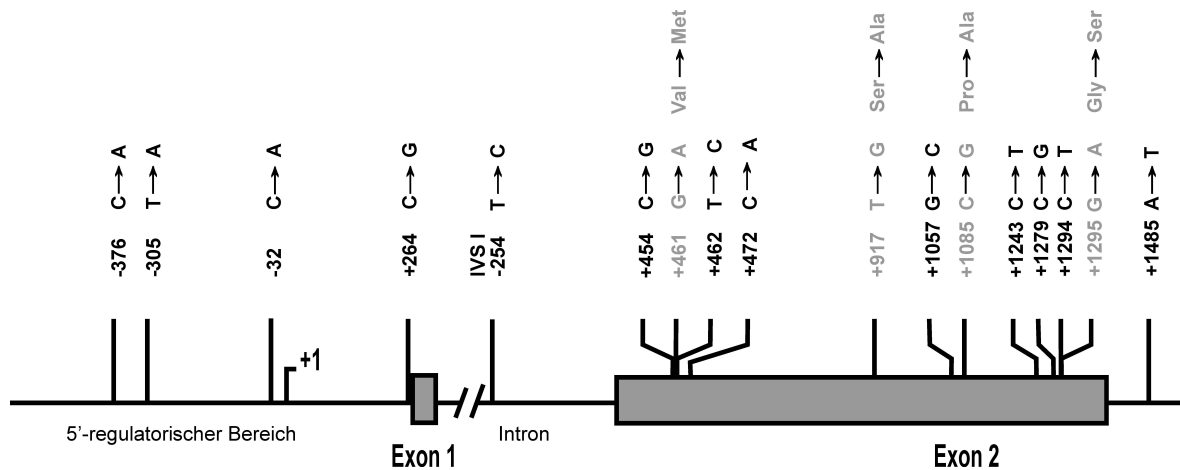


Abb. 9 Polymorphes Spektrum des CXCR5 Gens

Die untersuchte Sequenz des CXCR5-Gens enthielt siebzehn variable Positionen, deren Lage im Gen hier dargestellt ist. Die Variabilität des CXCR5-Gens ist deutlich höher als die Variabilität der beiden anderen Gene. Vier der gefundenen Varianten führen zu einer veränderten Proteinsequenz. Diese Positionen sind hier hellgrau dargestellt.

Bei den zu Aminosäureaustauschen führenden Varianten handelt es sich um den Austausch von G zu A an Position +461, wodurch in der Proteinsequenz an Position 66 Methionin anstatt Valin eingebaut wird (Val66Met) sowie an Position +917, T zu G, was eine Änderung von Serin zu Alanin an Position 218 des Proteins nach sich zieht (Ser218Ala). Der Austausch von C zu G an Position +1085 führt zu einem Austausch von Prolin zu Alanin an Position 274 (Pro274Ala). Diese Position liegt in der sechsten Transmembrandomäne des Chemokinrezeptors. Die vierte variable Position +1295 C zu A führt zu einem Austausch von Glycin zu Serin im C-terminalen Bereich des Proteins an Position 344 (Gyl344Ser).

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich, sind auch hier die Allelfrequenzen der meisten Varianten sehr gering – die Variationen wurden oftmals nur ein- bis zweimal in heterozygoter Form gefunden. Die Variante -376 A zu G wich in allen untersuchten Proben von der Referenzsequenz ab.

Tabelle 6 Allelfrequenzen der variablen Positionen im CXCR5-Gen (n = Allelzahl)

Referenzsequenz	Allelfrequenz	Variante	Allelfrequenz	n
- 376 C	0,0 %	- 376 A	100 %	376
- 305 T	99,7 %	- 305 A	0,3 %	376
- 32 C	83,0 %	- 32 A	17,0 %	376
+ 264 C	83,2 %	+ 264 G	16,8 %	376
IVS1 - 254 T	25,5 %	IVS1 - 254 C	74,5 %	376
+ 454 C	99,2 %	+ 454 G	0,8 %	376
+ 461 G	99,7 %	+ 461 A	0,3 %	376
+ 462 T	99,5 %	+ 462 C	0,5 %	376
+ 472 C	99,5 %	+ 472 A	0,5 %	376
+ 917 T	99,7 %	+ 917 G	0,3 %	376
+ 1057 G	99,7 %	+ 1057 C	0,3 %	376
+ 1085 C	99,7 %	+ 1085 G	0,3 %	376
+ 1243 C	97,9 %	+ 1243 T	2,1 %	376
+ 1279 C	27,1 %	+ 1279 G	72,9 %	376
+ 1294 C	99,5 %	+ 1294 T	0,5 %	376
+ 1295 G	99,2 %	+ 1295 A	0,8 %	376
+ 1485 A	99,7 %	+ 1485 T	0,3 %	376

5.3 Polymorphismen bei Patienten und Kontrollen

Als Polymorphismen gelten solche Varianten, die mit einer Allelfrequenz $>1\%$ auftreten. Nach der Aufdeckung der genetischen Variabilität der drei Chemokinrezeptoren sollten die entdeckten Polymorphismen auf eine Assoziation mit Leukämien und Lymphomen analysiert werden. Die statistische Auswertung wird hierbei auf Polymorphismen beschränkt, da für die Untersuchung von Varianten mit einer Allelfrequenz $<1\%$ die Gruppengrößen nicht ausreichend waren.

5.3.1 Hardy – Weinberg – Verteilung

Im Jahre 1908 fanden Hardy und Weinberg unabhängig voneinander ein Gesetz, welches die Verteilung von Erbmerkmalen in Populationen beschreibt. Geht man von einem Genpool aus, in dem die statistische Wahrscheinlichkeit für die Verbreitung der beiden Allele gleich ist, so lässt sich die Verteilung für die beiden Allele „p“ und „q“ in folgender Abhängigkeit ausdrücken:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Die Hardy - Weinberg - Verteilung gibt die stabile Gleichgewichtssituation in einer Population an, in der weder selektive noch andere Kräfte wirksam sind. Wenn in Populationen eine Abweichung von dieser Verteilung festgestellt wird, kann dies an einer unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeit der verschiedenen Genotypen liegen (Sperlich 1988). Bei vielen populationsgenetischen Untersuchungen wird die theoretische Verteilung nach Hardy-Weinberg analysiert. Hierdurch kann ein besserer Einblick in den Aufbau natürlicher Populationen erlangt werden.

5.3.2 Hardy – Weinberg –Verteilung bei Kontrollen und Patienten

Die Überprüfung der Hardy-Weinberg-Verteilung wurde zunächst für alle Patientengruppen gemeinsam und parallel dazu für die Kontrollen durchgeführt. Für die Berechnung der Wahrscheinlichkeit wurde der χ^2 -Test angewendet. Aus den Tabellen 7 und 8 wird deutlich, dass für alle Polymorphismen die Hardy-Weinberg-Verteilung mit hinreichender Wahrscheinlichkeit anzunehmen ist ($p < 0,05$). Dies gilt im gleichen Maße für die Gruppe der Patienten als auch für die Kontrollgruppe. In der Gesamtheit der untersuchten Proben trat somit keine Anhäufung von bestimmten Genotypen auf, die zu einer Abweichung von der Hardy-Weinberg-Verteilung geführt hätten.

Betrachtet man allerdings die Hardy-Weinberg-Verteilung der Polymorphismen innerhalb der Patientengruppen, so stellt sich heraus, dass hier, bei der im Promotor-Bereich von CXCR5 gelegenen Variante -32 C/A, der X²-Test knapp zu einer Ablehnung der Annahme einer Hardy-Weinberg-Verteilung führt ($p > 0,05$). Dieses Allel hat bei NHL-Patienten eine, gegenüber der allgemeinen Frequenz von 17,0 % auf 25,0 %, erhöhte Allelfrequenz. Bei 50 % der Patienten dieser Gruppe liegt das Allel in heterozygoter Form vor ($n=12$). Ebenso lehnt der X²-Test die Annahme einer Hardy-Weinberg-Verteilung im Falle der ALL-Patienten ab ($p > 0,05$).

Tabelle 7 Überprüfung der Hardy-Weinberg-Verteilung der Polymorphismen innerhalb der Patienten-Gruppe

(ww, homozygot entsprechen der Referenzsequenz; pw, heterozygot; pp, homozygot für den Polymorphismus)

CCR7	Beobachtete Verteilung			Hardy-Weinberg-Vert.			p
Variante	ww	pw	pp	ww	pw	pp	
-745 Ins	0,971	0,029	0,000	0,972	0,028	0,000	<0,001
-475 T/C	0,050	0,493	0,457	0,088	0,417	0,495	<0,05
+82 A/G	0,950	0,050	0,000	0,951	0,049	0,001	<0,001
CXCR4	Beobachtete Verteilung			Hardy-Weinberg-Vert.			p
Variante	ww	pw	pp	ww	pw	pp	
IVS1 +2065 T/A	0,219	0,490	0,292	0,215	0,497	0,288	<0,001
CXCR5	Beobachtete Verteilung			Hardy-Weinberg-Vert.			p
Variante	ww	pw	pp	ww	pw	pp	
- 32 C/A	0,686	0,264	0,050	0,669	0,298	0,033	<0,01
+ 264 C/G	0,714	0,243	0,043	0,698	0,275	0,027	<0,01
IVS1 - 254 T/C	0,086	0,350	0,564	0,068	0,385	0,547	<0,01
+ 1243 C/T	0,957	0,043	0,000	0,958	0,042	0,000	<0,001
+ 1279 C/G	0,136	0,329	0,536	0,090	0,420	0,490	<0,05

Hier entspricht zwar die Allelfrequenz mit 17,2 % dem Durchschnitt der übrigen Gruppen, allerdings fällt diese Patientengruppe durch eine Erhöhung der Anzahl der homozygoten Träger dieser Varianten auf. Während im Durchschnitt nur 4,3% der untersuchten Probanden homozygot für diese Varianten sind, liegt in der Gruppe der ALL-Patienten diese Variante homozygot bei 10,3 % vor. Die Anzahl der heterozygoten Träger der

Variante bei dieser Gruppe ist auf 13,8 % gegenüber 25,5 % im Gesamtdurchschnitt erniedrigt. In den übrigen Patientengruppen konnte nach Prüfung durch den X²-Test die Annahme der Hardy-Weinberg-Verteilung bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 8 Überprüfung der Hardy-Weinberg-Verteilung der Polymorphismen innerhalb der Kontrollgruppe

(ww, homozygot entsprechen der Referenzsequenz; pw, heterozygot; pp, homozygot für den Polymorphismus)

CCR7	Beobachtete Verteilung			Hardy-Weinberg-Vert.			p
Variante	ww	pw	pp	ww	pw	pp	
-745 Ins	0,917	0,083	0,000	0,918	0,080	0,002	<0,001
-475 T/C	0,042	0,417	0,542	0,063	0,375	0,563	<0,01
+82 A/G	0,917	0,083	0,000	0,918	0,080	0,002	<0,001
CXCR4	Beobachtete Verteilung			Hardy-Weinberg-Vert.			p
Variante	ww	pw	pp	ww	pw	pp	
IVS1 +2065 T/A	0,292	0,583	0,125	0,340	0,486	0,174	<0,05
CXCR5	Beobachtete Verteilung			Hardy-Weinberg-Vert.			p
Variante	ww	pw	pp	ww	pw	pp	
- 32 C/A	0,750	0,229	0,021	0,748	0,234	0,018	<0,001
+ 264 C/G	0,708	0,229	0,063	0,677	0,291	0,031	<0,05
IVS1 - 254 T/C	0,042	0,396	0,563	0,057	0,364	0,578	<0,01
+ 1243 C/T	0,958	0,042	0,000	0,959	0,041	0,000	<0,001
+ 1279 C/G	0,083	0,208	0,708	0,035	0,305	0,660	<0,05

5.4 Funktionelle Untersuchungen

Genetische Varianten, die zu einer Veränderung der Aminosäure-Sequenz führen, können die Funktionalität des betroffenen Proteins beeinflussen. Im Falle der Chemokinrezeptoren kann dies verschiedene Effekte haben. Es können Expression, Rezeptordichte auf der Zelloberfläche, Ligandenbindung, Bindung von G-Proteinen und Signaltransduktion beeinflusst werden. Diese Änderungen können direkte Auswirkungen auf die Zelle haben. Natürlich sind die deutlichsten Effekte bei homozygot vorliegenden Varianten zu beobachten, aber auch heterozygote Varianten können einen dominanten Einfluss nehmen.

Heterozygote Varianten können zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors durch veränderte Ligandenbindung oder bei gestörter G-Proteinbindung zu einer veränderten Signaltransduktion führen (Zuscik, Porter et al. 1998; Schmidt, Li et al. 2003; Shinozaki, Butnev et al. 2003). Deshalb sollten die funktionellen Auswirkungen der aufgedeckten Varianten, welche zu Änderungen der Aminosäuresequenz führten, untersucht werden, auch wenn hier nur heterozygote Varianten gefunden wurden.

5.4.1 Expressionsanalysen

Um einen Einfluss der Mutationen auf die Expression und die Rezeptordichte auf der Zelloberfläche zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen transient mit Plasmid-DNA transfiziert. Die Expression der Rezeptoren wurde durch eine Färbung mit Antikörpern, die spezifisch den jeweiligen Chemokinrezeptor erkennen, analysiert. Es wurden hierbei vier mutierte CXCR5-Varianten und eine mutierte CCR7-Variante, die jeweils in einer einzelnen Base verändert worden waren, mit den jeweiligen Rezeptoren verglichen, deren Sequenz der Referenzsequenz entsprach. Die Einzelnukleotidaustausche wurden hierbei mittels einer PCR-basierten Mutationsstrategie in die cDNA-Vektoren, welche die cDNA des Rezeptors unter Kontrolle eines CMV-Promotors enthielten, eingeführt.

5.4.1.1 Expressionsanalyse der CCR7 Variante

Die im zweiten Exon von CCR7 gefundene Variante (+82 A/G) führt zu einem Austausch von Valin zu Methionin an der Position 6 in der Aminosäuresequenz von CCR7 (Val6Met). Um die Expression dieser Variante zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen transient transfiziert. Hierbei wurde die Oberflächen-Expression von CCR7 nach Transfektion mit Plasmid, das die Referenz-cDNA-Sequenz enthielt, mit der verglichen, die durch Transfektion mit einem Plasmid erreicht wurde, das die mutierte cDNA enthielt. Beide Transfektionen führten zu einer vergleichbaren Expression des Chemokinrezeptors auf der Zelloberfläche der HEK293-Zellen, die durch die Bindung des für CCR7 spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAk) Klon 3D12 nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

5.4.1.2 Expressionsanalyse der CXCR5-Varianten

Vier der zehn im codierenden Bereich von CXCR5 gefundenen variablen Basen, führen in der Aminosäuresequenz zu einem Austausch. Die Varianten von CXCR5 wurden ebenfalls mittels der PCR basierten Mutationsstrategie in die cDNA der Expressions-Plasmide eingeführt. Analog zur Untersuchung der CCR7-Varianten wurden HEK293-Zellen mit der Plasmid-DNA transient transfiziert und die Expression mittels des für CXCR5 spezifischen monoklonalen Antikörpers Klon 8B2 überprüft.

Bei der Expression der Varianten +461G/A bzw. Val66Met, +917T/G bzw. Ser218Ala und +1295C/A bzw. Gly344Ser wurden keine Unterschiede bezüglich der Oberflächenexpression oder der Rezeptordichte auf den HEK293-Zellen im Vergleich zu der Expression des unveränderten Rezeptors festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Die Variante +1085C/G, die zu einem Austausch von Prolin zu Alanin in der sechsten Transmembrandomäne des Rezeptors führt, konnte nach Transfektion in der Durchflusszytometrie kaum auf der Oberfläche der transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Eine intrazelluläre Färbung der HEK293-Zellen zeigte aber, dass die Expression intrazellulären Proteins dieser Rezeptorvariante mit der Expression des unveränderten Rezeptors vergleichbar war (Abb. 10).

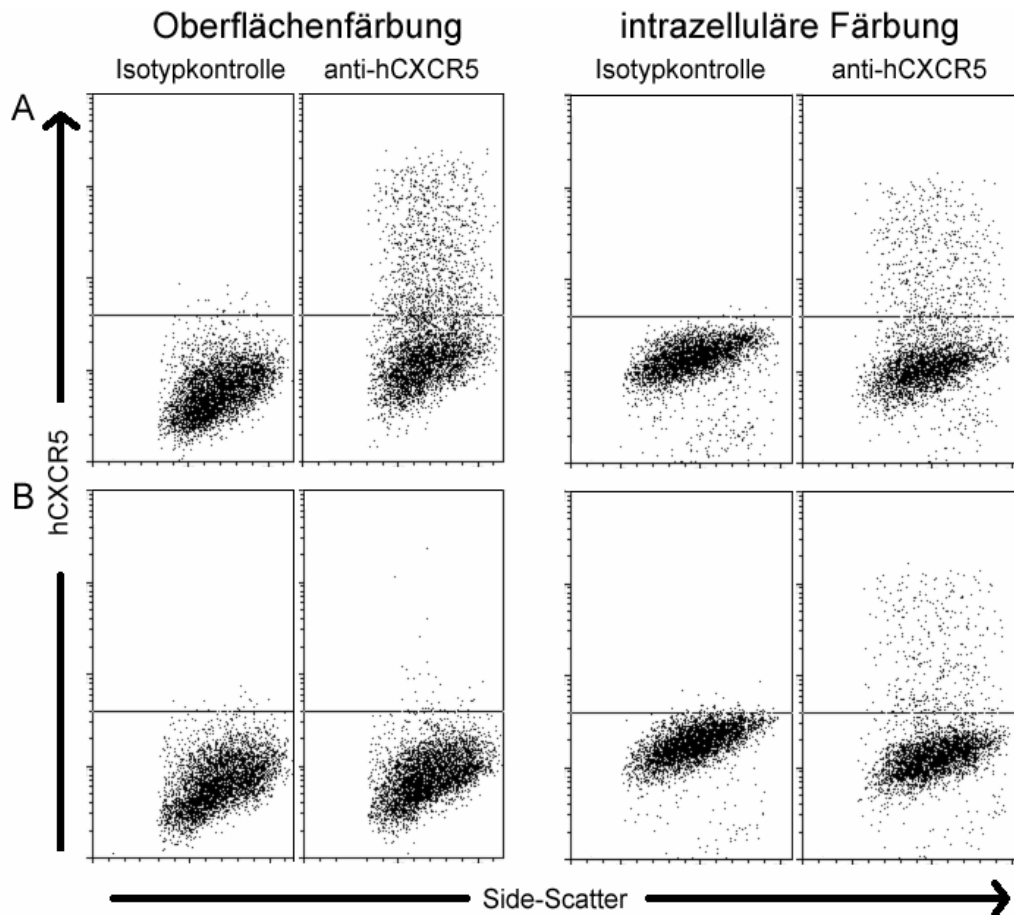


Abb. 10 Analyse der Expression von CXCR5 und der Variante +1085C/G (Pro274Ala)

Transient transfizierte HEK293-Zellen exprimieren unverändertes (A) oder mutiertes CXCR5, Variante +1085C/G (B), und wurden mit einer Isotypkontrolle oder anti-hCXCR5 (8B2) und Esel-anti-Ratte-FITC gefärbt. Der unveränderte Rezeptor wird auf der Oberfläche angefärbt, während der mutierte Rezeptor nicht auf der Oberfläche gefärbt werden kann. Werden die Zellen fixiert und die Zellmembran permeabilisiert, wird auch der mutierte Rezeptor intrazellulär detektiert.

Die intrazelluläre Färbung von CXCR5 bzw. Pro278Ala CXCR5 transfizierten HEP2-Zellen zeigte, dass der unveränderte Rezeptor sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär nachgewiesen werden kann. Der mutierte Rezeptor ist auch in der histologischen Analyse nur im Zellinneren nachzuweisen. Besonders Bereiche um den Zellkern herum färbten sich besonders stark an (Abb. 11).

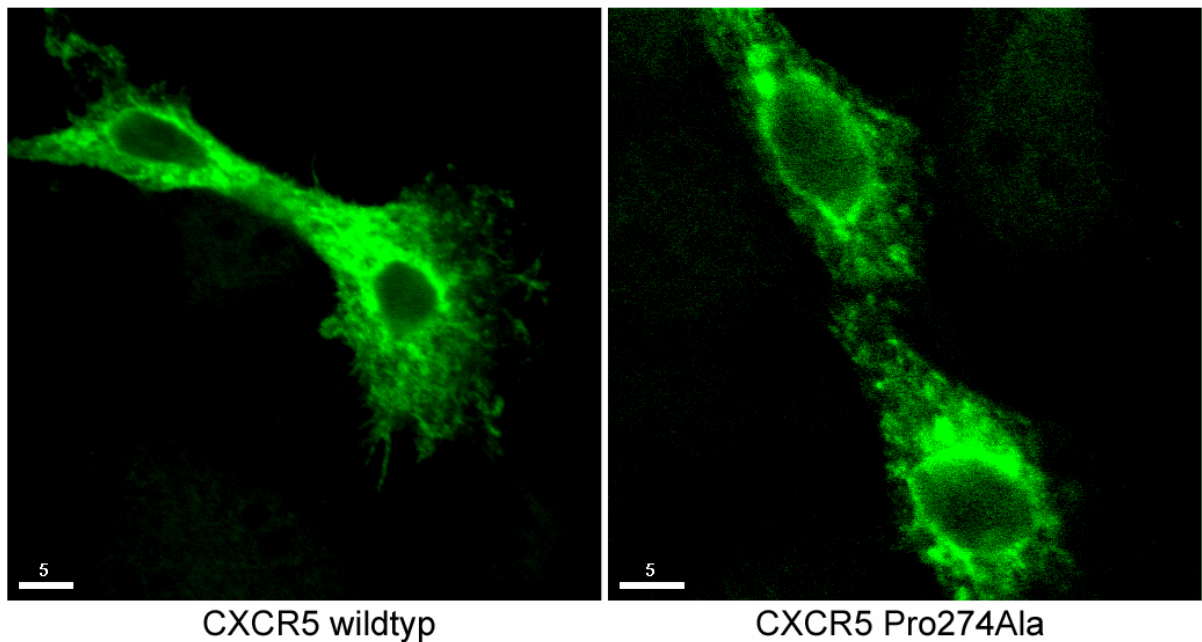


Abb. 11 Konfokale immunhistologische Aufnahme von CXCR5 transfizierten HEP2-Zellen

HEP2-Zellen wurden auf einem Objektträger kultiviert und mit unverändertem (links) oder mutiertem hCXCR5 transfiziert (rechts). Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit anti-hCXCR5 (8B2) und Esel-anti-Ratte-FITC gefärbt.

Um auszuschließen, dass die gestörte Oberflächenexpression des mutierten CXCR5 Pro274Ala mit einer über den Aminosäureaustausch hinausgehenden Veränderung des Rezeptors zusammenhängt, wurde die Größe des Proteins in einem Western-Blot untersucht. Hierzu wurden transient transfizierte HEK293-Zellen aufgeschlossen und durch differentielle Zentrifugation die Membranfraktion aus dem Aufschluss isoliert. Nachdem die Proteine aus den Membranfragmenten durch ein Detergenz herausgelöst worden waren, wurde eine reduzierende SDS-PAGE durchgeführt. Diese wurde dann auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und das Protein wurde mit anti-CXCR5 (8B2) nachgewiesen. Es wurden zwei spezifische Banden detektiert. Eine Proteinbande hatte eine Größe von ca. 45 kD, die zweite eine Größe von ca. 90 kD. Dabei handelte es sich um monomere und dimerisierte Rezeptorproteine. Während beim unveränderten Rezeptor beide Banden die gleiche Intensität aufweisen, ist die Intensität der 90 kD Bande bei dem mutierten Rezeptor stärker als die Intensität der Bande des monomeren Rezeptors bei 49 kD. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Verhältnis monomerer zu dimerisierten Rezeptoren bei der Variante CXCR5 Pro274Ala zu Gunsten der dimerisierten Rezeptoren

verschoben ist. Dennoch wird sehr deutlich, dass die Proteingröße des mutierten CXCR5 dem des unveränderten Rezeptors entspricht (Abb. 12).

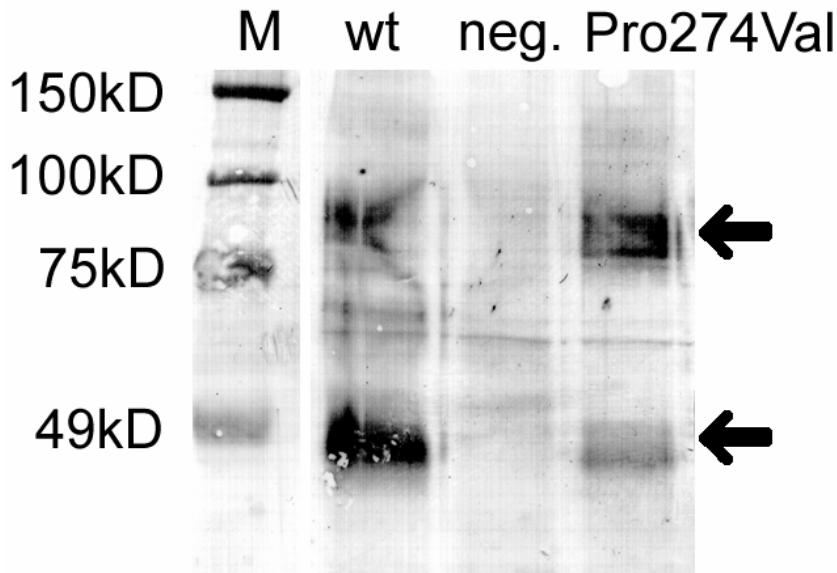


Abb. 12 CXCR5 spezifischer Westernblot mit Membranproteinen transfizierter HEK293

HEK293-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für unverändertes hCXCR5 (wt), invers orientiertes hCXCR5 (neg.) oder der Variante CXCR5 Pro274Ala transfiziert. Die Membranproteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit dem CXCR5 spezifischen mAk 8B2 und Ziege-anti-Ratte-AP detektiert (M Größenmarker).

5.4.2 Ligandenbindung und Signaltransduktion

Mutationen können bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren in verschiedenen Ebenen der Rezeptorfunktion Veränderungen herbeiführen. Die Bindung eines spezifischen Liganden ist von der extrazellulären Struktur des Rezeptors abhängig. Man geht davon aus, dass die sieben Transmembrandomänen sich so anordnen, dass die extrazellulären Schleifen zusammen mit dem freien N-Terminus eine spezifische dreidimensionale Struktur bilden, an die nur spezifische Liganden binden können. Über die Art der Rezeptor-Liganden-Interaktion gibt es zur Zeit noch keine Informationen, da die kristallographische Untersuchung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren schwierig ist. Bisher konnte die Kristallstruktur nur beispielhaft am Rhodopsin erfolgreich analysiert werden (Palczewski, Kumasaka et al. 2000). Kristallographische Untersuchungen zur Rezeptor-Liganden-

Interaktion stehen noch aus. Man geht davon aus, dass die Ligandenbindung eine Konformationsänderung herbeiführt, die dann die Bindung des heterotrimeren G-Proteins beeinflusst. Es können sog. „*Second-Messenger*“ induziert werden, zum Beispiel zyklisches Adenosin-Monophosphat oder Inositolphosphat, die eine Veränderung des intrazellulären Kalzium-Spiegels hervorrufen können. Es können aber auch komplexe Singaltransduktionskaskaden ausgelöst werden, die in der spezifischen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren enden und somit die Expression verschiedene Gene beeinflussen können. Manche dieser Kaskaden bestehen aus einer Reihe von „*mitogen activated protein kinase*“ (MAP-Kinasen), die sich nacheinander phosphorylieren. Eine dieser Kaskaden läuft über die MAP-Kinasen MEK-1 und ERK und endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1. Es war bekannt, dass die Bindung der spezifischen Liganden an CCR7 und CXCR5 (P.Reiterer, MDC Berlin, pers. Kommunikation und Muller and Lipp 2001) die Induktion und die Aktivierung von Elk-1 beeinflusst, deshalb wurde dieser Signalweg hier funktionell untersucht.

5.4.2.1 Herstellung stabil transformierter polyklonaler Zelllinien

Um die funktionellen Eigenschaften der veränderten Chemokinrezeptoren näher zu untersuchen, wurden die drei auf der Oberfläche exprimierte Varianten von CXCR5 und die Variante von CCR7 stabil in HEK293-Zellen exprimiert. Hierzu wurden HEK293-Zellen transient mit dem entsprechenden Plasmiden transfiziert und anschließend unter Selektion mit G418 kultiviert. Um homogene und untereinander vergleichbare transformierte Zellen zu erhalten, wurden die stabil transformierten HEK293-Zellen, die den Rezeptor exprimierten über zweimalige Durchflusszytometrie-Sortierung am FACS Vantage (Becton Dickinson) angereichert, so dass ein polyklonaler Pool HEK293-Zellen generiert wurde, in dem >95% der Zellen positiv für die Oberflächenexpression der entsprechenden Chemokinrezeptor-Varianten waren. Diese polyklonalen Pools wurden wiederholt vor den Experimenten auf die gleichmäßige Expression der Chemokinrezeptoren getestet, die Expression blieb dabei über den gesamten Versuchszeitraum stabil (Daten nicht gezeigt).

5.4.2.2 Ligandenbindung an Chemokinrezeptoren induziert Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration

Es wurde gezeigt, dass die Bindung des spezifischen Liganden an Chemokinrezeptoren eine kurzzeitige Erhöhung der Kalzium-Konzentration in der Zelle auslösen kann (Neote,

DiGregorio et al. 1993; Bleul, Farzan et al. 1996; Gunn, Ngo et al. 1998; Ngo, Tang et al. 1998). Diese Änderungen der Konzentration freier Kalzium-Ionen kann durch Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht werden, die abhängig von der Bindung freier Kalzium-Ionen ihre Anregungs- oder Emissionseigenschaften verändern. In den hier durchgeführten Experimenten wurde FURA-2 verwendet (Grynkiewicz, Poenie et al. 1985).

Die durch stabile Transformation erzeugten polyklonalen Rezeptor-transgenen HEK293-Zellen wurden zur Messung mit FURA-2 beladen. Dieser Farbstoff hat in Abhängigkeit von der Konzentration freier Kalzium-Ionen unterschiedliche Anregungsmaxima. Durch die Bindung des Liganden an den Chemokinrezeptoren verändert sich die Kalzium-Konzentration in der Zelle. Dies kann in einem UV-Spektrometer gemessen werden.

5.4.2.2.1 Stimulation von CXCR5 auf HEK293-Zellen

Die mit CXCR5 transformierten HEK293-Zellen wurden mit unterschiedlichen Stimuli behandelt, um deren Einfluss auf die intrazelluläre Kalzium-Konzentration zu untersuchen. Abb. 13 zeigt die Messwerte der Rohdaten einer Messung. Durch die Öffnung der Messküvette bei der Zugabe der zu untersuchenden Substanz fiel der Messwert aus dem Messbereich. Die Messwerte, die mit geöffneter Messküvette zum Zeitpunkt der Stimuluszugabe erzeugt wurden, wurden in der späteren Auswertung nicht berücksichtigt. In dem dargestellten Versuchsansatz wurden die Zellen nach ca. 60 s zunächst mit dem Liganden von CXCR5, CXCL13 (BLC), stimuliert. Hierdurch erhöhte sich die Kalziumkonzentration in den Zellen. Mit dieser Änderung erhöhte sich der Anteil an FURA-2/ Ca^{2+} , dessen Absorption bei 340 nm steigt während die Absorption bei 380 nm fällt. Etwa 180 s nach Zugabe des ersten Stimulus hatte die Absorption wieder die Ausgangswerte erreicht. Durch Zugabe von FKS wurden die Zellen unabhängig von Chemokinrezeptoren stimuliert. Nach weiteren ca. 180 s hat die Absorption wieder eine Basislinie erreicht. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittels (HBSS) zugegeben. Das Lösungsmittel selbst verändert die intrazelluläre Kalzium-Konzentration nicht, wodurch gezeigt wurde, dass die beobachteten Kalzium-Konzentrationsänderungen spezifisch für das verwendete Chemokin waren.

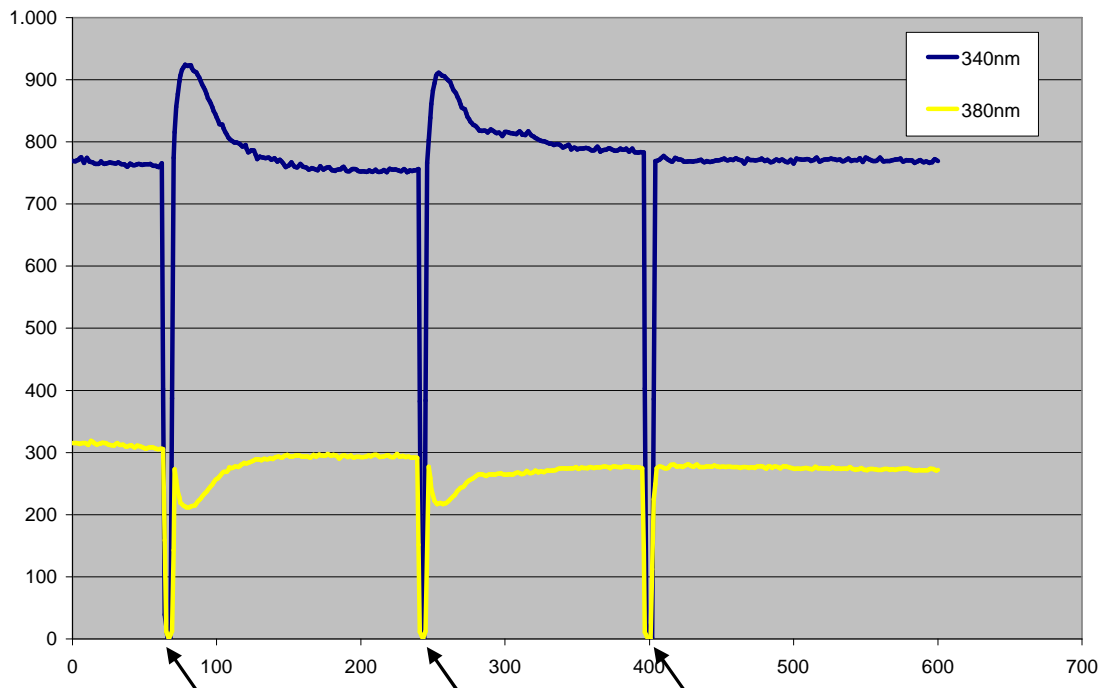


Abb. 13 Messung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in HEK293-Zellen

Die Anregung des Farbstoffs FURA-2 in einem UV-Spektrometer erfolgt bei 340nm und 380 nm. Bindet der Farbstoff Kalzium, steigt die Emission bei 510 nm nach Anregung bei 340 nm an (blaue Linie), während sie bei der Anregungswellenlänge 380nm sinkt (gelbe Linie). Durch das Öffnen der Messzelle für die Zugabe der Stimulationssubstanzen kommt es zu Messwerten außerhalb des Messbereichs (Pfeile).

In den weiteren Darstellungen wurden die Quotienten aus der Absorption 340 nm / 380 nm verwendet. Es wurden HEK293-Zellen eingesetzt, die entweder den unveränderten Rezeptor oder einen der mutierten Chemokinrezeptoren stabil exprimierten. In den folgenden Abbildungen sind repräsentative Kurvenverläufe für die einzelnen HEK293-Zelllinien dargestellt. Die Versuchsansätze wurden mindestens dreimal wiederholt.

Die Zugabe des spezifischen Liganden CXCL13 (BLC) zu den mit CXCR5 transfizierten HEK293-Zellen bewirkte einen deutlichen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration, wodurch sich das Verhältnis der Emission nach Anregung bei 340nm zur Emission nach Anregung bei 380nm von ca. 2,5 auf ca. 4,5 erhöht (Abb 14, erster Pfeil). Die Zugabe von FKS (Abb 14, zweiter Pfeil) führte zu einer Änderung der Kalzium-Konzentration, die etwa der Änderung, die durch CXCL13 induziert wurde, entsprach. Die Zugabe des Lösemittels (HBSS) veränderte die Kalzium-Konzentration hingegen nicht (Abb. 14, dritter Pfeil).

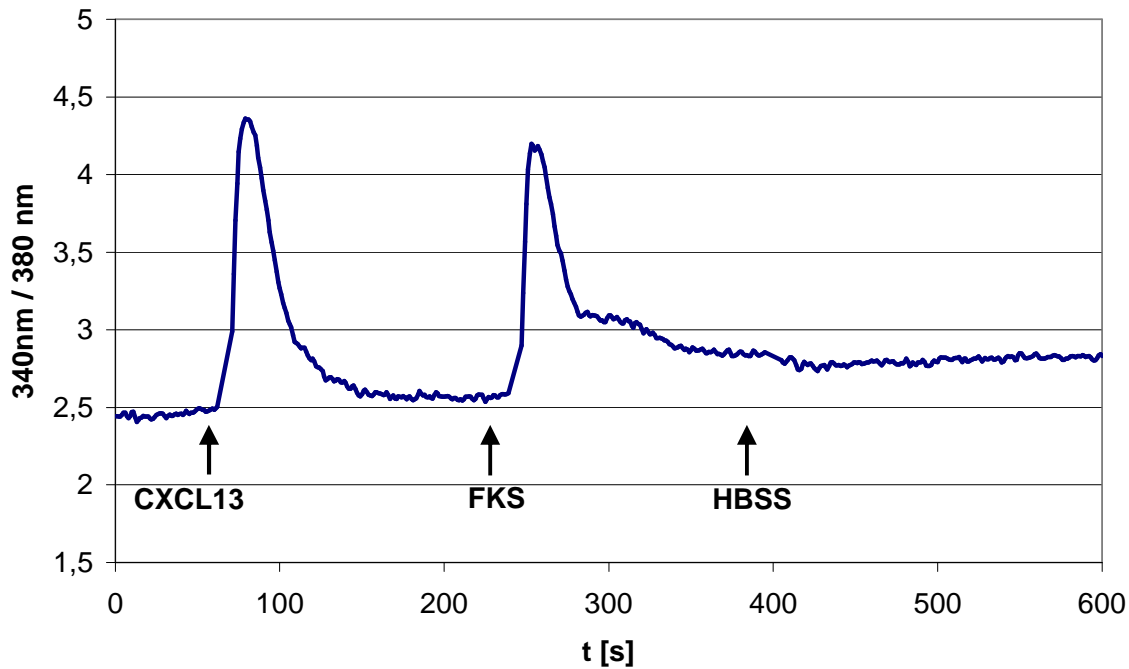


Abb. 14 Messung der Kalzium-Konzentration in HEK293-Zellen, die unverändertes CXCR5 exprimieren

Durch Zugabe von CXCL13 steigt die Kalzium-Konzentration rasch an und fällt dann allmählich wieder auf den Ausgangswert zurück. Durch Zugabe von FKS lassen sich die Zellen erneut stimulieren, während die Zugabe des Puffers, in dem das Chemokin gelöst war (HBSS), keinen Effekt auf die Kalzium-Konzentration hat.

Als Kontrolle für die Spezifität der Stimulation durch die Chemokine wurden Zellen verwendet, die mit einem Plasmid transfiziert worden waren, das CXCR5 in Antisense-Orientierung enthält, so dass kein funktionelles Protein gebildet wird. So kann die Spezifität der Ligandenbindung an den transgen exprimierten Chemokinrezeptor nachgewiesen und die Bindung an endogene Rezeptoren auf der Oberfläche der HEK293-Zellen ausgeschlossen werden. Diese Zelllinie wurde als Kontrolle für die CXCR5-spezifischen Stimulation und ebenso für die Kontrolle der CCR7-spezifischen Stimulation verwendet.

Aus Abb. 15 wird ersichtlich, dass weder die Zugabe von CXCL13 noch von CCL19 eine Erhöhung der Kalzium-Konzentration bewirkte ebenso wie die Zugabe des Lösungsmittels HBSS. Erst die Zugabe von FKS führte zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration. Die durch FKS induzierte Änderung der Kalzium-Konzentration diente gleichzeitig als Nachweis für die Beladung der Zellen mit FURA-2 sowie für die Vitalität der Zellen. Nachdem die Kalzium-Konzentration wieder gesunken war, ließ sich durch

erneute Zugabe einer größeren Menge FKS nur noch eine leichte Erhöhung der Kalzium-Konzentration auslösen.

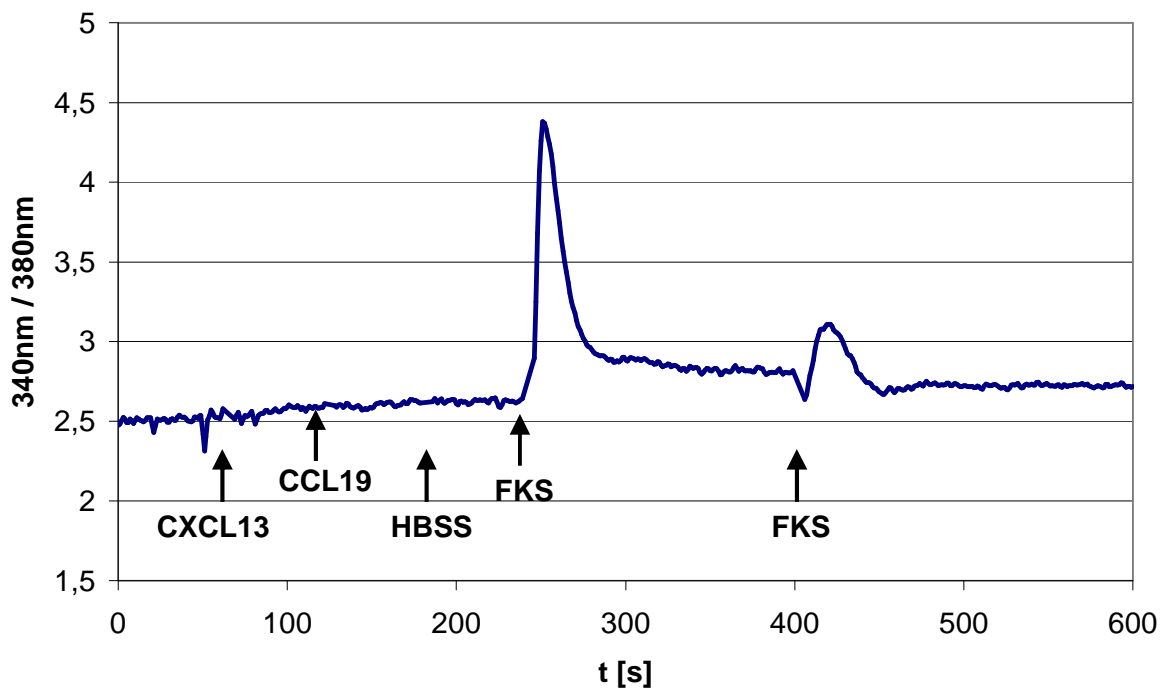


Abb. 15 Stimulation der mit Antisense-CXCR5 transformierten Kontroll-Zelllinie

Die Zugabe von Chemokinen (CXCL13 und CCL19) und Puffer (HBSS) an den durch Pfeile markierten Zeitpunkten führte zu keiner Veränderung der Kalzium-Konzentration. Durch Zugabe von FKS wurden die Zellen stimuliert.

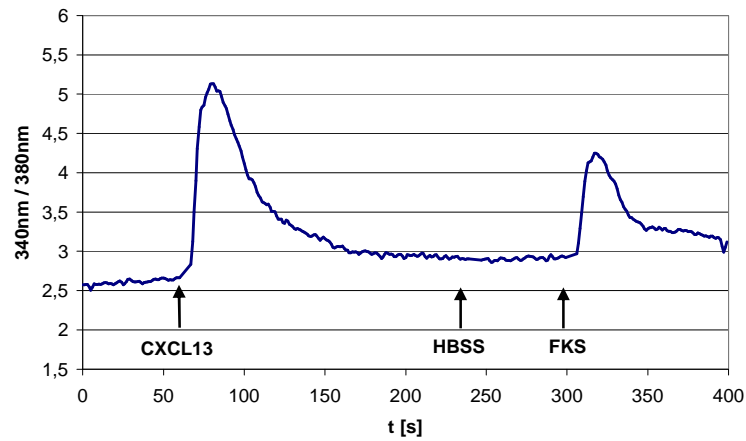
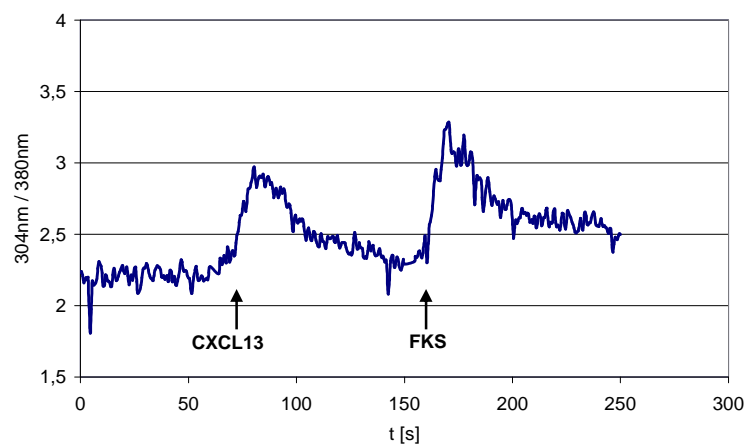
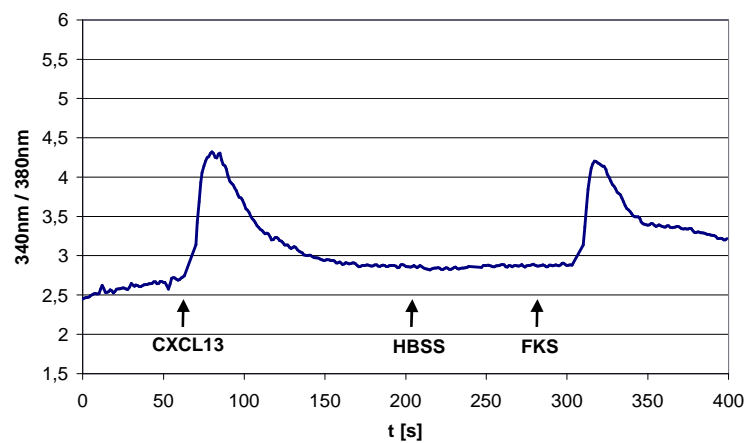
A**B****C**

Abb. 16 Messung der Kalzium-Konzentration in HEK293-Zellen, die Varianten von CXCR5 exprimieren

Die Stimulation mit CXCL13 (erster Pfeil) löst bei den CXCR5-Varianten Val66Met (A), Ser218Ala (B) und Gly344Ser (C) einen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration aus. Die Zugabe von HBSS bleibt ohne Effekt, während die Zugabe von FKS (letzter Pfeil) ebenfalls einen Anstieg der Kalzium-Konzentration bewirkt.

Die Ligandenbindung an die in HEK293-Zellen exprimierte CXCR5-Variante Val66Met (Abb. 16A), Ser218Ala (Abb. 16B) und Gly344Ser (Abb. 16C) löste eine Änderung der Kalzium-Konzentration aus, die der Konzentrationsänderung in den mit unverändertem CXCR5 transfizierten HEK293 entsprach. Hieraus wurde ersichtlich, dass keine der Varianten von CXCR5, die auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wurden, eine Veränderung der Signalweiterleitung aufwies, die zu Änderungen der Kalzium-Konzentration in HEK293 führte.

5.4.2.2 Stimulation von CCR7 auf HEK293-Zellen

Analog zu der Stimulation von HEK293-Zellen, die CXCR5 exprimierten, wurden auch CCR7 exprimierende HEK293-Zellen mit dem entsprechenden Liganden stimuliert. Hier wurde die Kalzium-Mobilisierung durch den unveränderten CCR7-Rezeptor mit der Variante CCR7 Met6Val verglichen.

Die HEK293-Zellen wurden hierbei zunächst mit ELC stimuliert, dann wurde HBSS zugegeben, um einen Effekt des Lösungsmittels auszuschließen. Abschließend wurden die Zellen mit FKS stimuliert, um die Responsivität der Zellen zu prüfen. Beide Formen von CCR7 induzieren nahezu identische Änderung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, die aber von geringerer Intensität war als die durch CXCR5 induzierte. Die Änderung der Kalzium-Konzentration nach FKS-Zugabe entsprach jedoch der Änderung, die in den CXCR5-exprimierenden Zellen induziert wurde. Man kann also annehmen, dass die Beladung und die Möglichkeit zur Induktion von Kalzium-Signalen in allen Zelllinien etwa gleich war und dass die unterschiedliche Signalintensität auf Rezeptor-spezifische Unterschiede zurückzuführen war.

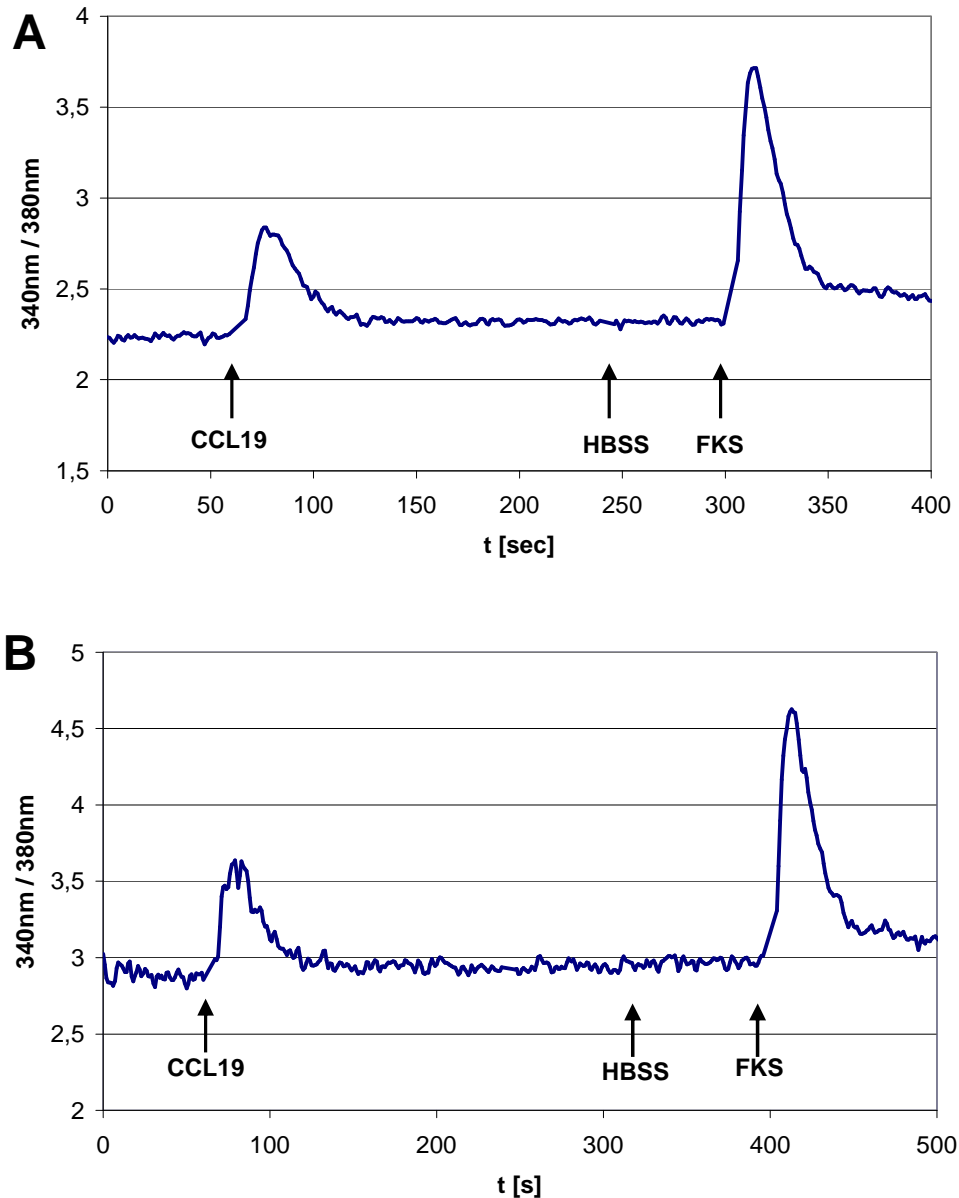


Abb. 17 Stimulation von CCR7 exprimierenden HEK293 durch ELC

Mit CCR7 transfizierte Zellen wurden mit CCL19, HBSS und FKS zu den markierten Zeitpunkten stimuliert. Die Änderungen in der Kalzium-Konzentration nach Liganden- oder FKS-Zugabe entsprachen bei unverändertem CCR7 (A) denen, die durch die Variante CCR7 Met6Val ausgelöst wurden (B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Variationen der Aminosäuresequenzen beider Chemokinrezeptoren keine Unterschiede bei der Liganden-induzierten Änderung der Kalzium-Konzentration in transformierten HEK293-Zellen zu beobachten waren.

5.4.2.3 Induktion des MAP-Kinase-Signalweges

Neben der sehr kurzzeitigen, aber rasch induzierten Änderung der Kalzium-Konzentration wurde auch die Aktivierung von MAP-Kinasen untersucht. Für CXCR5 und CCR7 konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es nach Ligandenbindung an die Rezeptoren in CHO-K1 Zellen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 kommt. Unter Verwendung des *Path Detect Elk trans-Reporter Systems* (Stratagene) wurde die Induktion von Elk-1 untersucht. Hierbei wurde neben den bereits bei der Induktion des Ca²⁺-Signals verwendeten Varianten von CXCR5 auch die Variante CXCR5 Pro274Ala eingesetzt.

Die CHO-K1-Zellen wurden mit verschiedenen Chemokinrezeptorvarianten sowie den Reporter- und Transkriptionsfaktor-Plasmiden co-transfiziert. Die Expression der *Firefly*-Luziferase, die durch die Aktivität des MAPK-Signalwegs beeinflusst wird, wurde hierbei in allen Versuchen in Bezug zur Expression der *Renilla*-Luziferase gesetzt. Hierdurch konnten experimentell bedingte Schwankungen (Zellzahl, Transfektionseffizienz) berücksichtigt werden. Aus dem Quotienten beider Messwerte ergab sich die relative Luziferaseaktivität (4.2.5.8).

Ein Vergleich von unstimulierten und mit CXCL13 stimulierten CHO-K1-Zellen, die mit dem unveränderten Rezeptor transfiziert worden waren, zeigte, dass sich durch die Stimulation von CXCR5 auf der Zelloberfläche eine deutliche Expression der *Firefly*-Luziferase induzieren ließ (Abb. 18A und B). Die mit der Negativkontrolle transfizierten Zellen zeigten zwar eine etwas erhöhte Aktivität des Signalweges in diesen Zellen, aber keinen Unterschied zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen (Abb. 18A und B). Bei den Zellen, die mit den Rezeptorvarianten CXCR5 Val66Met bzw. CXCR5 Gly344Ser transfiziert wurden, entsprach die Induktion der *Firefly*-Luziferase-Expression in etwa der des unveränderten Rezeptors (Abb. 18A).

Im Gegensatz hierzu ließ sich durch die Stimulation der Rezeptorvariante CXCR5 Ser218Ala mit CXCL13 keine Zunahme der Expression der *Firefly*-Luziferase induzieren (Abb. 18A). Bei der Rezeptorvariante CXCR5 Pro274Ala, die nicht auf der Zelloberfläche exprimiert war, induzierte die Zugabe des Liganden, verglichen mit den unstimulierten transfizierten Zellen, ebenfalls keine signifikante Zunahme der *Firefly*-Luziferase-Expression. Bemerkenswert ist aber, dass die Transfektion mit dem Rezeptor zu einer deutlichen Zunahme der intrinsischen Expression der *Firefly*-Luziferase führte. Diese erhöhte intrinsische Expression führte zu einer relativen Luziferaseaktivität, die der

Liganden-induzierten Stimulation, der mit dem unveränderten Rezeptor transfizierten Zellen entsprach (Abb. 18B).

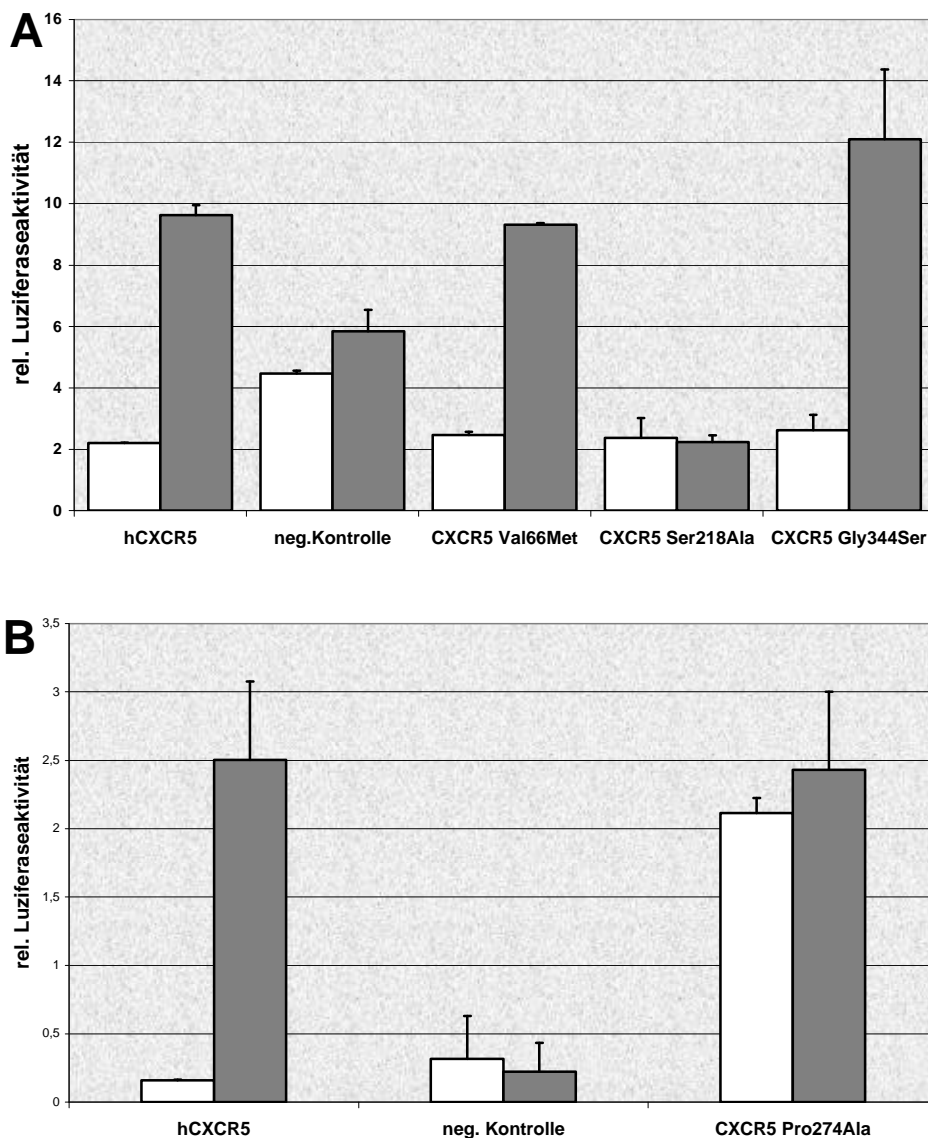


Abb. 18 Relative Luziferaseaktivität in CXCR5 transfizierten CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen sind mit Expressionsplasmiden der angegebenen Varianten von CXCR5 und für den Assay notwendigen Reporter-Plasmiden transfiziert worden. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst serumfrei und dann ohne (weißer Balken) oder mit 10 nM CXCL13 (dunkler Balken) inkubiert (hCXCR5, unveränderter Rezeptor; neg. Kontrolle: inverses hCXCR5).

Bei den mit CCR7 transfizierten Zellen ist zwischen dem unveränderten Rezeptor hCCR7 und der Variante CCR7 Met6Val kein Unterschied in der Induktion des MAPK-Signalweges zu erkennen (Abb. 19). Die relative Luziferaseaktivität stieg durch die

Zugabe des Liganden jeweils um ca. das Dreifache an. Wie schon bei der Induktion des Kalzium-Signals zu beobachten war, lag die Signalhöhe bei der Induktion des MAPK-Signalweges in den CXCR5-transfizierten CHO-K1 Zellen über denen, die mit CCR7 transfiziert worden waren.

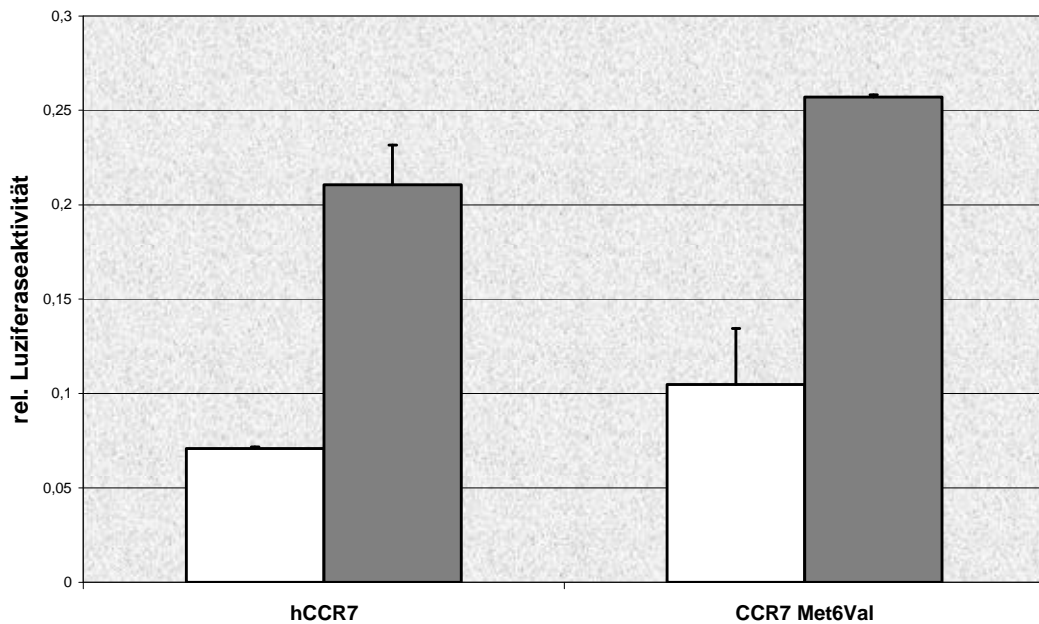


Abb. 19 Relative Luziferaseaktivität in CCR7 transfizierten CHO-K1 Zellen

Wie bei der Untersuchung der Induktion von Luziferase durch die Ligandenbindung bei CXCR5 sind auch hier CHO-K1-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden für die CCR7-Rezeptoren und den Reporter- und Transkriptionsfaktor-Plasmiden transfiziert worden. 24 h später wurden die Zellen zunächst ohne FKS und anschließend ohne (weißer Balken) oder mit 10nM CCL19 (dunkler Balken) inkubiert.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die genetische Variabilität der Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7 untersucht, die alle eine Rolle bei der homöostatischen Wanderung von Lymphozyten spielen. Da diese Rezeptoren auf vielen Tumorzellen lymphoiden Ursprungs exprimiert werden, sollte dabei eine mögliche Rolle genetischer Variationen dieser Rezeptoren bei der Entstehung, Progression und Metastasierung von hämatopoetischen Tumorerkrankungen untersucht werden. Hierfür wurden die regulatorischen und codierenden Sequenzen sowie die Übergänge zwischen Intron- und Exonbereichen der drei Chemokinrezeptoren bei 135 Patienten, die an verschiedenen hämatopoetischen Tumorerkrankungen litten, vergleichend sequenziert. Als Kontrolle standen 48 Proben gesunder Probanden zur Verfügung. Die funktionelle Bedeutung ausgewählter Variationen wurde *in vitro* in verschiedenen Versuchsansätzen näher analysiert.

6.1 Unterschiede in der genetischen Variabilität der untersuchten Chemokinrezeptoren

Die polymorphen Spektren der drei untersuchten Chemokinrezeptoren zeigten drei stark voneinander abweichende Profile. Im untersuchten Sequenzbereich des Gens, das für CXCR4 codiert, wurde nur eine einzige variable Position gefunden. Dieser Polymorphismus, der mit einer Allelfrequenz von 49,7% beobachtet wurde, lag im Intron. Im Gegensatz zu der relativ invariablen Sequenz von CXCR4 wies der analysierte Sequenzabschnitt von CCR7 vier variable Positionen auf. Drei davon hatten eine Allelfrequenz >1% und waren als Polymorphismen zu betrachten. Die höchste Variabilität innerhalb der Gruppe der untersuchten Chemokinrezeptoren wurde bei der Sequenz des CXCR5-Gens festgestellt. Hier konnten 17 variable Positionen festgestellt werden. Sechs dieser variablen Positionen hatten eine Allelfrequenz >1%.

Anhand der Analysen von Datenbankeinträgen verschiedener Klone derselben Gen-Abschnitte und anderen vergleichenden Sequenzuntersuchungen wurde eine große Anzahl von variablen Positionen im menschlichen Genom festgestellt (Sachidanandam, Weissman et al. 2001). Es handelt sich bei der Mehrzahl dieser variablen Positionen um SNP. Hierbei wurde eine durchschnittliche Rate von einem SNP je 1,9 kb bzw. 0,53 SNP / 1000 bp Gesamtsequenz festgestellt. Die Datenbankeinträge bestanden zum Zeitpunkt der

Untersuchung vor allem aus exprimierten Sequenzabschnitten (engl. *expressed sequence tags*, EST). In diesen Datenbank-basierten Untersuchungen wurde eine durchschnittliche Frequenz von einem SNP je 1,08 kbp bzw. 0,93 SNP / 1000 bp exonischer Sequenz (translatiert und untranslatiert) festgestellt. Bei dieser Methode muss aber beachtet werden, dass die Zahl der mit einander verglichenen Sequenzen durch die geringe Anzahl der Datenbankeinträge begrenzt ist. Zudem stammen die Sequenzen oft aus verschiedenen Quellen (primäres Material oder Zellkulturlinien) sowie verschiedenen ethnischen Gruppen stammt. Deshalb werden nur Varianten mit einer vergleichsweise hohen Allelfrequenz gefunden.

Gezielte Untersuchungen verschiedener Gene haben gezeigt, dass die Variabilität einzelner Gene im Vergleich zur oben beschriebenen Methode stark abweichen kann. Eine der ersten publizierten größeren Studien zu der Variabilität einer Gensequenz wurde am Lipoprotein-Lipase-Gen (LPL-Gen) durchgeführt (Nickerson, Taylor et al. 1998). Hier wurden 72 Proben aus drei verschiedenen ethnischen Gruppen untersucht und eine Rate von 2 variablen Positionen je 1000 bp festgestellt. Allerdings lag hier die Rate in den codierenden Regionen des LPL-Gens mit 0,5 / 1000 bp niedriger als in der Gesamtsequenz.

Im Vergleich hierzu zeigte die Variabilität der untersuchten Chemokinrezeptoren interessante Abweichungen von dieser durchschnittlichen Frequenz variabler Positionen. Während CXCR4 sich als besonders invariabel präsentiert, ist die Häufigkeit von veränderlichen Positionen in CXCR5 stark erhöht. Über die Ursprünge dieser unterschiedlichen Variabilitäten können nur Mutmaßungen angestellt werden. Im Falle von CXCR4 liegt es nahe, dass das Gen aufgrund seiner Bedeutung nicht nur bei der Migration von Lymphozyten, sondern auch in der Embryogenese, einem erhöhten Druck in der Evolution unterliegt. Die Untersuchungen an Mäusen mit deletiertem CXCR4-Gen haben gezeigt, dass ein Fehlen dieses Gens schon während der Embryonalentwicklung zum Tode führt (Zou, Kottmann et al. 1998). Hierin mag auch der Grund dafür liegen, dass es eine hohe Konservierung der Sequenz dieses Gens zwischen den Arten gibt (Loetscher, Geiser et al. 1994; Heesen, Berman et al. 1996; Benton, Lee et al. 1998). Es ist daher nicht verwunderlich, dass in diesem Gen innerhalb der Spezies Mensch kaum Variationen auftreten.

Im Gegensatz zu den letalen Folgen bei der CXCR4-defizienten Maus sind die beiden genetisch manipulierten Mausstämme, die entweder kein CCR7 oder CXCR5 mehr

exprimieren, lebensfähig (Förster, Mattis et al. 1996; Förster, Schubel et al. 1999). Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass fehlende Expression von CCR7 zu einer Reihe von immunologischen Defekten führt (Förster, Schubel et al. 1999). Dies könnte in der Evolution zu einer Auslese von Varianten geführt haben, die mit einer starken Einschränkung der Funktion von CCR7 verknüpft waren. Bei CXCR5-defizienten Mäusen sind solche Defekte weniger stark ausgeprägt (Förster, Mattis et al. 1996). Somit ist hier eventuell der Grund dafür zu suchen, dass sich im Gen von CXCR5 überdurchschnittlich viele Varianten feststellen ließen.

6.2 Die Bedeutung von Chemokinrezeptoren bei verschiedenen Erkrankungen

6.2.1 Chemokinrezeptoren und ihre Rolle in der Metastasierung solider Tumoren

Die Untersuchungen zur Expression und Funktion von Chemokinrezeptoren haben gezeigt, dass diese Moleküle bei den verschiedenen Linien hämatopoetischer Zellen differentiell exprimiert werden und bei der Steuerung der Wanderung und Lokalisation dieser Zellen eine zentrale Stellung einnehmen. Nach der Aufklärung ihrer Funktion bei der Wanderung von Blutzellen, sind die Chemokinrezeptoren auch hinsichtlich ihrer Bedeutung bei pathologischen Prozessen in das Interesse der Forscher gerückt. Untersuchungen von Zellen zahlreicher Tumorerkrankungen zeigten, dass die Expression von Chemokinrezeptoren einen wichtigen Beitrag für die gerichtete Metastasierung von Tumoren in verschiedene Organe leistet. So konnte gezeigt werden, dass bei Brustkrebs die Metastasenbildung im Lymphknoten mit einer Expression von CCR7 und CXCR4 assoziiert ist (Muller, Homey et al. 2001). Auch für die Metastasenbildung anderer Krebsarten und die Wanderung der Metastasen in spezifische Organe spielt die Expression von Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle: CCR6 bei der Bildung von Lebermetastasen (Dellacasagrande, Schreurs et al. 2003), CXCR3, CXCR4, CCR7 und CCR10 bei der Metastasierung von Melanomen in die Lunge und in Lymphknoten (Robledo, Bartolome et al. 2001; Wiley, Gonzalez et al. 2001; Payne and Cornelius 2002) und CCR7 bei der Ansiedelung von Lymphknotenmetastasen bei Magen- und Lungenkrebs (Mashino, Sadanaga et al. 2002; Takanami 2003). Neben diesen Erkrankungen, bei denen Chemokinrezeptoren auf nicht-hämatopoetischen Tumorzellen eine Rolle spielen, ist auch

die Untersuchung der Bedeutung von Chemokinrezeptoren bei Erkrankungen, die auf Zellen hämatopoetischen Systems zurückgehen, von Interesse.

6.2.2 Chemokinrezeptoren bei Hämatopoetischen Tumorerkrankungen

Die Zellen des hämatopoetischen Systems exprimieren während ihrer Entwicklung und Differenzierung verschiedene Chemokinrezeptoren in Abhängigkeit vom Zelltyps und des aktuellen Grades der Differenzierung und Aktivierung (Moser, Loetscher et al. 1998; Cyster 1999; Baggiolini and Loetscher 2000; Johnston and Butcher 2002). Es lag somit nahe, dass diese Rezeptoren auch bei Tumorerkrankungen, die auf solche Zellen zurückgehen, eine Rolle spielen könnten.

Viele Studien haben sich mit der Assoziation von Chemokinrezeptoren mit verschiedenen Subtypen von hämatopoetischen Tumorerkrankungen befasst. Es wurde gezeigt, dass die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren auf Leukämie-Zellen verändert sein kann. So wurde bei Patienten mit B-CLL in verschiedenen Studien eine verstärkte Expression von CXCR4 festgestellt (Barretina, Junca et al. 2003; Ghobrial, Bone et al. 2004). Bezüglich der klinischen Bedeutung gibt es hier aber voneinander abweichende Berichte. In einer Studie mit 51 Patienten wurde gezeigt, dass die Expressionshöhe von CXCR4 nicht mit dem klinischen Stadium der B-CLL oder der Infiltration des Knochenmarks korreliert (Barretina, Junca et al. 2003). Im Gegensatz hierzu kam eine andere Studie zu dem Ergebnis, dass neben der erhöhten Expression von CXCR4 bei B-CLL Patienten auch eine Erhöhung der CCR7-Expression auf leukämischen Zellen vorliegt. Hier korrelierte die erhöhte Expression der Chemokinrezeptoren mit dem klinischen Stadium (Ghobrial, Bone et al. 2004).

Die Bedeutung der Chemokinrezeptoren bei der Wanderung von allen hämatopoetischen Zellen ist inzwischen an vielen Stellen untersucht und beschrieben. CXCR4 spielt unter anderem eine Rolle bei der Wanderung von Zellen in das Knochenmark (Review in Nagasawa, Tachibana et al. 1998). Korrespondierend hierzu ist gezeigt worden, dass CXCR4 auch an der Infiltration des Knochenmarks mit neoplastischen Zellen beteiligt ist. Hierbei sind aber die Art und die mögliche genetische Ursache des Tumors von Bedeutung. So wurde bei B-CLL und AML gezeigt, dass CXCR4 auf den neoplastischen Zellen exprimiert und an der Infiltration essentiell beteiligt ist (Mohle, Bautz et al. 1998; Burger, Burger et al. 1999; Burger, Spoo et al. 2003). Im Gegensatz hierzu kann es aufgrund der genetischen Veränderungen bei anderen Erkrankungsformen zu einer

Inhibition der Responsivität CXCR4 exprimierender Zellen auf die Ligandenbindung kommen. Bei CML-Zellen ist durch die Bildung des BCR/ABL-Oncoproteins die Signaltransduktion von CXCR4 gestört und die Zellen werden unresponsiv gegenüber CXCL12 (Peled, Hardan et al. 2002; Ptasznik, Urbanowska et al. 2002). Die Wanderung in das Knochenmark und andere Organe ermöglichen Tumorzellen den Kontakt mit Zellen, wie zum Beispiel Stromazellen im Knochenmark, die für das Überleben der Tumorzellen wichtig sein können. Dies wird zumindest zum Teil auch direkt durch die Interaktion CXCR4 mit seinem Liganden CXCL12 bewirkt, wie am Beispiel von B-CLL-Zellen gezeigt werden konnte (Burger and Kipps 2002). Eine andere Studie mit B-CLL-Patienten konnte nachweisen, dass Chemokinrezeptoren, in diesem Falle CXCR4, mögliche Marker für eine Prognose des Krankheitsverlaufs sein können. Die Expression korrelierte in diesen Untersuchungen mit der Mutation des V_H -Locus und parallel dazu mit der Überlebensrate der Patienten (Ishibe, Albitar et al. 2002).

Bei der hier durchgeführten Untersuchung der genetischen Variabilität wurde im CXCR4-Gen nur eine variable Position im intronischen Bereich entdeckt. Die Variante liegt dabei in der Mitte einer Sequenz, die aus einer Sequenz von fünf Adenin gefolgt von acht Thymin besteht. Der Polymorphismus verändert die Abfolge zu sechs Adenin gefolgt von sieben Thymin. Diese Stelle ist dabei 66 Basen von der Exon-/Introngrenze entfernt und fällt in keine der für *Splicing* der mRNA putativ relevanten Regionen. Die Verteilung dieser Variante entsprach sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Kontrollen der Hardy-Weinberg-Verteilung. Der offenbar funktionell irrelevante Polymorphismus und die konservierte übrige Sequenz des CXCR4-Gens legt nahe, dass direkte genetische Veränderungen des CXCR4-Gens keinen Einfluss auf oben beschriebene oder die in dieser Studie untersuchten Erkrankungen haben. Unabhängig hiervon könnten aber Veränderungen, die die Expression oder Funktion von CXCR4 beeinflussen, aber in dieser Untersuchung nicht erfasst wurden, eine Rolle spielen.

Neben den recht zahlreichen Untersuchungen zu der Rolle von CXCR4 bei der Charakterisierung von Leukämien, liegen bezüglich CXCR5 und CCR7 nur wenige Arbeiten vor. Es ist beschrieben, dass bei der adulten T-Zell-Leukämie (ATL) eine starke Hochregulation von CCR7 zu beobachten ist und dass eine Korrelation zwischen erhöhter CCR7-Expression und der Infiltration lymphatischer Organe besteht (Hasegawa, Nomura et al. 2000). Eingehende Untersuchungen zu einer Korrelation der CCR7 Expression mit einer HTLV-Infektion, die oft in Zusammenhang mit ATL auftritt, hat gezeigt, dass die

Expression dieses Chemokinrezeptors durch virale Komponenten induziert wird (Ruckes T 2003). Auch bei der CLL spielt die Expression von CCR7 eine Rolle bei der Wanderung von malignen Zellen über die HEV in die Lymphknoten und die Expression von CCR7 korreliert mit Lymphadenopathie. Wird CCR7 blockiert, so kommt es auch nicht mehr zur Wanderung über die HEV in den Lymphknoten (Till, Lin et al. 2002).

Da CXCR5 vor allem auf B-Zellen exprimiert ist, zeigen besonders maligne Zellen von B-Zell-Leukämien eine Expression dieses Rezeptors. Die Untersuchungen der Rezeptoren auf den malignen Zellen belegten, dass es sich hierbei um funktionelle Rezeptoren handelt, die Ca^{2+} -Signale induzieren können (Trentin, Cabrelle et al. 2004). Anders als bei CCR7 und CXCR4 gibt es bisher nur eine Studie, die eine Veränderung der Expression von CXCR5 in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern und -verläufen bringt (Lopez-Giral, Quintana et al. 2004).

Die genetische Analyse von CCR7 hat gezeigt, dass auch hier nur wenige Variationen in den regulatorischen und codierenden Bereichen vorlagen. Drei dieser Varianten hatten eine sehr niedrige Allelfrequenz. Eine der Varianten führte zu einem Aminosäureaustausch im N-terminalen Bereich, allerdings lag bei den betroffenen Individuen der Polymorphismus nur heterozygot vor. Bei allen Polymorphismen, die bei CCR7 identifiziert wurden, konnte weder bei Patienten noch bei Kontrollen eine signifikante Abweichung von der Hardy-Weinberg-Verteilung festgestellt werden.

Die meisten variablen Positionen wies das CXCR5-Gen auf. Neben den zwölf extrem seltenen Varianten gab es hier fünf Polymorphismen mit einer Allelfrequenz $>1\%$. Betrachtete man alle Patienten und Kontrollen, so konnte das Vorliegen der Hardy-Weinberg-Verteilung sowohl für die Kontrollen als auch für das gesamte Patienten-Kollektiv für alle Varianten angenommen werden. Die Analyse der nach Krankheitsbildern aufgeteilten Patienten zeigte allerdings, dass es bei den Gruppen der NHL-Patienten und der ALL-Patienten zu signifikanten Abweichungen des -32C/A Polymorphismus von der Hardy-Weinberg-Verteilung kam. Bei NHL-Patienten lag eine erhöhte Allelfrequenz vor, die dadurch bedingt war, dass 50 % der NHL-Patienten heterozygot für diesen Polymorphismus waren. Bei den ALL-Patienten hingegen war der Anteil der Individuen, bei denen dieser Polymorphismus homozygot vorlag, erhöht. Ob dieser im Promotorbereich liegende Polymorphismus die Expression von CXCR5 beeinflusst, muss noch untersucht werden. In einer parallel durchgeführten Studie ist die Expression von CXCR5 auf den Tumorzellen, der hier verwendeten Patienten-Proben untersucht worden.

Im Falle der ALL-Patienten sind alle Träger des Polymorphismus, egal ob homo- oder heterozygot, negativ für die Expression von CXCR5 (R Schabath und Prof. Ludwig, Robert-Rössle-Klinik, pers. Kommunikation), so wie auch die übrigen anderen untersuchten ALL-Proben. Dies ist vermutlich durch den T-Zell-Ursprung der meisten ALL bedingt. Bei den oft aus B-Zellen entstehenden NHL-Zellen ist die Expression von CXCR5 insgesamt heterogen: Etwa die Hälfte der im Durchflußzytometer untersuchten Proben exprimierte CXCR5. Bei den hier untersuchten Proben ist exakt die Hälfte der Träger des heterozygoten Polymorphismus negativ für die Expression von CXCR5 (R. Schabath und Prof. Ludwig, Robert-Rössle-Klinik, Berlin, pers. Kommunikation). Diese Daten legen nahe, dass diese Variante keinen Einfluss auf die Expression von CXCR5 hat.

6.2.3 Assoziation von Chemokinrezeptor-Varianten mit Erkrankungen

Nachdem einige Chemokinrezeptoren als Co-Rezeptoren bei der Infektion mit HIV identifiziert worden waren (Review in Moore 1997; McKnight, Dittmar et al. 1998; O'Brien and Moore 2000), wurden Untersuchungen zu der genetischen Variabilität von HIV positiven Patienten durchgeführt. Diese Untersuchungen haben offenbart, dass es in den Genen dieser Chemokinrezeptoren Varianten gibt, die besonders gehäuft bei solchen Patienten auftraten, die noch nicht an AIDS erkrankt waren. Daraus ließ sich schließen, dass diese Varianten offenbar eine protektive Wirkung besitzen (Alkhatib, Combadiere et al. 1996; Dean, Carrington et al. 1996; Samson, Libert et al. 1996). Diese Entdeckung führte zu einer eingehenden Untersuchung der genetischen Variabilität, besonders der mit HIV-Infektionen in Verbindung gebrachten Chemokinrezeptoren.

Neben den vielen HIV-assoziierten Studien wurden Chemokinrezeptoren auch mit anderen Erkrankungen in Verbindung gebracht und auf genetische Variationen, die mit diesen Erkrankungen assoziiert sein könnten, untersucht. Hierzu gehörten z.B. CCR3 und CCR4 (Kato, Tsuchiya et al. 1999) sowie CXCR1, CXCR2 und CXCR3 (Kato, Tsuchiya et al. 2000) in Verbindung mit rheumatischen Erkrankungen. In anderen Studien wurde die Assoziation von CCR3-Varianten mit Asthma untersucht (Zimmermann, Bernstein et al. 1998; Zimmermann, Daugherty et al. 2000). Die Varianten der, im Rahmen der HIV-assoziierten Studien intensiv untersuchten, Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 wurden auch im Zusammenhang mit Nephropathie bei Diabetes Typ 2 (Nakajima, Tanaka et al. 2002) und systemischem Lupus Erythematosus (Aguilar, Nunez-Roldan et al. 2003) analysiert. Hierbei wurden einige Varianten identifiziert, die signifikant häufiger bei Erkrankten auftreten und somit einen Einfluss auf die Erkrankung und Progression

wahrscheinlich scheinen ließen. Untersuchungen von CXCR4-Transkripten in primären Geweben und Zelllinien zeigte, dass es von CXCR4 eine weitere Form von mRNA gibt, bei der kein *splicing* stattfindet. Hierdurch kommt ein alternatives Startcodon im Intron zum Tragen, dass zu einer Variante CXCR4-Lo führt, bei der die üblichen N-terminalen fünf Aminosäuren „MEGIS“ durch neun Aminosäuren „MSIPLPLLQ“ ersetzt werden. Allerdings konnten bezüglich Migration auf den Liganden CXCL12 und die Induktion intrazellulärer Kalziumsignale keine Unterschiede zwischen den beiden Varianten festgestellt werden (Gupta and Pillarisetti 1999). Die Identifikation von Mutationen in CXCR4 gelang im Zusammenhang mit dem sog. WHIM-Syndrom (Hernandez, Gorlin et al. 2003). Es ist charakterisiert durch eine Neutropenie, Hypogammaglobulinämie und eine erhöhte Anzahl von reifen myeloiden Zellen im Knochenmark, was als Myelokathexis bezeichnet wird (Wetzler, Talpaz et al. 1990). Ursächlich bei den untersuchten Patienten sind hierfür offenbar von Patient zu Patient variierende Mutationen im C-terminalen Bereich von CXCR4. Diese Mutationen führen zur Expression einer C-terminal verkürzten Form von CXCR4. Die funktionelle Untersuchung dieser verkürzten Formen von CXCR4 *in vitro* zeigte, dass es zu einer Verlängerung und Intensivierung des durch CXCL12 ausgelösten Ca^{2+} -Signals kommt. Keine dieser Mutationen ist allerdings in dieser Studie bei mehr als 200 weiteren untersuchten Allelen gesunder Individuen gefunden worden (Hernandez, Gorlin et al. 2003).

6.3 Funktionelle Konsequenzen verschiedener

Aminosäureaustausche

Aminosäuren unterscheiden sich durch ihre Seitenketten voneinander. Diese Seitenketten beeinflussen die physikalischen und biochemischen Eigenschaften. Man kann die 20 in Proteinen vorkommenden Aminosäuren aufgrund dieser Eigenschaften zu Gruppen zusammenfassen. Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin haben relativ kleine ungeladene aliphatische Seitenketten, wodurch sie hydrophoben Charakter besitzen. Auch Serin und Threonin besitzen aliphatische Seitenketten, allerdings liegen hier freie Hydroxylgruppen vor, die den Aminosäuren einen hydrophilen Charakter geben. Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan besitzen eine aromatische Seitenkette. Methionin und Cystein tragen ein Schwefelatom in der Seitenkette. Cystein kommt eine besondere Bedeutung zu, da zwei Cystein-Seitenketten miteinander eine Disulfidbrücke bilden können, was einen erheblichen Einfluss auf die Struktur des Proteins hat. Lysin, Arginin und Histidin haben zusätzliche Aminogruppen in der Seitenkette, weshalb sie als basische

Aminosäuren bezeichnet werden. Im Gegensatz hierzu werden Asparaginsäure und Glutaminsäure als saure Aminosäuren bezeichnet, da hier in der Seitenkette eine zusätzliche Carboxylgruppe vorliegt. Asparagin und Glutamin sind ungeladene Derivate der sauren Aminosäuren, da hier die endständige Carboxylgruppe durch eine Amidgruppe ersetzt ist. Prolin nimmt eine Sonderstellung innerhalb der Aminosäuren ein, da hier die aliphatische Seitenkette nicht nur mit dem α -Kohlenstoffatom sondern auch mit dem Stickstoffatom verbunden ist, wodurch eine Ringstruktur entsteht (Stryer 1994). Prolin ist deshalb nicht hydrophob und kann zu Knicken in α -Helices führen (Findlay and Eliopoulos 1990).

Kommt es zum Austausch in der Proteinsequenz, so unterscheidet man zwischen konservativen und nicht konservativen Austauschen. Sind die physikalischen und biochemischen Eigenschaften der ausgetauschten Aminosäuren ähnlich, so spricht man von einem konservativen Austausch und eine Auswirkung auf die Struktur und Funktion ist weniger wahrscheinlich, als bei einem nicht konservativen Austausch zweier sehr unterschiedlicher Aminosäuren.

Die Auswirkungen einzelner Aminosäureaustausche in der Sequenz von Proteinen können sehr unterschiedlich sein. Ist eine für die Funktion des Proteins wichtige Stelle betroffen, z.B. das reaktive Zentrum eines Enzyms oder Aminosäuren die für die Tertiär- oder Quartärstruktur von Bedeutung sind, kann ein einzelner Austausch mit dem völligen Funktionsverlust einhergehen. Bestimmte Positionen in den verschiedenen funktionellen Bereichen der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zeichnen sich durch einen besonders hohen Grad der Konservierung aus. Hierzu gehören etwa 20 Aminosäurepositionen, unter denen vor allem Tryptophane und Proline dominieren, die in den sieben Transmembrandomänen lokalisiert sind (Findlay and Eliopoulos 1990; Probst, Snyder et al. 1992) sowie konservierte Cysteine in den extrazellulären Domänen, die durch die Bildung von Disulfidbrücken an der strukturellen Organisation der für die Ligandenbindung relevanten Region von Bedeutung sind (Farrens, Altenbach et al. 1996). Es ist deshalb davon auszugehen, dass diese Sequenzabschnitte oder auch einzelne Aminosäuren eine besondere Stellung bei der Aufrechterhaltung der Funktion der Rezeptoren spielen.

Bei den drei untersuchten Chemokinrezeptoren wurden fünf Varianten identifiziert, die zu Aminosäureaustauschen führen. Eine davon lag im N-terminalen Bereich von CCR7 und hatte einen Austausch von Met6Val zur Folge. Die funktionelle Untersuchung dieser

Variante von CCR7 ergab, dass sich weder bei der Induktion eines Kalziumsignals nach Ligandenbindung noch bei der Aktivierung des MAPK-Signalweges ein Unterschied zwischen dem unveränderten und dem mutierten Rezeptor nachweisen ließ. Der Austausch von Methion zu Valin ist bezüglich der Größe und der hydrophoben Eigenschaften der Seitenkette konservativ. Der N-terminale Bereich von G-Protein gekoppelten Rezeptoren kann neben den drei extrazellulären Schleifen an der Bindung und Erkennung von Liganden beteiligt sein, ist hierfür aber nicht zwingend erforderlich. Der N-Terminus beeinflusst die Bindungsspezifität bei CCR1 und CCR3 (Pease, Wang et al. 1998). Im Gegensatz hierzu kann die Deletion des N-terminalen Bereichs allerdings auch ohne Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors sein, wie am Beispiel des Serotonin-HT2-Rezeptors der Ratte (Buck, Meyerhof et al. 1991) oder dem Cholecystokinin_B-Rezeptors (Jagerschmidt, Guillaume et al. 1998) gezeigt wurde. Die Bedeutung des N-Terminus von CCR7 bei der Ligandenerkennung und –spezifität ist bisher nicht untersucht worden. Die hier erhaltenen Daten deuten aber darauf hin, dass zumindest ein Austausch Met6Val im N-Terminus keinen Einfluss auf die Bindung des Liganden und die intrazelluläre Signalweiterleitung von CCR7 hat.

Die übrigen vier identifizierten Varianten, die zu Aminosäureaustauschen führen, verteilten sich auf verschiedene Bereiche von CXCR5. Die Lage der Aminosäureaustausche im CXCR5-Molekül ist schematisch in Abb. 20 durch schwarze Markierungen dargestellt.

Die funktionellen Konsequenzen der identifizierten Aminosäureaustausche unterscheiden sich entsprechend der Position und der Art des Austauschs voneinander. Der Austausch Val66Met in TMD I ist sowohl hinsichtlich der Größe als auch der Wasserlöslichkeit der Seitenkette der beiden Aminosäuren ein konservativer Austausch. Entsprechend des konservativen Charakters dieses Aminosäureaustausches konnte in den durchgeführten funktionellen Untersuchungen kein Unterschied zwischen unverändertem und mutiertem Rezeptor festgestellt werden. Ebenfalls ohne funktionelle Unterschiede bleibt der Austausch Ser344Gly. Zwar wird hier eine polare Aminosäure gegen eine unpolare Aminosäure ausgetauscht, aber der C-terminale Bereich ist weder für die Ligandenbindung noch für die Konformation des Rezeptors von Bedeutung. Da weder die Freisetzung von Kalzium-Ionen noch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch diesen Austausch beeinflusst wird, ist davon auszugehen, dass dieser Aminosäureaustausch auch bei der Bindung der heterotrimeren G-Proteine keine entscheidende Rolle spielt.

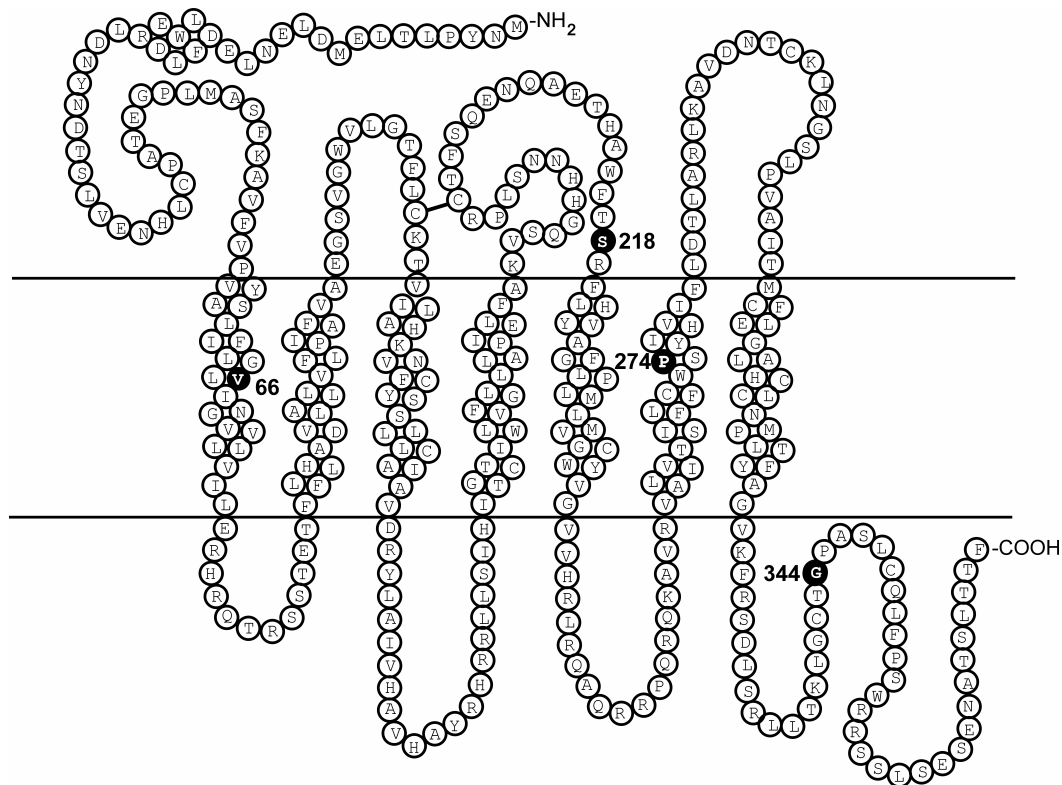


Abb. 20 Lokalisation der Aminosäureaustausche bei CXCR5

Vier der identifizierten Varianten im CXCR5-Gen führen zu Aminosäureaustauschen, deren Lage hier in einem Modell von CXCR5 dargestellt ist. Val66Met liegt in der TMD I, Ser218Gly liegt in der 2. extrazellulären Schleife, Pro274Ala liegt in der TMD VI und Gly344Ser liegt im C-terminalen Bereich.

Der Austausch Ser218Gly liegt am Übergang der zweiten extrazellulären Schleife zur TMD V und führt zu einem Austausch einer polaren durch eine unpolare Aminosäure. Die funktionelle Untersuchung dieser Rezeptorvariante hat gezeigt, dass die Ligandenbindung hierdurch offenbar nicht beeinträchtigt wird. Die Zugabe des Liganden bedingt einen mit dem unveränderten Rezeptor vergleichbare Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Spiegels (Abb. 16). Dennoch ist die Funktion des mutierten Rezeptors verändert, da die Untersuchung des MAPK-Signalwegs zeigte, dass hierdurch die Zugabe des Liganden keine Aktivierung des MAPK-Signalwegs auslöste (Abb. 18A). Es ist bisher nicht beschrieben, dass eine Veränderung einer Aminosäure in einer extrazellulären Domäne solche differentiellen Veränderungen hervorruft. Denkbar ist, dass der Austausch einer polaren gegen eine unpolare Aminosäure so dicht am Übergang zur Zellmembran eine Verschiebung der Transmembrandomäne herbeiführt. Dies könnte zwar ohne Einfluss auf die Bindung des Liganden sein, aber zu einer Konformationsänderung der intrazellulären Domänen führen. Bisher ist nur unzureichend untersucht, über welche G-

Proteine die Signalweiterleitung von CXCR5 erfolgt. Bei dem β_2 -adrenergen Rezeptor kann es in HEK293-Zellen in Abhängigkeit von der Phosphorylierung des Rezeptors sowohl zur Bindung von G_s - als auch von G_i -Proteinen kommen (Daaka, Luttrell et al. 1997). Für CXCR5 konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Zelllinien sowohl Pertussis-Toxin sensitive als auch insensitive G-Proteine an der Signalweiterleitung beteiligt sein können. Während in HEK293-Zellen die Veränderung des intrazellulären Kalzium-Spiegels nach Ligandenbindung an CXCR5 Pertussis-Toxin insensitive ist, lässt sich in CHO-K1 Zellen die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch Pertussis-Toxin vollständig inhibieren (Muller and Lipp 2001). Dies ist ein Hinweis dafür, dass an der Signalweiterleitung in CHO-K1-Zellen $G\alpha_i$ -Proteine beteiligt sind, die spezifisch durch Pertussis-Toxin inhibiert werden, während die Signalweiterleitung und Induktion eines Kalzium-Signals in HEK293 von $G\alpha_i$ -Proteinen unabhängig ist. Die Analyse des MAPK-Signalweges kann aufgrund der hohen endogenen MAPK-Aktivität nicht in HEK293-Zellen, sondern nur in den besser dafür geeigneten CHO-K1 Zellen durchgeführt werden. Die Bindung verschiedener G-Proteine kann durch die Veränderung der Rezeptor-Struktur unterschiedlich beeinflusst werden, worin die Ursache für die unterschiedlichen funktionellen Auswirkungen des Ser218Gly-Austausches liegen könnte. Zur Bestätigung dieser Annahme sind allerdings weitere Untersuchungen bezüglich der möglichen Konformationsänderung und der Bindung verschiedener G-Proteine erforderlich.

Die deutlichsten funktionellen Konsequenzen zeigte der Austausch Pro274Ala. Diese Variante des Rezeptors wird nach einer transienten Transfektion von HEK293-Zellen kaum auf der Oberfläche exprimiert. Allerdings akkumuliert der mutierte Rezeptor intrazellulär. Die Analyse des exprimierten Proteins zeigte keine Veränderungen in der Größe des Proteins. Die fehlende Oberflächenexpression ist dementsprechend durch einen gestörten Transport an die Zelloberfläche aufgrund der Punktmutation in der TMD VI bedingt und nicht durch Degradation des Proteins.

Aromatische Aminosäuren und Proline sind in den TMD von G-Protein gekoppelten Rezeptoren stark konserviert. Verschiedene gezielte Mutationsanalysen haben die Bedeutung dieser konservierten Aminosäuren für die Rezeptorkonformation und -funktion belegt. Mutationen aromatischer Aminosäuren, die nahe der extrazellulären Schleifen der Rezeptoren liegen, haben oft eine Veränderung der Ligandenbindungs-Eigenschaften zur Folge, wie am Beispiel des 5-HT_{2A} Serotonin-Rezeptors (Roth, Shoham et al. 1997) und des Cholecystokinin_B-Rezeptors (Jagerschmidt, Guillaume et al. 1998) gezeigt werden konnte.

Die in den TMD gelegenen konservierten Proline nehmen offenbar eine zentrale Position in der α -helikalen Struktur der TMD ein. Es wird angenommen, dass Prolin in α -Helices einen Knick im Winkel von 26° verursachen kann (Barlow and Thornton 1988; Findlay and Eliopoulos 1990) und dass sowohl gerade als auch abgeknickte Helices für die Konformationsänderungen der Rezeptoren nach Ligandenbindung notwendig sind (Hulme, Birdsall et al. 1990). Mutationsanalysen G-Protein gekoppelter Rezeptoren, bei denen die konservierten Proline in den TMD durch Alanin ersetzt wurden, belegen diese wichtige Funktion. Der Austausch dieser Aminosäure in TMD V, TMD VI oder TMD VII führt zum Beispiel beim Acetylcholin-Rezeptor der Ratte zu einer um den Faktor 35-100 verminderten Expression auf der Zelloberfläche und zu einer drastischen Verringerung der Ligandenaffinität (Wess, Nanavati et al. 1993). Im Falle des Lutropin-Rezeptors führen nur die Austausche bestimmter Proline in TMD IV oder VII zu einer Veränderung des Rezeptors, während die Austausche anderer Proline in den TMD ohne Effekte auf Ligandenbindung und Oberflächenexpression bleiben (Hong, Ryu et al. 1997).

Für die Analyse des Kalziumflux nach Ligandenbindung wurden stabil transformierte Zelllinien benötigt. Wegen der fehlenden Oberflächenexpression der Pro274Ala CCR7-Rezeptors konnte durch Zellsortierung keine mit den anderen CXCR5-Zelllinien vergleichbare Zelllinie hergestellt werden. Deshalb wurde hier keine Untersuchung zur Induktion eines intrazellulären Kalzium-Signals durch diese Variante von CXCR5 durchgeführt. Die Untersuchung des MAPK-Signalweges zeigte aber, dass neben der fehlenden Oberflächenexpression die Mutation des Prolin in der TMD VI die intrazelluläre Signalgebung durch den Rezeptor veränderte. Die Zugabe des Liganden vermochte keine Änderung der MAPK-Aktivität gegenüber unstimulierten Pro274Ala CXCR5 transfizierten Zellen zu erzeugen. Im Vergleich mit dem unveränderten CXCR5-Rezeptor erzeugte aber die transiente Transfektion mit dem mutierten CXCR5-Rezeptor eine Erhöhung der MAPK-Aktivität, die der, des mit Liganden stimulierten, unveränderten CXCR5-Rezeptors entsprach. Dies weist auf eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalweges durch den mutierten Rezeptor hin.

Konservierte Aminosäuren an verschiedenen Positionen der G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind für die Bildung der richtigen Rezeptorkonformation wichtig. Verschiedene Mutationstudien legen nahe, dass Veränderungen dieser Aminosäurepositionen eine Destabilisierung der inaktiven oder Stabilisierung der aktiven Rezeptorkonformation zur Folge haben können (Parma, Duprez et al. 1993; Samama,

Cotecchia et al. 1993; Scheer, Fanelli et al. 1996). Es wird angenommen, dass die durch Prolin induzierten Beugungen der α -helikalen TMD für die korrekte Faltung der Rezeptoren wichtig sind. Der Austausch von Prolin in der TMD verändert möglicherweise die Struktur des Rezeptors so, dass die Konformation der durch den Liganden aktivierten Struktur entspricht und eine konstitutive Aktivierung des G-Protein-abhängigen Signalweges auslöst (Konopka, Margarit et al. 1996; Stefan, Overton et al. 1998).

Eine mit der Mutation in CXCR5 Pro274Ala vergleichbare konstitutive Aktivierung ist für Mutationen von Prolin zu Leucin in der TMD VI der in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierten Pheromon-Rezeptoren Ste2p und Ste3p beschrieben. Diese zeigen nach Mutation des homologen Prolin TMD VI eine konstitutive Aktivierung in Verbindung mit einer verminderten Oberflächenexpression (Konopka, Margarit et al. 1996; Stefan, Overton et al. 1998). Die Veränderung konservierter Aminosäuren kann auch in Chemokinrezeptoren zu konstitutiv aktivierten Rezeptoren führen. In CCR5 und CCR2 erzeugt der Austausch von Prolin in der TMD II konstitutiv aktive Rezeptoren und bedingt eine Veränderung der Ligandenaffinität und Liganden-abhängigen Stimulation (Govaerts, Blanpain et al. 2001; Arias, Navenot et al. 2003). Die Mutation desselben Motivs bleibt aber in den Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3, CCR4, CXCR2 und CXCR4 ohne Folgen (Arias, Navenot et al. 2003). Die Veränderung des konservierten DRY-Motives am Übergang von TMD III zur zweiten zytoplasmatischen Schleife in CXCR2 zu VRV führt zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors, gekoppelt mit transformierenden Eigenschaften vergleichbar mit denen des Karposi-Sarkom Herpesvirus G-Protein gekoppelten Rezeptors (Burger, Burger et al. 1999). Ob die konstitutive Aktivierung von CXCR5 ebenfalls so wie andere konstitutive Varianten von G-Protein gekoppelten Rezeptoren transformierende Eigenschaften besitzt, muss weiter untersucht werden.

Beim Pheromon-Rezeptor Ste2p unterbindet die Co-Expression des mutierten Rezeptors zusammen mit dem Wildtyp-Rezeptor die konstitutive Aktivität des mutierten Rezeptors und die funktionellen Reaktionen auf die Ligandenbindung entsprechen der Reaktion einer Zelle, die nur den unveränderten Rezeptor besitzt. Wird der mutierte Rezeptor hingegen mit einer Variante des Wildtyp-Rezeptors co-exprimiert, die eine verminderte Bindung zu den entsprechenden G-Proteinen besitzt, wird die konstitutive Aktivität des mutierten Rezeptors hiervon nicht beeinflusst. Es wird deshalb angenommen, dass die Bindung der limitierenden G-Proteine an den Wildtyp-Rezeptor bevorzugt erfolgt, und somit die konstitutive Aktivität des mutierten Rezeptors rezessiv ist (Stefan, Overton et al. 1998). Ob

dieser Mechanismus bei der für CXCR5 identifizierten Pro274Ala Variante vorliegt, bedarf einer weiteren experimentellen Untersuchung. Die Mutation Pro274Ala kam bei einem der untersuchten Patienten heterozygot vor. Abhängig davon, ob die konstitutive Aktivierung, die experimentell nachgewiesen werden konnte, dominanten oder rezessiven Charakter hat, könnte auch in den Tumorzellen dieses Patienten eine Veränderung der Rezeptoraktivität vorliegen.

Die Mechanismen der Oberflächenexpression G-Protein gekoppelter Rezeptoren sind bisher nur wenig untersucht. Die Pro274Ala-Variante von CXCR5 lokalisiert besonders in Bereichen nahe des Zellkerns, wie die immunhistologische Färbung von transfizierten HEP2 Zellen zeigte (Abb. 11). Die beschriebenen Varianten des Pheromon-Rezeptoren Ste2p akkumulieren in Golgi-Apparat-assoziierten Kompartimenten und dem endoplasmatischen Reticulum. Es wird angenommen, dass dies auf die posttranslationale Überprüfung der korrekten Proteinfaltung zurückzuführen ist, die verhindert, dass unvollständig gefaltete Proteine an die Zelloberfläche transportiert werden (Wess, Nanavati et al. 1993; Kolakowski, Lu et al. 1995; Stefan, Overton et al. 1998).

Die in dieser Studie gefundenen und analysierten Varianten der Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und CXCR5 zeigten keine eindeutige Assoziation mit den Erkrankungen, der in dieser Studie untersuchten Patienten. Allerdings zeigte ein Polymorphismus im Promotor von CXCR5 signifikante Abweichungen von der Hardy-Weinberg-Verteilung bei Patienten mit ALL und NHL. Die Anzahl der untersuchten Proben dieser Erkrankungen war relativ gering, so dass eine Analyse weiterer Patienten erforderlich ist, um eine Assoziation dieser Variante mit diesen Erkrankungen nachzuweisen. Eine funktionelle Untersuchung dieser Variante würde weitere Hinweise liefern, ob die Variante selbst einen Einfluss auf die Genexpression hat. Die funktionell relevanten Varianten +917T/G und +1085C/G hatten eine sehr niedrige Allelfrequenz. Somit bleibt unklar, ob es sich hierbei um Einzelereignisse handelt oder ob bei entsprechend größerer Probenanzahl weitere Individuen mit diesen Varianten gefunden werden könnten. Die hier identifizierten Varianten der Chemokinrezeptoren bieten eine Grundlage für weitere Untersuchungen, die sich mit Erkrankungen befassen, bei denen CCR7, CXCR4 und CXCR5 zu den Kandidatengen gehören. Hier können nun gezielt die charakterisierten Varianten untersucht werden.

7 Literatur

- Aguilar, F., A. Nunez-Roldan, et al. (2003). "Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus." J Rheumatol **30**(8): 1770-4.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science **272**(5270): 1955-1958.
- Allen, L. F., R. J. Lefkowitz, et al. (1991). "G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11354-8.
- Ansel, K. M., V. N. Ngo, et al. (2000). "A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles." Nature **406**(6793): 309-314.
- Ara, T., M. Itoi, et al. (2003). "A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo." J Immunol **170**(9): 4649-55.
- Arias, D. A., J. M. Navenot, et al. (2003). "Constitutive activation of CCR5 and CCR2 induced by conformational changes in the conserved TXP motif in transmembrane helix 2." J Biol Chem **278**(38): 36513-21.
- Bacon, K., M. Baggiolini, et al. (2002). "Chemokine/chemokine receptor nomenclature." J Interferon Cytokine Res **22**(10): 1067-8.
- Baggiolini, M. and P. Loetscher (2000). "Chemokines in inflammation and immunity." Immunol Today **21**(9): 418-20.
- Bais, C., B. Santomasso, et al. (1998). "G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator." Nature **391**(6662): 86-9.
- Barlow, D. J. and J. M. Thornton (1988). "Helix geometry in proteins." J Mol Biol **201**(3): 601-19.
- Barretina, J., J. Junca, et al. (2003). "CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease." Ann Hematol **82**(8): 500-5.
- Benton, P. A., D. R. Lee, et al. (1998). "Sequence comparisons of non-human primate HIV-1 coreceptor homologues." Mol Immunol **35**(2): 95-101.

- Bentz, M., H. Dohner, et al. (1994). "Fluorescence in situ hybridization in leukemias: 'the FISH are spawning!'" Leukemia **8**(9): 1447-52.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF 1 is a ligand for LESTR/Fusin and blocks HIV-1 Entry." Nature **382**: 829-833.
- Breitfeld, D., L. Ohl, et al. (2000). "Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production." J Exp Med **192**(11): 1545-52.
- Buck, F., W. Meyerhof, et al. (1991). "Characterization of N- and C-terminal deletion mutants of the rat serotonin HT2 receptor in *Xenopus laevis* oocytes." Biochem Biophys Res Commun **178**(3): 1421-8.
- Burger, J. A., M. Burger, et al. (1999). "Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells." Blood **94**(11): 3658-67.
- Burger, J. A. and T. J. Kipps (2002). "Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells." Leuk Lymphoma **43**(3): 461-6.
- Burger, J. A., A. Spoo, et al. (2003). "CXCR4 chemokine receptors (CD184) and alpha4beta1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34+ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis)." Br J Haematol **122**(4): 579-89.
- Burger, M., J. A. Burger, et al. (1999). "Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor." J Immunol **163**(4): 2017-22.
- Campbell, D. J., C. H. Kim, et al. (2003). "Chemokines in the systemic organization of immunity." Immunol Rev **195**: 58-71.
- Campbell, J. J., E. P. Bowman, et al. (1998). "6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7." J. Cell. Biol. **141**(4): 1053-1059.
- Carter, S. B. (1967). "Haptotaxis and the mechanism of cell motility." Nature **213**(73): 256-60.

-
- Caruz, A., M. Samsom, et al. (1998). "Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene." FEBS Lett **426**(2): 271-8.
- Church, G. M. and W. Gilbert (1984). "Genomic sequencing." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **81**: 1991.
- Church, G. M. and S. Kieffer Higgins (1988). "Multiplex DNA sequencing." Science **240**(4849): 185-188.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs." Science **286**(5447): 2098-2102.
- Daaka, Y., L. M. Luttrell, et al. (1997). "Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A." Nature **390**(6655): 88-91.
- Dallaire, L. and M. L. Destine (1969). "Localisation of the cystic-fibrosis gene." Lancet **1**(7591): 419-20.
- Dean, M., M. Carrington, et al. (1996). "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study." Science **273**(5283): 1856-62.
- Dellacasagrande, J., O. J. Schreurs, et al. (2003). "Liver metastasis of cancer facilitated by chemokine receptor CCR6." Scand J Immunol **57**(6): 534-44.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-666.
- Doranz, B. J., J. Rucker, et al. (1996). "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors." Cell **85**(7): 1149-1158.
- Edwards, J. H., J. A. Jonasson, et al. (1984). "Locus for cystic fibrosis." Lancet **1**(8384): 1020.
- Farrens, D. L., C. Altenbach, et al. (1996). "Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin." Science **274**(5288): 768-70.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-877.
- Findlay, J. and E. Eliopoulos (1990). "Three-dimensional modelling of G protein-linked receptors." Trends Pharmacol Sci **11**(12): 492-9.

- Finke, D., H. Acha-Orbea, et al. (2002). "CD4+CD3- cells induce Peyer's patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by CXCR5." *Immunity* **17**(3): 363-373.
- Fischereder, M., B. Luckow, et al. (2001). "CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival." *Lancet* **357**(9270): 1758-61.
- Förster, R., E. A. Mattis, et al. (1996). "A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen." *Cell* **87**: 1037-1047.
- Förster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." *Cell* **99**: 23-33.
- Gallatin, W. M., I. L. Weissman, et al. (1983). "A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes." *Nature* **304**(5921): 30-4.
- Gao, J. L. and P. M. Murphy (1994). "Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor." *J Biol Chem* **269**(46): 28539-42.
- Ghobrial, I. M., N. D. Bone, et al. (2004). "Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma." *Mayo Clin Proc* **79**(3): 318-25.
- Govaerts, C., C. Blanpain, et al. (2001). "The TXP motif in the second transmembrane helix of CCR5. A structural determinant of chemokine-induced activation." *J Biol Chem* **276**(16): 13217-25.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie, et al. (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." *J Biol Chem* **260**(6): 3440-50.
- Gunn, M. D., V. N. Ngo, et al. (1998). "A B-cell homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1." *Nature* **391**: 799-803.
- Gupta, S. K. and K. Pillarisetti (1999). "Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant." *J Immunol* **163**(5): 2368-72.
- Hargreaves, D. C., P. L. Hyman, et al. (2001). "A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements." *J. Exp. Med.* **194**(1): 45-56.
- Hasegawa, H., T. Nomura, et al. (2000). "Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells." *Blood* **95**(1): 30-8.

-
- Heesen, M., M. A. Berman, et al. (1996). "Cloning of the mouse fusin gene, homologue to a human HIV-1 co-factor." J Immunol **157**(12): 5455-60.
- Hernandez, P. A., R. J. Gorlin, et al. (2003). "Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease." Nat Genet **34**(1): 70-4.
- Hoehe, M. R., K. Kopke, et al. (2000). "Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence Multiplex DNA sequencing." Hum Mol Genet **9**(19): 2895-908.
- Hong, S., K. S. Ryu, et al. (1997). "Roles of transmembrane prolines and proline-induced kinks of the lutropin/choriogonadotropin receptor." J Biol Chem **272**(7): 4166-71.
- Hulme, E. C., N. J. Birdsall, et al. (1990). "Muscarinic receptor subtypes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **30**: 633-73.
- Ishibe, N., M. Albitar, et al. (2002). "CXCR4 expression is associated with survival in familial chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression is not." Blood **100**(3): 1100-1.
- Jagerschmidt, A., N. Guillaume, et al. (1998). "Binding sites and transduction process of the cholecystokininB receptor: involvement of highly conserved aromatic residues of the transmembrane domains evidenced by site-directed mutagenesis." Mol Pharmacol **53**(5): 878-85.
- Jimenez-Sanchez, G., B. Childs, et al. (2001). "Human disease genes." Nature **409**(6822): 853-5.
- Johnston, B. and E. C. Butcher (2002). "Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration." Semin Immunol **14**(2): 83-92.
- Jordan, M. and F. Wurm (2004). "Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate." Methods **33**(2): 136-43.
- Kato, H., N. Tsuchiya, et al. (1999). "New variations of human CC-chemokine receptors CCR3 and CCR4." Genes Immun **1**(2): 97-104.
- Kato, H., N. Tsuchiya, et al. (2000). "Single nucleotide polymorphisms in the coding regions of human CXC-chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CXCR3 New variations of human CC-chemokine receptors CCR3 and CCR4." Genes Immun **1**(5): 330-7.
- Keller, H. U., J. H. Wissler, et al. (1979). "Chemotaxis is not a special case of haptotaxis." Experientia **35**(12): 1669-71.
-

- Knaut, H., C. Werz, et al. (2003). "A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor." Nature **421**(6920): 279-82.
- Kolakowski, L. F., Jr., B. Lu, et al. (1995). "Probing the "message:address" sites for chemoattractant binding to the C5a receptor. Mutagenesis of hydrophilic and proline residues within the transmembrane segments." J Biol Chem **270**(30): 18077-82.
- Konopka, J. B., S. M. Margarit, et al. (1996). "Mutation of Pro-258 in transmembrane domain 6 constitutively activates the G protein-coupled alpha-factor receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6764-9.
- Kostrikis, L. G., Y. Huang, et al. (1998). "A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation." Nat Med **4**(3): 350-3.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Lawrie, S. S. and J. R. Gosden (1980). "The identification of human chromosomes by quinacrine fluorescence after hybridisation in situ." Hum Genet **53**(3): 371-3.
- Legler, D. F., M. Loetscher, et al. (1998). "B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5." J. Exp. Med. **187**(4): 655-60.
- Loetscher, M., T. Geiser, et al. (1994). "Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes." J. Biol. Chem. **269**(1): 232-237.
- Lopez-Giral, S., N. E. Quintana, et al. (2004). "Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination." J Leukoc Biol.
- Love, D. R., S. M. Forrest, et al. (1989). "Molecular analysis of Duchenne and Becker muscular dystrophies." Br Med Bull **45**(3): 659-80.
- Luther, S. A., K. M. Ansel, et al. (2003). "Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor alpha, and CCR7 ligands in lymph node development." J Exp Med **197**(9): 1191-8.
- Maloy, S. S., V. and Taylor, R. (1996). Genetic Analysis of Pathogenic Bacteria: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

-
- Mashino, K., N. Sadanaga, et al. (2002). "Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma." Cancer Res **62**(10): 2937-41.
- McGrath, K. E., A. D. Koniski, et al. (1999). "Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4." Dev Biol **213**(2): 442-56.
- McKnight, A., M. T. Dittmar, et al. (1998). "A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4." J Virol **72**(5): 4065-71.
- Mohle, R., F. Bautz, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1." Blood **91**(12): 4523-30.
- Moore, J. P. (1997). "Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy." Science **276**(5309): 51-2.
- Moser, B., M. Loetscher, et al. (1998). "Lymphocyte responses to chemokines." Int Rev Immunol **16**(3-4): 323-44.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-56.
- Muller, G. and M. Lipp (2001). "Signal transduction by the chemokine receptor CXCR5: structural requirements for G protein activation analyzed by chimeric CXCR1/CXCR5 molecules." Biol Chem **382**(9): 1387-97.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. **51 Pt 1**: 263-273.
- Nagasawa, T., K. Tachibana, et al. (1998). "A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection." Semin Immunol **10**(3): 179-85.
- Nagira, M., T. Imai, et al. (1997). "Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13." J. Biol. Chem. **272**(31): 19518-19524.
- Nakajima, K., Y. Tanaka, et al. (2002). "Chemokine receptor genotype is associated with diabetic nephropathy in Japanese with type 2 diabetes." Diabetes **51**(1): 238-42.

- Nakano, H., S. Mori, et al. (1998). "A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4." Blood **91**(8): 2886-2895.
- Neote, K., D. DiGregorio, et al. (1993). "Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor." Cell **72**(3): 415-425.
- Ngo, V. N., H. L. Tang, et al. (1998). "Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells." J. Exp. Med. **188**(1): 181-191.
- Nickerson, D. A., S. L. Taylor, et al. (1998). "DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene." Nat Genet **19**(3): 233-40.
- Oberlin, E., A. Amara, et al. (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." Nature **382**(6594): 833-5.
- O'Brien, S. J. and J. P. Moore (2000). "The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS." Immunol Rev **177**: 99-111.
- Ohl, L., G. Henning, et al. (2003). "Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs." J. Exp. Med. **197**: 0000-9999.
- Orita, M., H. Iwahana, et al. (1989). "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2766-70.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, et al. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-45.
- Parma, J., L. Duprez, et al. (1993). "Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas." Nature **365**(6447): 649-51.
- Payne, A. S. and L. A. Cornelius (2002). "The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis." J Invest Dermatol **118**(6): 915-22.
- Pease, J. E., J. Wang, et al. (1998). "The N-terminal extracellular segments of the chemokine receptors CCR1 and CCR3 are determinants for MIP-1alpha and eotaxin binding, respectively, but a second domain is essential for efficient receptor activation." J Biol Chem **273**(32): 19972-6.

-
- Pebay-Peyroula, E., G. Rummel, et al. (1997). "X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases." Science **277**(5332): 1676-81.
- Peled, A., I. Hardan, et al. (2002). "Immature leukemic CD34+CXCR4+ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1." Stem Cells **20**(3): 259-66.
- Probst, W. C., L. A. Snyder, et al. (1992). "Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily." DNA Cell. Biol. **11**(1): 1-20.
- Ptasznik, A., E. Urbanowska, et al. (2002). "Crosstalk between BCR/ABL oncoprotein and CXCR4 signaling through a Src family kinase in human leukemia cells." J Exp Med **196**(5): 667-78.
- Reilly, J. G. and C. A. Thomas, Jr. (1980). "Length polymorphisms, restriction site variation, and maternal inheritance of mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster*." Plasmid **3**(2): 109-15.
- Roberts, L. (1989). "Genome mapping goal now in reach." Science **244**(4903): 424-5.
- Robledo, M. M., R. A. Bartolome, et al. (2001). "Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells." J Biol Chem **276**(48): 45098-105.
- Roth, B. L., M. Shoham, et al. (1997). "Identification of conserved aromatic residues essential for agonist binding and second messenger production at 5-hydroxytryptamine_{2A} receptors." Mol Pharmacol **52**(2): 259-66.
- Ruckes T, H. G., Waldele K, Forster R, Morris J, Schneider G, Jacobson S, Grassmann R (2003). The capacity to invade lymphoid organs of HTLV-1-infected lymphocytes is augmented by viral tax protein via transactivation of the chemokine receptor CCR-7. AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES.
- Sachidanandam, R., D. Weissman, et al. (2001). "A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms." Nature **409**(6822): 928-33.
- Sallusto, F., C. R. Mackay, et al. (2000). "The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses." Annu Rev Immunol **18**: 593-620.
- Sallusto, F., P. Schaerli, et al. (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." Eur. J. Immunol. **28**(9): 2760-2769.

- Samama, P., S. Cotecchia, et al. (1993). "A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model." J Biol Chem **268**(7): 4625-36.
- Samson, M., F. Libert, et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature **382**(6593): 722-5.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **74**(12): 5463-5467.
- Schaerli, P., K. Willmann, et al. (2000). "CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function." J Exp Med **192**(11): 1553-62.
- Scheer, A., F. Fanelli, et al. (1996). "Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation." Embo J **15**(14): 3566-78.
- Schmidt, C., B. Li, et al. (2003). "Random mutagenesis of the M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in yeast. Identification of point mutations that "silence" a constitutively active mutant M3 receptor and greatly impair receptor/G protein coupling." J Biol Chem **278**(32): 30248-60.
- Schwarz, M. and P. M. Murphy (2001). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor constitutively activates NF-kappa B and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant." J Immunol **167**(1): 505-13.
- Seyffert, W., R. Balling, et al. (2003). Lehrbuch der Genetik, Sekturm Akademischer Verlag.
- Shinozaki, H., V. Butnev, et al. (2003). "Desensitization of Gs-coupled receptor signaling by constitutively active mutants of the human lutropin/choriogonadotropin receptor." J Clin Endocrinol Metab **88**(3): 1194-204.
- Shirozu, M., T. Nakano, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." Genomics **28**(3): 495-500.
- Southern, E. M. (1974). "An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose." Anal Biochem **62**(1): 317-8.
- Sperlich, D. (1988). Populationsgenetik, Urban und Fischer.

-
- Stefan, C. J., M. C. Overton, et al. (1998). "Mechanisms governing the activation and trafficking of yeast G protein-coupled receptors." Mol Biol Cell **9**(4): 885-99.
- Stryer, L. (1994). Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag.
- Stumm, R. K., C. Zhou, et al. (2003). "CXCR4 regulates interneuron migration in the developing neocortex." J Neurosci **23**(12): 5123-30.
- Tachibana, K., S. Hirota, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature **393**(6685): 591-4.
- Takanami, I. (2003). "Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: correlation with lymph node metastasis." Int J Cancer **105**(2): 186-9.
- Till, K. J., K. Lin, et al. (2002). "The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes." Blood **99**(8): 2977-84.
- Timmermann, B., R. Mo, et al. (1998). "Beta-2 adrenoceptor genetic variation is associated with genetic predisposition to essential hypertension: The Bergen Blood Pressure Study." Kidney Int **53**(6): 1455-60.
- Tkachuk, D. C., C. A. Westbrook, et al. (1990). "Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization." Science **250**(4980): 559-62.
- Trentin, L., A. Cabrelle, et al. (2004). "Homeostatic Chemokines Drive Migration of Malignant B cells in Patients with Non-Hodgkin's Lymphomas." Blood.
- van Schie, R. C. and M. E. Wilson (1997). "Saliva: a convenient source of DNA for analysis of bi-allelic polymorphisms of Fc gamma receptor IIA (CD32) and Fc gamma receptor IIIB (CD16)." J.Immunol.Methods **208**(1): 91-101.
- Venkitaraman, A. R. (2003). "A growing network of cancer-susceptibility genes." N Engl J Med **348**(19): 1917-9.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Voigt, I., S. A. Camacho, et al. (2000). "CXCR5-deficient mice develop functional germinal centers in the splenic T." Eur.J. Immunol. **30**(2): 560-567.
- von Andrian, U. H. (1996). "Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice." Microcirculation **3**(3): 287-300.
- Warnock, R. A., S. Askari, et al. (1998). "Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes." J Exp Med **187**(2): 205-16.

- Wegner, S. A., P. K. Ehrenberg, et al. (1998). "Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1." J.Biol.Chem. **273**(8): 4754-4760.
- Wess, J., S. Nanavati, et al. (1993). "Functional role of proline and tryptophan residues highly conserved among G protein-coupled receptors studied by mutational analysis of the m3 muscarinic receptor." Embo J **12**(1): 331-8.
- Wetzler, M., M. Talpaz, et al. (1990). "A new familial immunodeficiency disorder characterized by severe neutropenia, a defective marrow release mechanism, and hypogammaglobulinemia." Am J Med **89**(5): 663-72.
- Wiedermann, C. J., N. Reinisch, et al. (1995). "Different patterns of deactivation of chemotaxis and haptotaxis of human peripheral blood mononuclear leukocytes by soluble and surface-bound attractants." J Leukoc Biol **58**(4): 438-44.
- Wiley, H. E., E. B. Gonzalez, et al. (2001). "Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma." J Natl Cancer Inst **93**(21): 1638-43.
- Yoshida, R., T. Imai, et al. (1997). "Molecular cloning of a novel human CC chemokine EBI1 ligand chemokine that is a specific functional ligand for EBI1, CCR7." J. Biol. Chem. **272**: 13803-13809.
- Zimmermann, N., J. A. Bernstein, et al. (1998). "Polymorphisms in the human CC chemokine receptor-3 gene." Biochim.Biophys.Acta **1442**(2-3): 170-176.
- Zimmermann, N., B. L. Daugherty, et al. (2000). "Analysis of the CC chemokine receptor 3 gene reveals a complex 5' exon organization, a functional role for untranslated exon 1, and a broadly active promoter with eosinophil-selective elements." Blood **96**(7): 2346-54.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (1999). "Chemokines: A new classification system and their role in immunity." Immunity **12**: 121-127.
- Zou, Y. R., A. H. Kottmann, et al. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." Nature **393**(6685): 595-599.
- Zuscik, M. J., J. E. Porter, et al. (1998). "Identification of a conserved switch residue responsible for selective constitutive activation of the beta2-adrenergic receptor." J Biol Chem **273**(6): 3401-7.

8 Anhang

Tabelle I Primer und Proben F-Pool

Fragment	Primer	Position (5'-3')	Sequenz (5'-3')
1	11-1F	-580 bis -558	GAAAATGACTCTGTA ACTATGTG
	11-1R2	-177 bis -197	CCTCCAAGCCACCTCAAACC
	11-1P2R	-494 bis -511	GACATGGTCTTGCTATGTTGCC
2	11-3F	-192 bis -169	CCTGGGCAACATAGCAAG
	11-4R	IVS1 +56 bis IVS1 +36	GGAGGTGGCTTGGAGGAGAGGTTG
	11-3P1R	-154 bis -172	GATGTTAGAATTCCAGACAGG
3	11-5F	125 bis 148	GAAGAGCTCTCCAGCAAC
	11-5R	IVS1 +101 bis IVS1 +82	GCCCTACTGCCTCAGGAGACGATG
	11-5P1R	211 bis 193	GAGAGGATTCCCACACTGTC
4	12-0F	IVS1 -305 bis IVS1 -282	CCCCGCCAGGTGCCTCTAG
	12-0R	389 bis 367	TTCCGTACATGAGGACCCAAAAC
	12-0P1R	IVS1 -267 bis IVS1 -285	CTGTGGCAGGGCAGAGATGATTT
5	12-2F	356 bis 379	CATAAGTCAGCTTGTGTTT
	12-2R	736 bis 714	TCCCTGGTGGAAAATCATCTCTGC
	12-0R	389 bis 367	GGCATGGACGGCGTGGACAATGG
6	12-4F	713 bis 733	CTGTGGCAGGGCAGAGATGATTT
	12-4R	1089 bis 1066	GCCATTGTCCACGCCGTCCAT
	12-4P1R	764 bis 747	TAGGGTGACCAGCAGAGGAAGAAG
7	12-6F	1041 bis 1062	GGATGGAGAGGAGGCGGC
	12-6R	1423 bis 1401	GGGTGGCCATCCTGGTGACAAG
	12-4R	1089 bis 1066	GCCCCAAGGAAAAGCAGCAATAA
8	21-1F	-886 bis -864	TAGGGTGACCAGCAGAGGAAGAAG
	21-1R	-512 bis -534	CATAGGTAACCTTGAAAACACTA
	21-1P1R	-849 bis -866	CTCCCTCCCCTTCCCTCTTCTC
9	21-3F	-550 bis -527	CTGGCTTCTTTCAGTTAG
	21-3R	-153 bis -175	GAAAAGGAAGGGAGGGGAGAAGAG
	21-3P1R	-513 bis -531	GGGTGACAGTCGCTGGTCATAGG
10	21-5F	-178 bis -157	TCCCTCCCCTTCCCTCTT
	21-5R	IVS1 +147 bis IVS1 +125	GATCCTATGACCAGCGACTGTC
	21-5P1R	-137 bis -155	GCTTCCAATGCCACCAAATCAG

Fortsetzung: Tabelle I Primer und Proben F-Pool

Fragment	Primer	Position (5'-3')	Sequenz (5'-3')
11	22-1F	IVS1 -202 bis IVS1 -179	GAAGAAAGGTGACAGAGGG
	22-1R	IVS2 +29 bis IVS2 +6	ACAAGAAGGAGGTGAGGACAGTGT
	22-1P1R	IVS1 -165 bis IVS1 -182	AACAGAGCTTTCCTTGGCAGAGAC
12	23-2F	IVS2 -53 bis IVS2 -31	CCTGCTGCCCCGGCAACAC
	23-2R	462 bis 439	GTTGGAGCCACCCAGCTAAACTG
	23-2P1R	IVS2 -11 bis IVS2 -30	AAGATGAGCTTGCAAAAGTGGACA
13	23-4F	428 bis 450	GGAAATGAGGGAAAACAGGC
	23-4R	817 bis 797	TGGGTCTTCGGTGTCCACTTTTG
	23-4P2R	450 bis 471	GAGCAGGGTGCGGATGATGAC
14	23-6F	812 bis 833	CAAAAGTGGACACCGAAGACCC
	23-6R	1209 bis 1186	CTGCTCCAGGCACGCAACTTTG
	23-6P1R	831 bis 814	AGAGTCGCCTATGGGGAGAAGGTG
15	31-1F	-797 bis -774	AAGTTGCGTGCCTGGAGC
	31-1R	-407 bis -429	CGGTGTTGTGAGAATGAATGAGTG
	31-1P1R	-756 bis -776	AGTAGGCGGCAATGCTGGAAGTA
16	31-3F	-422 bis -402	TAGGAACTTGCACAGAATCAC
	31-3R	41 bis 21	AGCATTGCCGCCTACTGGTTG
	31-3P2R	-387 bis -406	CCCTCGGCGTCACTTTGCTAC
17	31-5F	50 bis 69	CTTGCTGGAGTAACCCAACC
	31-5R3	IVS1 +412 bis IVS1 +389	CTCCAGTAGCCACCGCATCT
	31-5P2R	83 bis 64	AGACAATGTAACCTCGCTCCAAGAC
18	32-1F	IVS1 +2074 bis IVS1 +2095	ACCGCTGGTTCTCCAGATGC
	32-1R	456 bis 433	ACTGGGTTAATGCTTGCTGAAT
	32-1P1R	IVS1 +2109 bis IVS1 +2090	TGCTGTAGAGGTTGACTGTGTAGA
19	32-3F	438 bis 461	GACATTCACTTCCAATTCAG
	32-3R	786 bis 768	ACAGTCAACCTCTACAGCAGTGTC
	32-3P1R	473 bis 457	GGTGGCCCTTGGAGTGTGA
20	32-5F2	767 bis 788	GGCCAGGATGAGGACAC
	32-5R	1267 bis 1244	GTCACACTCCAAGGGCCACCAG
	32-3R	786 bis 768	AGACAAAATCCAACAAGCAATAA

Tabelle II Primer und Proben R-Pool

Fragment	Primer	Position (5'-3')	Sequenz (5'-3')
1	11-0F	-739 bis -717	GTTGCTCTCCCTCTCGGCTCACG
	11-0R	-394 bis -416	CAAAGGGAACAACAGTAAAACAA
	11-0P1F	-430 bis -411	TTTGTCTTCCAGTATTGTTT
2	11-2F	-416 bis -393	TTGTTTTACTGTTGTTCCCTTTGA
	11-2R	-13 bis -31	CAACTGGGGCCTATGACTA
	11-2P1F	-31 bis -13	TAGTCATAGGCCCCAGTTG
3	11-4F	-26 bis -6	GATGTTAGAATTCCAGACAGG
	11-4R	IVS1 +56 bis IVS1 +36	ATAGGCCCCAGTTGAGACAAT
	11-4P1F	IVS1 +39 bis IVS1 +56	GTCTGGAATTCTAACATC
4	12-1F2	IVS1 -125 bis IVS1 -99	TTTGAAACTTGACATTTGGTCAGTGGG
	12-1R	547 bis 525	GGCCAGGTGGAACAGGAAGGTCT
	12-1P2F	496 bis 513	GCGGCACCGGCAGACACG
5	12-3F	515 bis 538	AGTTCACGGAGACCTTCCTGTTC
	12-3R	906 bis 885	GCATGCGTTTCTGCTTGGTTCT
	12-3P1F	862 bis 880	GCCACGTTGCACCTTCTCC
6	12-5F	879 bis 900	CCAAGAGAACCAAGCAGAAAC
	12-5R	1245 bis 1225	ACGCCGGCGAAAGTGTAGAGC
	12-5P1F	1193 bis 1212	CTGGGCCTGGCCACTGCTG
7	12-7F	1213 bis 1236	CCTCAACCCCATGCTCTACACTTT
	12-7R	1563 bis 1541	GAAGAGCTGGCAGGGATGTTCTA
	12-7P2F	1546 bis 1563	GAGGAACCAACCCCATTTCTA
8	21-2F2	-699 bis -677	GAGAGGGAGTGAGAAAAAATGTT
	21-2R	-286 bis -306	ATGCCAGGCCATGGGTTAGAT
	21-2P1F	-340 bis -321	GGACACTTCTCTCACACATC
9	21-4F	-324 bis -301	CATCTCTGACTCCCCAACATCTAA
	21-4R	57 bis 36	TCTCTGGGCGGTAAAACCACAC
	21-4P2F	38 bis 57	GTGGTTTTACCGCCAGAGA
10	22-2F	IVS1 -202 bis IVS1 -179	ACAAGAAGGAGGTGAGGACAGTGT
	22-2R	IVS2 +29 bis IVS2 +6	AACAGAGCTTTCCTTGGCAGAGAC
	22-2P1F	114 bis IVS2 +10	CATTTTCCAGGTGAGGTCTC
11	23-1F4	IVS2 -130 bis IVS2 -112	GGGCAACAGAGTGAGACCA
	23-1R	331 bis 308	GAGCCTCTTGAATAGATATAGGT
	23-1P1F	281 bis 299	CTACTGGGCAATGGGCTGG
12	23-3F	300 bis 323	TCGTGTTGACCTATATCTATTCA
	23-3R	655 bis 632	ACTGTACAGGAGCTCTGGGATGGA
	23-3P1F	600 bis 618	GTGTGGGCATCTGGATACT

Fortsetzung: Tabelle II Primer und Proben R-Pool

Fragment	Primer	Position (5'-3')	Sequenz (5'-3')
13	23-5F	615 bis 638	TACTAGCCACAGTGCTCTCCATCC
	23-5R	1012 bis 991	GCAGGCCAGGCTGTAGGTGACG
	23-5P2F	957 bis 976	GTGAGCTCAGTAAGCAACTC
14	23-7F	982 bis 1001	CGCCTACGACGTCACCTACA
	23-7R	1398 bis 1375	TGTCTTTTTTCGGCATTGGTTGAGG
	23-7P1F	1382 bis 1398	CAATGCCGAAAAAGACA
15	31-0F	-914 bis -894	AATGCGGGCCTTGTCTGGTTC
	31-0R	-540 bis -563	TTCACAGCATCACTAGGGTCAGGT
	31-0P2F	-581 bis -563	TATCTCCTAATTATCTGCA
16	31-2F	-563 bis -540	ACCTGACCCTAGTGATGCTGTGAA
	31-2R	-177 bis -196	TGCGGGTGGTCGGTAGTGAG
	31-2P1F	-213 bis -196	CACTACCGACCACCCGCA
17	31-4F	-188 bis -170	CGACCACCCGCAAACAGCA
	31-4R	IVS1 +172 bis IVS1 +154	CCCCACCCACCCGCACTA
	31-4P1F	IVS1 +128 bis IVS1 +146	AAGGAGTTTTCTTGACCAT
18	32-0F	IVS1 +1828 bis IVS1 +1851	GCAGAGGAGTTAGCCAAGATGTGA
	32-0R	218 bis 195	GGTGGGCAGGAAGATTTTATTGAA
	32-0P2F	198 bis 218	AATAAAATCTTCCTGCCACC
19	32-2F	199 bis 222	ATAAAATCTTCCTGCCACCATCT
	32-2R	605 bis 582	GAAGTCGGGAATAGTCAGCAGGAG
	32-2P1F	577 bis 595	CTGCCCTCCTGCTGACTAT
20	32-4F	613 bis 632	CCAACGTCAGTGAGGCAGAT
	32-4R	1007 bis 989	TCCAAGGAAAGCATAGAGG
	32-4P1F	983 bis 999	CCCCATCCTCTATGCTT
21	32-6F	1026 bis 1044	GCCCAGCACGCACTCACCT
	32-6R	1433 bis 1414	TCACTACACGCTCTGGAATG
	32-6P1F	1029 bis 1046	AGAAAAGGGAAGTGAACA

Tabelle III Primerbedingungen Forward Pool CXCR5 , CCR7 und CXCR4

Gen	PCR						Multiplex-Sequenzierung	
	Frag-ment	F-Primer	R-Primer	T _A [°C}	Zyklen	Primer-menge [pmol]	Sequen-zier-Primer	Probe
CXCR5	11-1	11-1F	11-1R2	60	35	30	11-1F2	11-1P1R
	11-3/4	11-3F	11-4R	60	35	30	11-3F	11-3P1R
	11-5	11-5F	11-5R	60	35	30	11-5F	11-5P1R
	12-0	12-0F	12-0R	60	35	30	12-0F	12-0P1R
	12-2	12-2F	12-2R	60	35	30	12-2F	12-0RB
	12-4	12-4F	12-4R	60	35	30	12-4F	12-4P1R
	12-6	12-6F	12-6R	55	35	30	12-6F	12-4RB
CCR7	21-1	21-1F	21-1R	60	40	60	21-1F	21-1P1R
	21-3	21-3F	21-3R	65	40	30	21-3F	21-3P1R
	21-5	21-5F	21-5R2	60	35	30	21-5F	21-5P1R
	22-1	22-1F	22-1R	60	35	30	22-1F	22-1P1R
	23-2	23-2F	23-2R	60	35	30	23-2F	23-2P1R
	23-4	23-4F	23-4R	60	35	30	23-4F	23-4P2R
	23-6	23-6F	23-6R	60	35	30	23-6F	23-6P1R
CXCR4	31-1	31-1F	31-1R	60	35	30	31-1F	31-1P1R
	31-3	31-3F	31-3R	65	35	30	31-3F	31-3P1R
	31-5	31-5F	31-5R3	60	40	60	31-5F	31-5P3R
	32-1	32-1F	32-1RB	60	35	30	32-1F	32-1P1R
	32-3	32-3F	32-3RB	60	35	30	32-3F	32-1P1R
	32-5	32-3F	32-3RB	65	35	30	32-5F	32-3RB

Tabelle IV PCR- und Sequenzierbedingungen 21plex Reversepool, CXCR5, CCR7 und CXCR4

Gen	PCR						Multiplex Sequenzierung	
	Frag- ment	F-Primer	R- Primer	TA [°C}	Zyklen	Primer- menge [pmol]	Sequen- zier- Primer	Probe
CXCR5	11-0	11-0F	11-0R	60	35	30	11-0R	11-0P1F
	11-2	11-2F	11-2R	55	35	30	11-2R	11-2P1F
	11-4	11-4F	11-4R	60	35	30	11-4R	11-4P1F
	12-1	12-1F2B	12-1R	60	35	30	12-1R	12-1P1F
	12-3	12-3F	12-3R	55	35	30	12-3R	12-3P1F
	12-5	12-5F	12-5R	55	35	30	12-5R	12-5P1F
	12-7	12-7F	12-7R	60	35	30	12-7R	12-7P2F
CCR7	21-2	21-2F2B	21-2R	60	35	30	21-2R	21-2P1F
	21-4	21-4F	21-4R	60	35	30	21-4R	21-4P2F
	22-2	22-2F	22-2R	60	35	30	22-2R	22-2P1F
	23-1	23-1F4B	23-1R	60	35	30	23-1R	23-1P1F
	23-3	23-3F	23-3R	55	35	30	23-3R	23-3P1F
	23-5	23-5F	23-5R	60	35	30	23-5R	23-5P1F
	23-7	23-7F	23-7R	60	35	30	23-7R	23-7P1F
CXCR4	31-0	31-0F	31-0R	60	35	30	31-0R	31-0P2F
	31-2	31-2F	31-2R	60	35	30	31-2R	31-2P1F
	31-4	31-4F	31-4R	64	35	30	31-4R	31-4P1F
	32-0	32-0F	32-0R	60	35	30	32-0R	32-0P2F
	32-2	32-2F	32-2R	60	35	30	32-2R	32-2P1F
	32-4	32-4F	32-4R	55	35	30	32-4R	32-4P1F

-840	AGAGTGGCAG	CCTGAGTAGA	GAAACACTAA	AAGGTGGAGT	CAAAAAGACC	TGAGTTCAAG	TCCCAGCTCT
-770	GCCACTGGTT	TAGCTGTGGG	ATCTCGGGTA	AGTTGCTCTC	CCTCTCGGCT	CACGGACCTC	CTGAAATAAA
-700	AAAATTGAGG	GTTAGACTGG	ATGATCTCTG	AAGCCATCTC	TAGCTTGGTA	GTTTATGAGG	TTAATAATTT
-630	ATGAGCAAAC	AAAGTTAATT	TATAGATAGA	ACATCATTAT	TTTTGAGTCA	GAAAAAGACT	CTGTAACTAT
-560	GTGCTTTTCT	TGGTCATTTT	ACTTTTTTTT	TTTCTTTTGG	AGACATGGTC	TTGCTATGTT	GCCCAGGCTG
-490	GTATCCAACT	CCTGGCCTCA	AGCCATCCTC	CTGCCTCGGC	CTTCCAAAGT	TCATTTTCATT	TTTGTCTTCC
-420	AGTATTGTTT	TACTGTTGTT	CCCTTTGAAA	AAATCTAAC	CTATTTTTC	TGAACTTGAG	CTGAGAAGGG
					-376 A		
-350	AAGGGGTTTT	GCCTCTGTTG	GGCAAAGGA	TGGTGGCAAG	TAGTGTGACC	AAGTGCCTTA	ACTTGCCAGG
					-305 A		
-280	ACTTAGGGGT	TTCCCAAGTC	AAGGGACTTT	TCAGTCTTTG	GCAGACTGGA	ATGTTGATC	ACCCTAGTGG
-210	TGAGGAAAAT	GAAGGTTTGG	AGGTGGCTTG	GAGGAGAGGT	TGCTGGGAGA	GCTCTTCTCC	TGTTCTCTGT
-140	TGATCAGGAG	TTTCCCTCAT	CAACCTGCTG	ACTTTGCGTG	GTGTTTCAT	TACAAGTTGT	GAGCCCTTAT
-70	TGGGGGTATA	GGGAGGAGAA	GTGAGGGCAG	CCTTTAAACT	AGTCATAGGC	CCCAGTTGAG	ACAATTATTG
					-32 A		
+1	CCGAAAGAA	GCTGAAATGC	TTGACTAGCA	CTGATGCTGT	GGGGGATTTT	CCCTCTTTCT	TCAAAAAAAC
+71	AGAAAAGACC	CAGTGGAAAA	AAAAAAAAAA	GTGATGAGTT	GTGAGGCAGG	TCCGCGCCCT	ACTGCCTCAG
+141	GAGACGATGC	GCAGCTCATT	TGCTTAAATT	TCGAGCTGAC	GGCTGCCACC	TCTCTAGAGG	CACCTGGCGG
+211	GGAGCCTCTC	AACATAAGAC	AGTGACCAGT	CTGGTGACTC	ACAGCCGGCA	CAGCATGAA	CTACCCGCTA
					+264 G		
+281	ACGCTGAAAA	TGGACCTCGA	GAACCTGGAG	GACCTGGTGA	GTAGACACGG	GTAGCTTCCT	GTGCGCGAGG
IVS +35	CCCTGTCTGG	AATTCTAACA	TCCTTTGCCA	GAGTCCGAGG	GAGAGGGGAC	AGTGTGGGAA	TCCTCTCCCA
IVS +105	CTGTGGATCT	GTAAAA... Intron					
IVS -313	CTGCAGGCTT	CCGTACATGA	GGACCCAAAA	ACACAAGCTG	ACTTATGGGG	TCCAGCCCTT	CAGCACTTAC
						IVS -254 C	
IVS -243	AAAGCTCAGC	CACCCGCACG	CCTCCCTTCA	TCAGCACCAC	CACTCTAAGG	AATGCGGTCC	CTTTGACAGG
IVS -173	CGAAAAACTG	AAGTTGGAAA	AGACAAAGTG	ATTTGTTCAA	AATTGAAATT	TGAAACTTGA	CATTTGGTCA
IVS -103	GTGGGCCCTA	TGTAGGAAAA	AACCTCCAAG	AGAGCTAGGG	TTCTCTCAG	AGAGGAAAGA	CAGGTCTTTA
IVS -33	GGTCTCACC	CTCCCGTCTC	CTTGCCCTTG	CAGTCTGGG	AACTGGACAG	ATTGGACAAC	TATAACGACA
+354	CCTCCCTGGT	GGAAAATCAT	CTCTGCCCTG	CCACAGAGGG	TCCCTCATG	GCCTCCTTCA	AGGCCGTGTT
+424	CGTGCCCGTG	GCCTACAGCC	TCATCTTCTT	CTGGGCGTGG	ATCGGCAACG	TCCTGGTGCT	GGTGATCCTG
			+454	G +461 AC	+462	A +472	
+494	GAGCGGCACC	GGCAGACACG	CAGTTCACAG	GAGACCTTCC	TGTTCCACCT	GGCCGTGGCC	GACCTCCTGC
+564	TGGTCTTCAT	CTTGCCCTTT	GCCGTGGCCG	AGGGCTCTGT	GGGTGGGTC	CTGGGGACCT	TCCTCTGCAA
+634	AACTGTGATT	GCCCTGCACA	AAGTCAACTT	CTACTGCAGC	AGCCTGCTCC	TGGCTGCAT	CGCCGTGGAC
+704	CGCTACCTGG	CCATTGTCCA	CGCCGTCCAT	GCCTACCGCC	ACCGCCGCCT	CCTCTCCATC	CACATCACCT
+774	GTGGGACCAT	CTGGCTGGTG	GGCTTCTCTC	TTGCCTTGCC	AGAGATTCTC	TTCGCCAAG	TCAGCCAAGG
+844	CCATCACAAAC	AACTCCCTGC	CACGTTGCAC	CTTCTCCCAA	GAGAACCAAG	CAGAAACGCA	TGCTGGTTC
+914	ACCTCCCGAT	TCCTCTACCA	TGTGGCGGGA	TTCTGTCTGC	CCATGCTGGT	GATGGGCTGG	TGCTACGTGG
		G +917					
+984	GGGTAGTGCA	CAGGTTGCGC	CAGGCCAGC	GGCGCCCTCA	GCGGCAGAAG	GCAGTCAGGG	TGGCCATCCT
+1054	GGTGACAAGC	ATCTTCTTCC	TCTGTGTGGT	ACCCTACCAC	ATCGTCATCT	TCCTGGACAC	CCTGGCGAGG
		C +1057	+1085 G				
+1124	CTGAAGCCG	TGGACAATAC	CTGCAAGCTG	AATGGCTCTC	TCCCGTGGC	CATCACCATG	TGTGGGTTCC
+1194	TGGGCCTGGC	CCACTGCTGC	CTCAACCCCA	TGCTCTACAC	TTTCGCCGGC	GTGAAGTTCC	GCAGTGACCT
					+1243 T		
+1264	GTGCGGCTC	CTGACCAAGC	TGGGCTGTAC	CGGCCCTGCC	TCCCTGTGCC	AGCTTTTCCC	TAGCTGGCGC
		+1279 G	+1294	TA +1295			
+1334	AGGAGCAGTC	TCTCTGAGTC	AGAGAATGCC	ACCTCTCTCA	CCACGTTCTA	GGTCCCAGTG	TCCCTTTTTA
+1404	TTGCTGCTTT	TCCTTGGGGC	AGGCAGTGAT	GCTGGATGCT	CCTTCCAACA	GGAGCTGGGA	TCCTAAGGGC
+1474	TCACCGTGGC	TAGAGTGTCT	CTAGGAGTAT	CCTCATTTGG	GGTAGCTAGA	GGAACCAACC	CCATTTCTAG
		+1485 T					
+1544	AACATCCCTG	CCAGCTCTTC	TGCCGGCCCT	GGGGTAGGCC	TGGAGCCCAG	GGAGCGGAAA	GCAGCTCGAA

Abb. 21 CXCR5 Referenzsequenz

Die in dieser Arbeit verwendete Referenzsequenz. Die variablen Positionen sind grau unterlegt und der Austausch ist relativ zum Transkriptionsstart „+1“ darunter angegeben. Die Intronsequenz ist kursiv dargestellt (IVS, Intervenierende Sequenz). Der größte Teil des Introns ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angegeben. Die komplette Sequenz ist in der Datenbank des Sanger Institutes unter http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000160683 verfügbar.

```

-980      TCCAAGTATG  GACAGACAAA  CAAAATGTGG  CATATCCATA  CAATGGAATG  TTATTCAGCC  ATAAAAAGGA
-910      ATGGGGAATG  GATCCATACC  ACCACATAGG  TAACCTTGAA  AACACTAACT  GAAAGAAGCC  AGATGTGAAG
-840      GTCACATATT  GATACCTTCTA  TTTATGTGAA  ATGTTTCAGAA  TAGGAAAATC  TATAGAGCCA  GAAAGTAGAT
-770      TTGTGGTTGC  CAGGGGCTTT  CGATGACAGG  AGGGGAGGGG  AGCAGTCATT  GCTAGTGATT  ACAGGGTTCT
          Ins -745 CGAA
-700      TGAGAGGGAG  TGAGAAAAAA  TGTTCATAAA  TGTATGTGGG  TGATGGTTGC  ATAACTCTGT  GAACATACAA
-630      AAACCATTTG  ATTCTATACT  TTAAAAAGGT  AAATTTTATG  GGATGTGGAT  TATAGCTCAA  TAAAGCTGTC
-560      ATTAAGAAAAG  GAAAAGGAAG  GGAGGGGAGA  AGAGGGAAAAG  GGGAGGGAGG  GGAGGGGAGG  GGAAGGGGGG
-490      AGAAAAAAGA  TACATTTGTTG  CATATCTCTT  CCTTTTACC  TGCATTATG  TGTCAGTGCC  TCCCATTTGGC
          -475 C
-420      CTAAACTACC  CAGAAGCCAG  AGGAAAAGCC  ATTTGGGACT  ATATTCCACT  GTGACACTGA  GCAGAGCAAG
-350      GGAAGGATGG  GGACTTCTCT  CTCACACATC  TCTGACTCCC  CAACATCTAA  CCCATGGCCT  GGCATGTGAT
-280      ATTCATGCTA  TAAATATTTG  TTGAATCAGT  AAATGGCCCC  TCATCTAGAT  TCTGCCAGGC  AGCGCAGGGG
-210      GCTTTTGTGA  TGTAATATGAC  CTAATGATTG  AGGATCCTAT  GACCAGCGAC  TGTACCCTC  TGTACCCTTT
-140      CTTCTGCCCT  TTATCTCTGA  AGGCATTGAA  GGGGCCCTGC  ATGAGTCAG  GAGGGCTGGG  GGGAGGAGCA
-70      ATGGTGGGAG  GGGCAGGGAA  GAGGGTGGAT  TCTCCGACAA  CTTAAAAGGG  GCTTGAACCA  CTTCCTCCCC
+1      AGACAAGGGT  AGTGCAGAGC  CGGGCACAGC  CTTCTGTGT  GGTTTTACC  CCCAGAGAGC  GTCATGGACC
          +6 T
+71      TGGGTGAGTG  AGCCTCTTCA  TGTGAGAAGG  AACAGTACCA  GGGTCTTGG  CACCAGACT  GACCTGTGG
IVS1 +68  AATGGGGTGG  GAGGATGCGG  GTGGAGCGCA  TAGGGGTGCT  TCCTGGAGAA  ATCAGTTCTG  ATTTGGTGGG
IVS1 +138  CATTGGAAGC  TACTTCCAGA  GAATGCCCCC  TGCTGTCCA  GGAGGGTGC  ACCTGCCCTT  TCAGACCTGG
IVS1 +208  AGAAAAGGGT  CAGCCTTTGG  TGCCAGTGGG  GACAAAGGGG  GGGCCGAGAT  CATGTCTTTC  TAAAACAGCA
IVS1 +278  GGGACATAAG  AGAGTGGCGG  GGCTGGGCTT  GGTGGTCTGG  CAGAACCCTG  TCTCATCATG  AGGGTGATAG
IVS1 +348  GTTAGGCCCT  ... Intron 1 (IVS1)

IVS1 -220  ACCTGGGAGT  GGAGGAGGAC  AAGAAGGAGG  TGAGGACAGT  GTTGCCGGGC  AGCAGGCCAG  GTGTTCAAAG
IVS1 -150  GCACAATCTG  GTTCTGATGT  TCTCTTTTCA  CAAACACAGT  GCCTGGAGCT  TGGGAGGAAA  GTTCCCAACA
IVS1 -80   CGGTCTCCCC  CTCCACTGCT  TTCTTTAATA  ACAAGACTT  GTCTGCCAA  GCAATAACTT  TCTCGCCTTG
IVS1 -10  TCTCCTACAG  GGAAACCAAT  GAAAAGCGTG  CTGGTGGTGG  CTCTCCTTGT  CATTTTCCAG  GTGAGGTCTC
          +82 G
IVS2 +11  TGCCAAGGAA  AGCTCTGTTT  CTTCT... Intron 2 (IVS2)

IVS2 -168  CTGCAGGGAG  CCATGATTGC  ACCACTGCAC  TCCAGCCTGG  GCAACAGAGT  GAGACCATGT  CTC AAGAAAA
IVS2 -98  AAAAAAAGA  AAGAAACCAC  TGCTCTAGGC  TAAATCCCAG  CCAGAGTTGG  AGCCACCAG  CTAAACTGGC
IVS2 -28  CTGTTTTCCC  TCATTTCTTT  CCCCGAAGGT  ATGCCTGTGT  CAAGATGAGG  TCACGGACGA  TTACATCGGA
+166     GACAACACCA  CAGTGGACTA  CACTTTGTTT  GAGTCTTTGT  GCTCCAAGAA  GGACGTGCGG  AACTTTAAAG
+236     CCTGGTTCTT  CCCTATCATG  TACTCCATCA  TTTGTTTCGT  GGGCCTACTG  GGCAATGGGC  TGGTCTGTGT
+306     GACCTATATC  TATTTCAAGA  GGCTCAAGAG  CATGACCGAT  ACCTACCTGC  TCAACCTGGC  GGTGGCAGAC
+376     ATCCTCTTCC  TCCTGACCC  TCCCTTCTGG  GCCTACAGCG  CGGCCAAGTC  CTGGGTCTTC  GGTGTCCACT
+446     TTTGCAAGCT  CATCTTTGCC  ATCTACAAGA  TTGCTTGGTC  CAGTGGCATG  CTCCTACTTC  TTTGATCAG
+516     CATTGACCGC  TACGTGGCCA  TCGTCCAGGC  TGTCTCAGCT  CACCGCCACC  GTGCCCGCGT  CCTTCTCATC
+586     AGCAAGCTGT  CCTGTGTGGG  CATCTGGATA  CTAGCCACAG  TGCTCTCCAT  CCAGAGCTC  CTGTACAGTG
+656     ACCTCCAGAG  GAGCAGCAGT  GAGCAAGCAG  TGCGATGCTC  TCTCATCACA  GAGCATGTGG  AGGCCTTTAT
+726     CACCATCCAG  GTGGCCAGA  TGGTGAATCG  CTTTCTGGTC  CCCTGCTGG  CCATGAGCTT  CTGTTACTCT
+796     GTCATCATCC  GCACCCTGCT  CCAGGCACGC  AACTTTGAGC  GCAACAAGGC  CATCAAGGTG  ATCATCGCTG
+866     TGGTCTGGT  TTCCATAGTC  TTCCAGCTGC  CCTACAATGG  GGTGGTCTCG  GCCCAGACGG  TGGCCAACCT
+936     CAACATCACC  AGTAGCACCT  GTGAGCTCAG  TAAGCAACTC  AACATCGCCT  ACGACGTAC  CTACAGCCTG
+1006    GCCTGCGTCC  GGTGCTGCGT  CAACCCTTTC  TTGTACGCTT  TCATCGGCGT  CAAGTTCCGC  AACGATCTCT
+1076    TCAAGCTCTT  CAAGGACCTG  GGCTGCCTCA  GCCAGGAGCA  GCTCCGGCAG  TGGTCTTCTC  GTCGGCACAT
+1146    CCGGCCTCC  TCCATGAGTG  TGGAGGCCGA  GACCACCACC  ACCTTCTCCC  CATAGGCGAC  TCTTCTGCCT
+1216    GGACTAGAGG  GACCTCTCCC  AGGGTCCCCT  GGGTGGGGAT  AGGGAGCAGA  TGCAATGACT  CAGGACATCC
+1286    CCCCAGAAA  AGCTGCTCAG  GAAAAGCAG  CTCCTCCCCT  AGAGTGCAAG  CCCTGCTCCA  GAAGTTAGCT
+1356    TCACCCCAAT  CCCAGCTACC  TCAACCAATG  CCGAAAAAGA  CAGGGCTGAT  AAGCTAACAC  CAGACAGACA
+1426    ACACTGGGAA  ACAGAGGCTA  TTGTCCCCTA  AACCAAAAC  TGAAGTGAA  AGTCCAGAAA  CTGTTCCAC
+1496    CTGCTGGAGT  GAAGGGGCCA  AGGAGGGTGA  GTGCAAGGGG  CGTGGGAGTG  GCCTGAAGAG  TCCTCTGAAT

```

Abb. 22 CCR7 Referenzsequenz

Die in dieser Arbeit verwendete Referenzsequenz. Die variablen Positionen sind grau unterlegt und der Austausch ist relativ zum Transkriptionsstart „+1“ darunter angegeben. Die Intronsequenz ist kursiv dargestellt (IVS, Intervenierende Sequenz). Der größte Teil der beiden Introns ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angegeben. Die Gesamte Sequenz ist in der Datenbank des Sanger Institutes unter http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000126353 verfügbar.

9 Danksagungen

Die experimentellen Arbeiten wurden zwischen 1997 und 2000 in der Arbeitsgruppe von Dr. Magret R. Höhe und der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martin Lipp am Max-Delbrück-Centrum in Berlin-Buch unter der Anleitung von Prof. Dr. Reinhold Förster durchgeführt.

Mein Dank gilt Prof. Förster, Prof. Ludwig und Dr. Höhe für die Initiierung des Projektes. Dr. Höhe und Dr. Lipp danke ich für die Möglichkeit die Arbeiten durchführen zu können, Prof. Förster für seine Anleitung und Unterstützung bei der gesamten Arbeit.

Bei Prof. Förster und Prof. Reinhard Schwinzer bedanke ich mich für die Begutachtung der Arbeit und bei Prof. Brakhage für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Birgit Wendel und Dr. Günter Bernhard danke ich für ihre hilfreichen Tipps bei der Einarbeitung in zahlreiche experimentelle Prozeduren.

Christina Flachmeier, Petra Heere, Ingrid Grunewald und Dagmar Breinfeld danke ich für ihre Unterstützung im Laboralltag.

Bei diesen und den anderen Mitarbeitern beider Arbeitsgruppen: Dr. Felix Cifre, Markus Gräler, Peter Grasshoff, Dr. Uta Höpken, Heiko Johnen, Gabor Kaba, Robert Lange, Gou Hua Li, Thilo Morkos, Gerd Müller, Venjamin Pevzner, Steffen Posner, Phillip Reiterer, Dr. Christian Ried, Richard Schabath und Bernd Timmermann bedanke ich mich für die nette Atmosphäre.

Elke Blissenbach und Dr. Gabriele Hintzen danke ich für ihre Bemühungen beim Korrekturlesen der Arbeit.

Meiner Familie und Melanie Ohl danke ich für ihre Unterstützung während des Studiums und den anschließenden Jahren der Doktorarbeit.