

# **Zelluläre Transport- und Endozytosemechanismen des Zytokins MIF und seiner Rezeptoren**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

**Verena Schwartz**

aus Erkelenz

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen

Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Lothar Rink

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	9
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	11
<b>1</b> Einleitung.....	17
1.1 Endozytosemechanismen in Säugerzellen.....	17
1.1.1 Clathrin-abhängige Endozytose.....	19
1.1.2 Clathrin-unabhängige Endozytosewege.....	21
1.1.2.1 <i>Caveolin-abhängige Endozytose</i> .....	22
CHOLERATOXIN B.....	23
1.1.2.2 <i>Endozytose über lipid rafts/ membrane microdomains</i> .....	24
1.1.3 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose.....	26
1.1.4 Mikro- und Makropinozytose.....	26
1.1.5 Phagozytose.....	26
1.1.6 GTPase Dynamamin.....	26
1.1.7 Recyclingweg über <i>recycling endosomes</i> am Beispiel von Transferrin.....	29
1.1.8 Degradationsweg über Lysosomen am Beispiel zweier Proteine.....	30
1.1.8.1 <i>Low density lipoprotein (LDL)</i> .....	30
1.1.8.2 <i>Epidermal growth factor (EGF)</i> .....	31
1.2 Zytokine.....	32
1.2.1 Chemokine.....	33
1.2.1.1 <i>CLF-Chemokine</i> .....	33
1.2.1.2 <i>Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF)</i> .....	34
HISTORIE.....	34
STRUKTUR UND ENZYMATISCHE AKTIVITÄT.....	34
ROLLE BEI KRANKHEITEN.....	35
MIF-REZEPTOREN.....	38
1.2.1.3 <i>D-Dopachromtautomerase (D-DT)</i> .....	39
1.3 Chemokinrezeptoren.....	41
1.4 Major histocompatibility complex (MHC) class II invariant chain (CD74).....	43
1.4.1 <i>MHC class II</i> -Antigen-Prozessierung und Präsentation.....	44
1.4.2 Struktur und Signaltransduktionsmechanismen.....	46
1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR).....	48
1.5.1 CXCR4.....	49
1.5.2 CXCR2.....	49
1.5.3 CXCR7.....	50
1.6 heteromere Rezeptorkomplexe.....	51
1.6.1 CXCR2/CD74.....	51
1.7 Intrazelluläre Signaltransduktionswege.....	52
1.8 Endosomal signaling.....	53
1.9 Zielsetzung.....	54
<b>2</b> Material.....	56
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	56
2.2 Transfektionsreagenzien.....	58
2.3 Endozytoseinhibitoren.....	58
2.4 Für die Fluoreszenzmarkierung mit Alexa <sup>546</sup> Fluor verwendete MIF-Präparationen.....	58
2.5 Fluoreszenzmarkierte Proteinkonjugate und Organellmarker.....	59
2.6 Geräte.....	59
2.7 Software.....	61
2.8 Verbrauchsmaterialien.....	61
2.9 Molekulare Größenstandards für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	62
2.10 Kits.....	62

---

2.11	Enzyme .....	63
2.12	Antikörper für Western-Blots .....	63
2.12.1	Primärantikörper .....	63
2.12.2	Sekundärantikörper .....	64
2.13	Antikörper für FACS .....	64
2.14	Antikörper für Koimmunpräzipitationen .....	65
2.15	Neutralisierende Antikörper .....	65
2.16	Plasmide .....	65
2.17	Oligonukleotide .....	66
2.18	Puffer, Lösungen und Medien .....	66
2.18.1	Allgemeine Puffer und Lösungen .....	66
2.18.2	Markierung von huMIF bzw. huD-DT mit Alexa-Fluor 546 und Reinigung über Gelfiltration .....	67
2.18.3	Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays .....	67
2.18.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting .....	68
2.18.5	Silbergelfärbung .....	69
2.18.6	Koimmunpräzipitation .....	70
2.18.7	Durchflusszytometrie .....	70
2.18.8	Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Methode .....	70
2.18.9	Medien für Bakterien- und Zellkultur .....	71
2.18.10	Bakterienstämme .....	72
3	Methoden .....	73
3.1	Mikrobiologische Techniken .....	73
3.1.1	Kultivierung auf Agarplatten .....	73
3.1.2	Anzucht in Flüssigmedium .....	73
3.1.3	Expression von huD-DT in <i>E.coli</i> BL21(DE3) .....	73
3.1.4	Bestimmung der optischen Dichte (OD <sub>600</sub> ) .....	74
3.2	Proteinbiochemische Techniken .....	74
3.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD .....	74
3.2.2	Gießen von Gelen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	74
3.2.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese .....	75
3.2.4	Silbergelfärbung .....	76
3.2.5	Koimmunpräzipitation .....	76
3.2.6	Western Blot .....	77
3.2.7	Immundetektion .....	78
3.2.8	Markierung von huMIF bzw. huD-DT mit Alexa-Fluor 546 und Reinigung über Gelfiltration .....	78
3.3	Fluoreszenzbasierte Techniken .....	79
3.3.1	Durchflusszytometrie .....	79
3.3.2	Fluoreszenzmikroskopie .....	81
3.3.3	<i>Live imaging</i> und Konfokalmikroskopie .....	82
3.4	Zellbiologische Techniken .....	83
3.4.1	Zelllinien und ihre Kultivierung .....	83
3.4.2	Subkultivierung adhärenter Zelllinien .....	85
3.4.3	Subkultivierung von Suspensionszellen .....	86
3.4.4	Auftauen von Zellen .....	86
3.4.5	Bestimmung der Zellzahl .....	87
3.4.6	Einfrieren von Zellen .....	87
3.4.7	Transiente Transfektionen .....	87
3.4.7.1	<i>Transiente Transfektion von mouse embryonic fibroblasts (MEFs)</i> .....	88
3.4.7.2	<i>Transiente Transfektion von HEK293-Zellen</i> .....	88

3.4.7.3	<i>Transiente Transfektion von HtTA1-Zellen (HeLa)</i> .....	89
3.4.8	Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa <sup>546</sup> -MIF .....	91
3.4.8.1	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF ohne Markierung von Endosomen - Oberflächenfärbung bei 4°C</i> .....	91
	KEINE ENDOZYTULOSE VON ALEXA <sup>546</sup> -MIF BEI 4°C .....	91
	ENDOZYTULOSE VON ALEXA <sup>546</sup> -MIF BEI 37°C IN MEF-ZELLEN .....	91
3.4.8.2	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der frühen Endosomen (Rab5) - ohne Endozytoseinhibitoren</i> .....	92
	KOLOKALISATION VON ALEXA <sup>546</sup> -MIF MIT RAB5 IN HEK293-ZELLEN .....	92
3.4.8.3	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - ohne Endozytoseinhibitoren</i> .....	92
	KOLOKALISATION VON ALEXA <sup>546</sup> -MIF MIT RAB7 IN MEF-ZELLEN .....	92
	KOLOKALISATION VON ALEXA <sup>546</sup> -MIF MIT RAB7 IN HEK293-ZELLEN .....	93
	KOLOKALISATION VON ALEXA <sup>546</sup> -MIF MIT RAB7 ALS TEMPERATURE SHIFT-EXPERIMENT....	93
3.4.8.4	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Endozytoseinhibitoren des Clathrin- vermittelten Endozytosewegs</i> .....	94
	INHIBITORISCHER EFFEKT VON MDC UND CPZ AUF DIE MIF-ENDOZYTULOSE IN MEFS .....	94
	INHIBITORISCHER EFFEKT VON MDC AUF DIE MIF-ENDOZYTULOSE IN HEK293-ZELLEN .....	94
3.4.8.5	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Inhibitoren der GTPase Dynamamin</i> .....	94
	INHIBIERUNG VON DYNAMIN DURCH EIN DOMINANT-NEGATIVES KONSTRUKT .....	95
	INHIBIERUNG VON DYNAMIN DURCH DYNASORE IN HEK293-ZELLEN .....	95
3.4.8.6	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Endozytoseinhibitoren der Clathrin- unabhängigen Endozytosewege über Caveolae/lipid rafts</i> .....	96
	AUFNAHME VON ALEXA <sup>546</sup> -MIF NACH BEHANDLUNG MIT NYSTATIN ODER FILIPIN .....	96
3.4.8.7	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der Lysosomen</i> .....	96
	KOLOKALISATION VON ALEXA <sup>546</sup> -MIF MIT DEN LYSOSOMEN IN MEF-ZELLEN .....	96
3.4.9	Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit DiI-AcLDL .....	97
3.4.9.1	<i>Internalisierungsassays mit DiI-AcLDL bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - ohne Endozytoseinhibitoren</i> .....	97
3.4.9.2	<i>Internalisierungsassays mit DiI-AcLDL bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Endozytoseinhibitoren des Clathrin- vermittelten Endozytosewegs</i> .....	97
	INHIBITORISCHER EFFEKT VON MDC AUF DIE LDL-ENDOZYTULOSE IN HEK293-ZELLEN .....	97
3.4.9.3	<i>Internalisierungsassays mit DiI-AcLDL bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Inhibitoren der GTPase Dynamamin</i> .....	98
	INHIBITORISCHER EFFEKT VON DYNASORE AUF DIE LDL-ENDOZYTULOSE.....	98
3.4.10	Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Transferrin .....	98
3.4.10.1	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-Transferrin bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - ohne Endozytoseinhibitoren</i> .....	98
3.4.11	Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa <sup>546</sup> -D-DT.....	98
3.4.11.1	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT bei Markierung der frühen Endosomen (Rab5) ohne Endozytoseinhibitoren</i> .....	99
	KOLOKALISATION VON ALEXA <sup>546</sup> -D-DT MIT RAB5 IN HEK293-ZELLEN .....	99
3.4.11.2	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) ohne Endozytoseinhibitoren</i> .....	99
	KOLOKALISATION VON ALEXA <sup>546</sup> -D-DT MIT RAB7 IN HEK293-ZELLEN .....	99
3.4.11.3	<i>Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT bei Markierung der Lysosomen</i> .....	99
	KOLOKALISATION VON ALEXA <sup>546</sup> -D-DT MIT DEN LYSOSOMEN IN HEK293-ZELLEN.....	99
3.4.12	Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa <sup>546</sup> -MIF – Einfluss des Mikrotubuli-Systems und Bedeutung der Endosomenansäuerung .....	99

3.4.12.1	<i>Bedeutung des Mikrotubuli-Systems und der Endosomenansäuerung für die MIF-Endozytose in MEF-Zellen</i> .....	100
3.4.13	Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa <sup>546</sup> -MIF – ektopische CD74-Überexpression .....	100
3.4.13.1	<i>Einfluss der ektopischen CD74-Überexpression auf die MIF-Endozytose in HEK293-Zellen</i> .....	100
3.4.13.2	<i>Einfluss der ektopischen CD74-Überexpression auf die MIF-Endozytose in HtTA1-Zellen</i> .....	101
3.4.14	Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa <sup>546</sup> - MIF - Bedeutung von CXCR4 ohne und nach ektopischer CD74-Überexpression .....	101
3.4.14.1	<i>Kolokalisation von Alexa<sup>546</sup>-MIF mit Rab7GFP in HEK293- und HEK293-CD74-Transfektanten ohne/mit AMD3100</i> .....	101
3.4.15	Protein-Protein-Kolokalisationsstudien .....	101
3.4.15.1	<i>Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>- MIF und Alexa<sup>488</sup>-Transferrin</i> .....	102
3.4.15.2	<i>Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>- MIF und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL</i> .....	102
3.4.15.3	<i>Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>- MIF und Alexa<sup>488</sup>-Cholera toxin B</i> .....	102
3.4.15.4	<i>Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>- D-DT und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL</i> .....	102
3.4.16	Signaling-Experimente mit <i>epidermal growth factor</i> (EGF).....	103
3.4.16.1	<i>Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs initiiert durch EGF in HtTA1-Zellen</i> .....	103
3.4.17	Signaling-Experimente mit <i>macrophage migration inhibitory factor</i> (MIF).....	103
3.4.17.1	<i>Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs initiiert durch MIF in HtTA1-Zellen</i> .....	103
3.4.17.2	<i>Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs initiiert durch MIF in Jurkat T-Zellen</i> .....	104
3.4.17.3	<i>Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs initiiert durch MIF in humanen Dermalfibroblasten</i> .....	104
3.4.17.4	<i>Nichtradioaktiver IP-Kinase-Assay</i> .....	104
3.4.18	Herstellung von Zelllysaten .....	105
3.4.19	MTT-Assay .....	105
3.5	Molekularbiologische Methoden .....	106
3.5.1	Hitzeschock-Transformation kompetenter <i>E.coli</i> .....	106
3.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA .....	107
3.5.3	Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA .....	107
3.5.4	Klonierung von Rab5wt in pEGFP-C1 .....	107
3.5.4.1	<i>Amplifikation von Rab5wt-DNA mittels PCR</i> .....	107
3.5.4.2	<i>Aufreinigen von Plasmid-DNA</i> .....	108
3.5.4.3	<i>Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA</i> .....	108
3.5.4.4	<i>Restriktionsverdau von Insert und Vektor</i> .....	108
3.5.4.5	<i>Ligation von Insert und Vektor</i> .....	109
3.5.4.6	<i>Hitzeschock-Transformation kompetenter E.coli</i> .....	110
3.5.4.7	<i>Identifizierung geeigneter Klone</i> .....	110
3.5.4.8	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	110
3.5.4.9	<i>Sequenzierung</i> .....	110
4	Ergebnisse .....	111
4.1	MIF wird über einen Endozytosemechanismus in Zellen internalisiert .....	111
4.1.1	Der Endozytosemechanismus von MIF ist temperaturabhängig .....	113
4.2	Kolokalisation von MIF mit dem endolysosomalen Kompartiment .....	116
4.2.1	Klonierung von Rab5wt in pEGFP-C1 .....	117
4.2.2	Kolokalisation mit den frühen Endosomen .....	118

4.2.3	Kolokalisation mit den späten Endosomen.....	119
4.2.4	Kolokalisation mit den Lysosomen .....	122
4.3	MIF-Internalisierung ist Clathrin-abhängig.....	123
4.3.1	Clathrin-Proteinlevel bei verschiedenen Zelllinien .....	124
4.3.2	Wirksamkeit des Clathrininhibitors MDC bei der Endozytose von LDL ....	125
4.3.3	Wirksamkeit der Clathrininhibitoren Monodansylcadaverin (MDC) und Chlorpromazine (CPZ) auf die Endozytose von MIF .....	126
4.4	Bedeutung der Funktionalität der GTPase Dynamin für die MIF-Endozytose .....	129
4.4.1	Wirkung eines ektopisch überexprimierten dominant-negativen Dynamins	129
4.4.2	Einfluss des Dynamininhibitors Dynasore auf die Endozytose von LDL und MIF .....	130
4.5	Rolle der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege über Caveolae und lipid rafts/microdomains für die MIF-Endozytose .....	133
4.5.1	Caveolin-1-Proteinlevel bei verschiedenen Zelllinien.....	133
4.5.2	Einfluss der Inhibitoren Nystatin und Filipin auf die MIF-Endozytose.....	134
4.6	Abhängigkeit der MIF-Endozytose von Mikrotubuli und der Azidität der Endosomen .....	135
4.6.1	Einfluss von Nocodazol und Bafilomycin auf die MIF-Endozytose.....	135
4.7	Kolokalisation von MIF mit acetyliertem LDL und partiell mit Transferrin, aber nicht mit Cholera toxin B .....	137
4.8	Alexa <sup>546</sup> -Transferrin wird nicht zu den späten Endosomen transportiert.....	140
4.9	Rezeptorvermittelte MIF-Endozytose unter Beteiligung der Rezeptoren CD74 und CXCR4 .....	141
4.9.1	HtTA1- und HEK293-Zellen sind CD74-negativ.....	141
4.9.2	Einfluss einer ektopischen Überexpression in den CD74-negativen Zelllinien HEK293 und HtTA1 .....	143
4.9.3	Einfluss der Inhibierung von CXCR4 durch AMD3100 auf die MIF- Endozytose.....	145
4.10	Heteromerisierung des GPCRs CXCR4 mit dem single membrane- spanning protein CD74.....	146
4.10.1	Direkte Interaktion von CXCR4- und CD74-Rezeptorfusionsproteinen in Koimmunpräzipitationsversuchen in HEK293.....	146
4.10.2	Das <i>single membrane-spanning protein</i> CD74 ohne ER-Retentionssignal (CD74minRTS) wird auf der Zelloberfläche von HEK293-Zellen exprimiert und kann mit CXCR4 interagieren .....	148
4.10.3	Direkte Interaktion von endogenem CXCR4 und CD74 in MonoMac6 .....	150
4.10.3.1	<i>MonoMac6 Zellen exprimieren CD74 und CXCR4</i> .....	150
4.11	Kolokalisation von CD74, CXCR4 und MIF .....	151
4.12	Kolokalisation von CD74 und CXCR4 mit den Lysosomen.....	153
4.13	Initiierung des AKT-Signaltransduktionswegs .....	153
4.13.1	Die EGF-vermittelte AKT-Aktivierung wird durch Signale von der Plasmamembran und durch endosomale Signale initiiert.....	154
4.13.2	Die MIF-vermittelte AKT-Aktivierung.....	155
4.13.2.1	<i>Die MIF-vermittelte Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs wird zelltypabhängig durch Signale von der Plasmamembran und/oder solchen aus dem Endosom induziert</i> .....	156
	HELA ZELLEN.....	156
	T-LYMPHOZYTEN .....	157
	HUMANE DERMALFIBROBLASTEN.....	159
4.13.2.2	<i>Abhängigkeit der Signaltransduktion zur AKT-Aktivierung von den Rezeptoren CD74 und CXCR4</i> .....	160
4.14	Proteinexpression von huD-DT in E.coli BL21(DE3) .....	163

---

4.15	Partielle Kolokalisation von D-DT mit den frühen und den späten Endosomen, sowie mit den Lysosomen.....	164
4.16	Partielle Kolokalisation von D-DT mit acetyliertem LDL.....	167
5	Diskussion .....	170
5.1	Zytokine wie MIF werden über einen Endozytosemechanismus in Zellen internalisiert.....	170
5.2	Der Transportweg von MIF verläuft über die frühen, die späten Endosomen und die Lysosomen.....	171
5.3	Der Endozytoseprozess von MIF erfolgt über einen Dynamin-abhängigen, Clathrin-vermittelten Endozytoseweg.....	172
5.4	Clathrin-unabhängige Endozytosewege über Caveolae/ lipid rafts haben keinen Einfluss auf die MIF-Endozytose .....	173
5.5	Der Transportweg von MIF ist abhängig von der Azidität der endolysosomalen Kompartimente und vom Mikrotubuli-System.....	173
5.6	Der MIF-Endozytoseweg weist Parallelen mit demjenigen von LDL auf .....	175
5.7	CD74 fördert die MIF-Endozytose, aber auch CXCR4 ist in den Internalisierungsvorgang involviert.....	175
5.8	CD74 und CXCR4 können funktionale heteromere Rezeptorkomplexe bilden.....	176
5.9	Die MIF-induzierte AKT-Aktivierung wird zelltypabhängig partiell über endosomal signaling initiiert.....	179
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	182
7	Literatur .....	185
8	Anhang.....	205
9	Curriculum Vitae .....	208

---

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut und Lehrstuhl für Biochemie und Molekulare Zellbiologie der RWTH Aachen unter der Betreuung von Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen und Herrn Dr. med. Hongqi Lue durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Bernhagen danke ich für das äußerst interessante Thema meiner Arbeit, seine exzellente Betreuung und seine kritischen, aber konstruktiven Anmerkungen und wissenschaftlichen Diskussionen, die zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Lue möchte ich für seine stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung, besonders bei der Planung und kritischen Hinterfragung meiner Experimente danken. Seine Anregungen und wissenschaftlichen Diskussionen waren stets sehr hilfreich. Auch möchte ich ihm ganz herzlich für seine Unterstützung bei den Signaltransduktionsversuchen zur Untersuchung des funktionellen Zusammenspiels der Rezeptoren CXCR4 und CD74 bei der AKT-Aktivierung und für seine IP-Kinase-Assays danken.

Herrn Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Lothar Rink danke ich für seine Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. med. Alexander Krüttgen und seinem ehemaligen Chef Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Weis möchte ich für die Bereitstellung der Rab5-, Rab7- und der Dynamin-Konstrukte danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Prof. Dr. Gerhard Müller-Newen und seinen Mitarbeitern möchte ich ganz herzlich für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und wertvollen Ratschläge bezüglich der Bedienung der Laserscanning-Konfokalmikroskope danken. Besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang Herrn Dr. rer. nat. Michael Vogt, Herrn Dr. rer. nat. Nicolas Chatain und Tamas Domoszlai.

Herrn Prof. Kendall Smith, PhD (The New York Hospital Cornell Medical Center, New York) danke ich für die Zusendung der Caveolin-negativen YT-Zellen.

Herrn Prof. Richard Bucala, MD, PhD (Yale University, New Haven) und Herrn Lin Leng, PhD (Yale University, New Haven) danke ich für die Zusendung von humanem D-DT für anfängliche Endozytosestudien.

All meinen Kollegen und ehemaligen Kollegen des Instituts für Biochemie und Molekulare Zellbiologie gilt mein besonderer Dank vor allem für das fortwährend außerordentlich gute Arbeitsklima, für ihre Hilfsbereitschaft, Diskussionsfreudigkeit und den Zusammenhalt vielfach auch über die Labortätigkeit hinausgehend. Nicht zuletzt deshalb hatte ich stets viel Freude an meiner Arbeit.

---

An dieser Stelle möchte ich Marianna Tatarek-Nossol ganz herzlich für ihre Unterstützung bei den MTT-Zytotoxizitätsassays danken. Birgitt Lennartz möchte ich besonders für die Bereitstellung von humanem MIF für die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 546 danken. Mein besonderer Dank gilt außerdem Joanna Korbiel für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre Hilfe bei den konfokalmikroskopischen Aufnahmen, sowie bei einigen FACS-Analysen.

Frau Dr. rer. nat. Sandra Kraemer, Joanna Korbiel, Setareh Alempour, Carmen Fera und Maryam Aftabizadeh möchte ich zusätzlich zu ihrem wissenschaftlichen Interesse an meiner Arbeit für ihre Bereitschaft danken, mir stets zuzuhören und auch in schwierigen Zeiten beizustehen. Auch für unsere gemeinsamen über den Arbeitsalltag hinausgehenden Aktivitäten möchte ich mich ganz herzlich bei ihnen bedanken.

Der von mir co-betreuten Bachelorstudentin Swantje Liedmann danke ich für ihren Beitrag an meiner Arbeit. Ihr verdanke ich den Großteil der Kollokalisationsstudien zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Rab7GFP unter Einfluss der Endozytoseinhibitoren Nystatin und Filipin und die erfolgreiche Klonierung des Rab5GFP-Konstrukts.

Meinen Eltern möchte ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und meinem beruflichen Werdegang danken, sowie dafür, dass sie stets an mich glaubten.

Meinem Verlobten Bastian Schoofs danke ich für seine liebevolle Unterstützung, seine Geduld und Hilfsbereitschaft, sowie für seinen immerwährenden Glauben an mich.

Teile dieser Dissertation sind bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

**Schwartz V\***, Lue H\*, Kraemer S, Korbiel J, Krohn R, Ohl K, Bucala R, Weber C, Bernhagen J (2009) A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett.* 583:2749-57. (\*Schwartz V and Lue H contributed equally to this paper).

**Schwartz V**, Krüttgen A, Weis J, Weber C, Ostendorf T, Lue H, Bernhagen J (2011) Role for CD74 and CXCR4 in clathrin-dependent endocytosis of the cytokine MIF. *Eur J Cell Biol.*

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\alpha$	Alpha
$\alpha\beta$ pep	mit Peptid beladener MHC II-Komplex
$\beta$	Beta
$\beta$ 2AR	$\beta$ 2-adrenergic Rezeptor
$\gamma$	Gamma
$\delta$	Delta
$\kappa$	Kappa
$\mu$	Mikro
4-OT	4-Oxalocrotonat-Tautomerase
7TMR	Siebentransmembranrezeptor
Ac	Acetyliert
AC	Adenylatzyklase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
AG	Arbeitsgruppe
AGTR1	Angiotensin II Typ I-Rezeptor
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
Alexa <sup>488</sup>	Alexa Fluor 488
Alexa <sup>546</sup>	Alexa Fluor 546
Alexa <sup>555</sup>	Alexa Fluor 555
AMF-R	<i>Autocrine motility factor receptor</i>
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPA	<i>(RS)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl) propionic acid</i>
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
AP-2	Adaptorprotein-2
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
AT1A	Angiotensin II Typ 1A
ATL1	Atlastin-GTPase
BILF1	<i>Epstein-Barr Virus-encoded G protein coupled receptor</i>
BRET	<u>B</u> iolumineszenz- <u>R</u> esonanz- <u>E</u> nergie <u>t</u> ransfer
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
c	Centi
C	Carboxy
C	Cystein
ca.	Circa

---

Ca <sup>2+</sup>	Calciumion <sup>2+</sup>
cAMP	Zyklisches AMP
CaCl <sub>2</sub>	Calciumdichlorid
CCV	<i>Clathrin-coated vesicle</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD26	Dipeptidylpeptidase IV
CFP	<i>Cyan fluorescent protein</i>
CHMI	5-Carboxymethyl-2-hydroxymuconat-Isomerase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CoIP	Coimmunpräzipitation
Cort	Cortactin
COX	Cyclooxygenase
CLF	<i>Chemokine-like function</i>
CLIC	<i>Clathrin-independent carrier</i>
CLIP	<i>Class II-associated invariant chain peptide segment</i>
CPZ	Chlorpromazin
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
CTB/CTxB	Choleratoxin B
CTx	Choleratoxin
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
D-DT	D-Dopachromtautomerase
DHI	5,6-Dihydroxyindol
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3',3',3'-tetramethylindocarbocyanin Perchlorat
Dlp	<i>Dynamin-like protein</i>
D-MEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT1	<i>Divalent metal transporter 1</i>
dn	Dominant-negativ
DNA	<i>Desoxyribonucleid acid</i>
Doxy	Doxyzyklin
DRM	<i>Detergent-resistant membrane</i>
DTH	<i>Delayed hypersensitivity</i>
DTT	Dithiothreitol
Dyn 2	Dynamin 2
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Extrazellulärer loop
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA-1	<i>Early endosomal antigen-1</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	EGF-Rezeptor
ENA-78	<i>CXCL5, epithelial cell-derived neutrophil-activating factor</i>

---

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ETA	Endothelin Typ A-Rezeptor
Evtl	Eventuell
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fe	Eisen
FCS	Fötales Kälberserum
FCS	<i>Forward scatter</i>
FITC	Fluorescein
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FRET	<u>F</u> luoreszenz- <u>R</u> esonanz- <u>E</u> nergietransfer, <u>F</u> örster- <u>R</u> esonanz- <u>E</u> nergietransfer
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GBP1	<i>Guanylate-binding protein 1</i>
GCP-2	CXCL6, <i>granulocyte chemoattractant protein-2</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GED	<i>GTPase effector domain</i>
GEC	<i>Gastric epithelial cells</i>
GEF	<i>Guanine-nucleotide-exchange</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glu1	Glutamatrezeptor 1
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GRIPDB	<i>G protein-coupled Receptor Interaction Partners DataBase</i>
GRO- $\alpha$	CXCL1, <i>growth regulated oncogene-<math>\alpha</math></i>
GRO- $\beta$	CXCL2, <i>growth regulated oncogene-<math>\beta</math></i>
GRO- $\gamma$	CXCL3, <i>growth regulated oncogene-<math>\gamma</math></i>
GRK	G-Protein-gekoppelte Kinase
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$
GSST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK293	<i>Human embryonal kidney cells</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HMGB1	<i>High mobility group-binding protein-1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsc73	<i>Heat shock cognate protein 73</i>
huMIF	Humanes MIF
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule-1</i>
IFN	Interferon
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of NF<math>\kappa</math>B</i>
IgG	Immunglobulin G

---

Ii	Invariante Kette/CD74
IL	Interleukin
IL-8	Interleukin-8
IL-8R	IL-8-Rezeptor
iNOS	In Makrophagen und Mikrogliazellen lokalisierte Isoform der Stickstoffmonooxid-Synthase (NOS)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
I-TAC	CXCL11, <i>interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant</i>
JAB1	<i>c-JUN-activation-domain-binding protein</i>
JNK	<i>c-JUN N-terminal kinase</i>
k	Kilo
K	Lysin
K <sup>+</sup>	Kaliumion
Kan	Kanamycin
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB	<i>Lauria Bertani</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	<i>Laser scanning microscope</i>
m	Milli
m	Meter
M	Molar
MIIC	<i>MHC class II molecule-containing cytoplasmic vacuole</i>
MCP-1	<i>CCL2, monocyte chemotactic protein-1</i>
MDC	Monodansylcadaverin
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
Mfn	Mitofusin
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
min	Minute
MM6	MonoMac6
MMP	Matrixmetalloproteinase
ml	Milliliter
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl
n	Nano
N	Amino
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NAP-2	CXCL7, <i>neutrophil-activating protein-2</i>
NEAA	Nicht-essenzielle Fettsäuren
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung carcinoma</i>
OD	Optische Dichte
OPA1	<i>Optic atrophy 1</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAKT	Phosphoryliertes AKT
PAR1	<i>Protease-activated receptor-1</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction/</i> Polymerasekettenreaktion
pFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
PH	<i>Pleckstrin homology domain</i>
PI3K	Phosphoinositid 3-kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLCB	Phospholipase C-β
PM	Plasmamembran
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PRD	Prolinreiche Domäne
P/S	Penicillin/Streptomycin
PYK2	Prolinreiche Tyrosinkinase 2
RA	Rheumatoide Arthritis
rcf	Relative Zentrifugalkraft
rMIF	Rekombinantes MIF
RNA	Ribonukleinsäure
RNA <sub>i</sub>	RNA-Interferenz, <i>RNA-Silencing</i>
rpm	Rounds per minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s.d.	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor-1</i> , CXCL-12
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	<i>Src homology 3 domain</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
s.o.	Siehe oben
SSC	<i>Side scatter</i>

---

TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TD	Terminale Domäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tet	Tetrazyklin
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin-Rezeptor
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TM/TMD	Transmembrandomäne
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris- (hydroxymethyl)-aminoethan
TRX	Thioredoxin
TSH	Thyrotropin
u.a.	Unter anderem
ü.N.	Über Nacht
UV	Ultraviolett
V2	Vasopressin V2
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIP	Vasoaktives Intestinalpeptid
VNNV	<i>Viral nervous necrosis virus</i>
wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

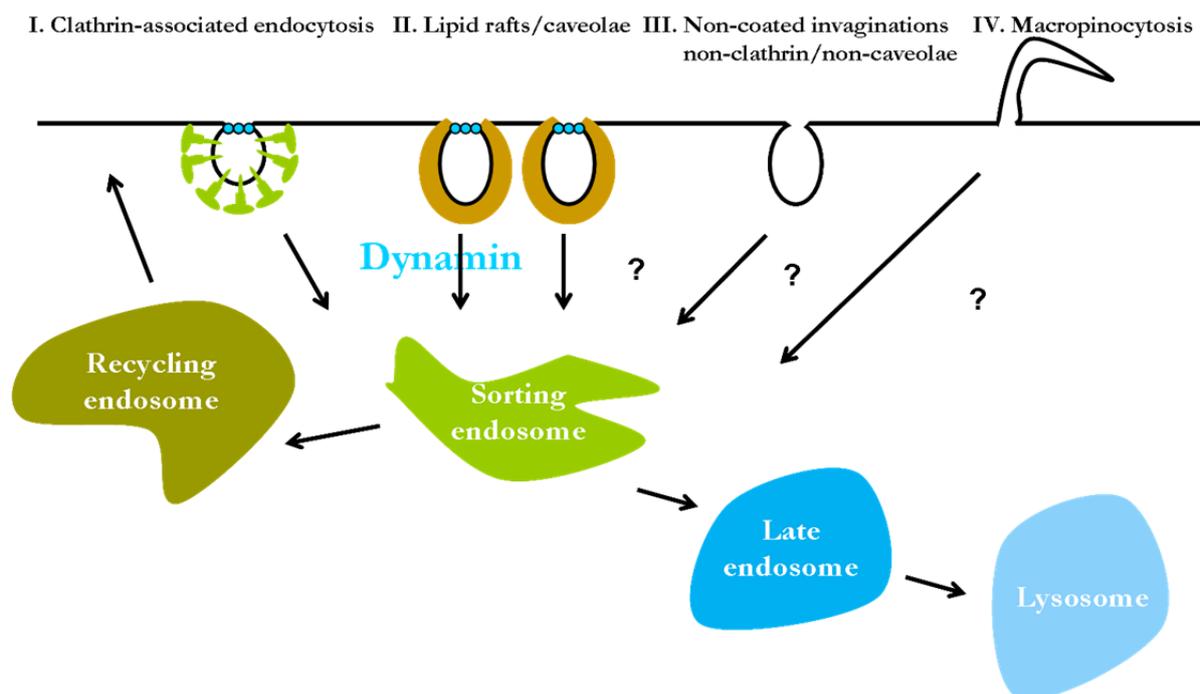
# 1 Einleitung

Im Einleitungskapitel dieser Arbeit sollen zunächst die verschiedenen möglichen Endozytosewege in Säugerzellen erwähnt und erläutert werden. Durch Nennung von Beispielproteinen oder bakterieller Toxine werden die Mechanismen der Clathrin-abhängigen, der Clathrin-unabhängigen Caveolin-abhängigen Endozytosewege und der „einfachen“ Internalisierungsvarianten über Mikro- oder Makropinozytose oder Phagozytose veranschaulicht. Ferner soll die Bedeutung der GTPase Dynamin für bestimmte Wege herausgestellt werden. Ein genauerer Blick auf die Vorgänge nach Endozytose und der Sortierung der internalisierten Substanzen aus dem *sorting endosome* in den Recycling- oder Degradationsweg soll die Einleitung zur Endozytose abrunden. Daran anschließen werden sich Kapitel zu Zytokinen, Chemokinen und insbesondere zum Makrophagenmigrationsinhibierenden Faktor (MIF) und zur D-Dopachromtautomerase (DDT). Über eine kurze Einführung in die Chemokinrezeptoren werden im Folgenden Kapitel zu den bekannten MIF-Rezeptoren (CD74, CXCR4, CXCR2), sowie zu CXCR7 einen Einblick in die Rezeptoren geben. Mit dem Kapitel zu heteromeren Rezeptorkomplexen schließt die Einführung zu den Rezeptoren. Zuletzt wird auf die verschiedenen, durch MIF-aktivierbaren, intrazellulären Signalwege und die Möglichkeit des sogenannten *endosomal signaling* eingegangen. Mit der Beschreibung der „Zielsetzung“ der vorliegenden Dissertation endet schließlich die Einleitung.

## 1.1 Endozytosemechanismen in Säugerzellen

In Säugetierzellen gibt es grundsätzlich drei verschiedene Möglichkeiten für die Endozytose von Proteinen: (i) die Clathrin-abhängige Internalisierung, (ii) Clathrin-unabhängige Internalisierung über *Caveolae/lipid rafts* und (iii) Clathrin- und Caveolin-unabhängige Internalisierung<sup>1</sup>. Ein vierter möglicher Internalisierungsweg ist derjenige über die Makropinozytose (Kapitel 1.1.4). Abbildung 1 zeigt alle in Säugerzellen möglichen Endozytosewege in der Übersicht. Für die drei zuerst genannten Endozytosewege sind für den jeweiligen Internalisierungsweg repräsentative Proteine oder sonstige Substanzen bekannt. Transferrin, *low density lipoprotein* (LDL) und *epidermal growth factor* (EGF)<sup>2-7</sup> zählen zu denjenigen Proteinen, die über den Clathrin-assoziierten Endozytoseweg internalisieren, wohingegen Toxine, Viren und bakterielle Proteine vorwiegend über Clathrin-unabhängige Endozytosewege aufgenommen werden. Als bekannte Vertreter für die Endozytose über Clathrin- und Caveolin-unabhängige Wege gelten die Integrine, Moleküle des MHC-Komplexes und die Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteine<sup>1</sup>. Cholera toxin B eignet sich gut als Marker für den Caveolin-vermittelten Endozytoseweg, da es sich in die *Caveolae* einlagert, obwohl es nicht ausschließlich über diesen Weg internalisiert wird<sup>8,9</sup>. Während sowohl der Clathrin-abhängige, als auch der Clathrin-unabhängige, Caveolin-abhängige Endozytoseweg einer funktionsfähigen GTPase Dynamin für die Abschnürung ihrer Vesikel von der Plasmamembran bedürfen, übernimmt diese Aufgabe in den Clathrin- und Caveolin-unabhängigen Endozytosewegen die GTPase ARF6<sup>1,10</sup>. Die Sortierung internalisierter Liganden und Rezeptoren zu ihren Zielorten innerhalb der Zelle wird als eine der ersten Funktionen des endozytotischen Systems angenommen. Zusätzlich sind folgende

weitere Funktionen für Endosomen, u.a. in der Signaltransduktion, der Zytokinese, Zellpolarität und Zellmigration bekannt<sup>1,11-13</sup>. Die Studien zur Signaltransduktion und der Bedeutung der Endosomen für diesen Vorgang führten zur Entwicklung des Konzepts der „*signaling endosomes*“<sup>14,15</sup>. Lakadamyali *et al.* fanden heraus, dass zwei verschiedene Populationen von frühen Endosomen in Zellen existieren, die sich dadurch auszeichnen, dass sie unterschiedliche Zeiten benötigen, bis sie zu späten Endosomen reifen. Sie bezeichneten sie einerseits als dynamische Population, die mobil entlang von Mikrotubuli durch die Zelle transportiert werden kann und schnell zu späten Endosomen reift und andererseits als statische Population, die eine wesentlich längere Reifungszeit benötigt, um zu späten Endosomen zu werden<sup>11</sup>. Für Transferrin, LDL und EGF wird angenommen, dass sie zuerst in einen gemeinsamen Pool von frühen Endosomen gelangen, bevor sie dann entweder in Recycling-Endosomen oder in späte Endosomen geleitet werden<sup>3,16,17</sup>. Zur Verfolgung von Proteinen entlang ihres endolysosomal Transportwegs ist die Verwendung organellspezifischer Marker wie beispielsweise der GTPasen Rab5, als Marker der frühen Endosomen, von Rab7, als Marker der späten Endosomen, und von Rab11, als Marker der Recycling-Endosomen, üblich.



**Abbildung 1: Mögliche Endozytosewege in mammalischen Zellen.** Außer dem am besten verstandenen Clathrin-vermittelten Endozytoseweg (I) sind in Säugerzellen grundsätzlich noch drei weitere Clathrin-unabhängige Aufnahmewege möglich. Unter (II) sind die beiden Caveolin-abhängigen Endozytosewege über *lipid rafts* oder Caveolae dargestellt. Das integrale caveolare Protein, Caveolin, verleiht den Caveolae ein geriffeltes Aussehen und erlaubt somit die Caveolae von anderen Membraneinstülpungen zu unterscheiden. Außerdem gibt es noch sogenannte *non-coated invaginations* oder CLICs, die Clathrin- und Caveolin-unabhängig stattfinden und meist Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-verankerten Proteinen die Aufnahme in die Zelle erleichtern (III). In vielen, aber nicht in allen, Clathrin-unabhängigen Endozytosewegen wird die Abschnürung der Vesikel von der Membran durch die GTPase Dynamin induziert. Bei der Makropinozytose (IV) handelt es sich um eine vorübergehende Antwort auf Wachstumsfaktoren oder mitogene Agenzien, wobei die Aufnahme von Flüssigkeiten oder gelösten Substanzen über Bildung großer Vesikel einer variablen Größe induziert wird. Abbildung modifiziert nach R.Brock, Grundvorlesung „Zellbiologie für Biologen und Biochemiker“ „Membranbewegungen Exo-/Endozytose“, 2005.

### 1.1.1 Clathrin-abhängige Endozytose

Bei der Clathrin-abhängigen Endozytose handelt es sich um einen rezeptorvermittelten Internalisierungsweg zur Aufnahme von Proteinen in Zellen. Vor Endozytose der Proteine und/oder Rezeptoren werden diese von Clathrin-ummantelten Vesikeln (*clathrin-coated pits*) eingehüllt und die Vesikel durch die GTPase Dynamin mechanochemisch von der Plasmamembran abgeschnürt und ihr Inhalt zu den frühen Endosomen transportiert. In den frühen Endosomen, die auch als *sorting endosomes* bezeichnet werden, entscheidet sich der weitere Weg der internalisierten Proteine und/oder Rezeptoren. Entweder werden die internalisierten Substanzen weiter zu den *recycling endosomes* geleitet und dann zurück zur Plasmamembran transportiert oder aber der endolysosomale Weg führt zu den späten Endosomen, die für den Transport zu den Lysosomen verantwortlich sind und den Abbau induzieren.

Die obige Beschreibung des Clathrin-abhängigen Endozytosewegs stellt eine vereinfachte Version des eigentlich komplexen intrazellulären Vesikeltransports dar. Der Clathrin-abhängige Endozytoseweg ist einer der Hauptmechanismen u.a. auch zur Regulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und der über diese induzierten Signaltransduktionswege. Für die meisten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) fungiert Arrestin durch seine AP-2- und Clathrinbindeaktivität als Adapterprotein zwischen Rezeptor und Clathrinummantelung. Gemäß der Eigenschaften der Agonist-abhängigen Arrestinbindung können GPCRs in zwei Gruppen unterschieden werden. Klasse A-Rezeptoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie Arrestin-3 mit höherer Affinität binden als Arrestin-2, wohingegen die Klasse B-Rezeptoren beide nicht-sichtbaren Arrestine (*nonvisual arrestins*) mit nahezu gleicher Affinität binden. Zu den Klasse A-Rezeptoren werden u.a. der  $\beta$ 2-adrenergic Rezeptor ( $\beta$ 2AR) und der Endothelin Typ A-Rezeptor (ETA), zu den Klasse B-Rezeptoren der Angiotensin II Typ 1A- (AT1A) und der Vasopressin V2-Rezeptor (V2) gezählt. Obwohl Arrestin in beiden Gruppen die Desensitivierung und Internalisierung der Rezeptoren erleichtert, dissoziiert es bei Klasse A-Rezeptoren bereits an oder in der Nähe der Plasmamembran von diesen, während es bei Klasse B-Rezeptoren mit diesen verbunden in Endosomen kolokalisiert<sup>18</sup>. Es wird vermutet, dass die unterschiedliche Affinität zwischen Arrestin und Rezeptor bereits Einfluss auf die postendozytische Sortierung der Rezeptoren in den Recycling- und den Abbauweg hat. Des Weiteren wurden kleine lineare Sequenzen von Aminosäuren innerhalb der intrazellulären Domäne von Transmembranproteinen häufig als ausschlaggebend für die weitere Transportroute entlang des Endozytosewegs detektiert<sup>19</sup>. Klassische Dileucin- oder Tyrosin-basierte (YXX $\Phi$ ) Motive dienen als Internalisierungsmotive für die Einhüllung von GPCRs in Clathrinvesikel. Solche Motive konnten u.a. bei den Rezeptoren PAR1 (*protease-activated receptor-1*) und den beiden Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 gefunden werden. Eine Mutation des Motivs führte in CXCR2 zu einer verringerten Rezeptorcoimmunpräzipitation von AP-2, einer Inhibierung der Rezeptorendozytose und der IL-8-induzierten Chemotaxis in HEK293 Zellen<sup>20</sup>. Für CXCR4 wurde eine stark reduzierte Rezeptorinternalisierung nach Ligandenbindung bei Mutation des Dileucinmotivs festgestellt<sup>21</sup>.

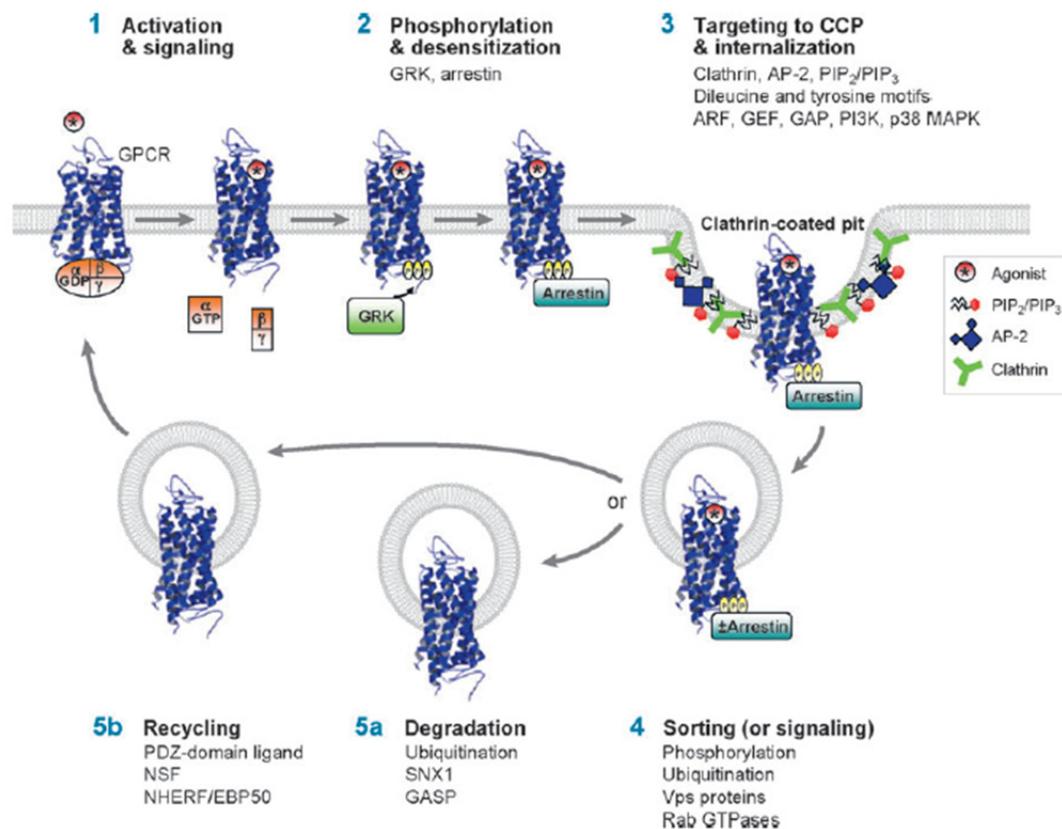
Wie die Arrestin- und Dileucin-basierten Mechanismen genau reguliert werden, ist bislang ungeklärt. Abbildung 2 veranschaulicht die Regulation des G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCRs)-Transportwegs durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) und

Arrestine. Wie hier verdeutlicht, wird der Endozytosevorgang der meisten G-Proteingekoppelten Rezeptoren aus Säugetieren hauptsächlich durch Arrestin über einen Clathrin- und Dynamin-abhängigen Internalisierungsweg reguliert<sup>22</sup>. In Übereinstimmung mit dem Endozytosemechanismus der oben bereits erwähnten GPCRs, PAR1, CXCR2 und CXCR4, konnte auch für die beiden Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR2 der Clathrin-abhängige Endozytoseweg als Aufnahmeweg in Zellen herausgestellt werden<sup>23,24</sup>. Während für CCR5 nur eine Abhängigkeit der Internalisierung des Rezeptors von Clathrin u.a. durch Kolokalisationsstudien mit Transferrin oder dem frühen endosomalen Marker EEA-1 und in Clathrin-Knockout-Versuchen nachgewiesen werden konnte<sup>23</sup>, konnte für die CCR2-Endozytose zusätzlich auch eine Abhängigkeit von der Funktionalität der GTPase Dynamin durch Verwendung des Dynamininhibitors Dynasore herausgestellt werden<sup>24</sup>. Ding *et al.* konnten in ihren Studien zeigen, dass die Endozytose von CXCR4 durch Verwendung von RNA<sub>i</sub> gegen das Hitzeschockprotein Hsc70, welches neben anderen Proteinen in den Abbauvorgang der Clathrinhülle von Clathrin-umhüllten Vesikeln vor Fusion mit den frühen Endosomen involviert ist, beeinträchtigt werden konnte. Des Weiteren wurde eine Kolokalisation zwischen CXCR4 und Hsc70 in HEK293-Zellen nachgewiesen<sup>25</sup>.

Auch für die invariante Kette des MHC II-Komplexes konnte schon im Jahre 2002 von Lagaudrière-Gesbert *et al.* eine Interaktion mit dem Hsc70-Protein herausgestellt werden<sup>26</sup>. Über zwei Leucin-basierte Sortierungssignale innerhalb ihres zytoplasmatischen Schwanzes interagiert die invariante Kette mit den beiden Adaptorproteinen AP1 und AP2, nicht jedoch mit AP3<sup>27,28</sup>. Von Kongsvik *et al.* wurde in Studien mit Mutanten gezeigt, dass das Vorhandensein eines der Signale für die Einsortierung von Ii in seinen Transportweg in normalen und in polarisierten Zellen ausreichte<sup>29</sup>. Während MHC II-Ii-Komplexe über einen Clathrin-abhängigen Endozytoseweg internalisiert werden<sup>30,31</sup>, internalisieren reife Peptid-beladene MHC II-Komplexe von der Zelloberfläche ausgehend über einen Clathrin-, AP2- und Dynamin-unabhängigen Endozytoseweg<sup>32</sup>.

Kürzlich erst wurde von von Kleist *et al.* gezeigt, dass Clathrin über seine terminale Domäne (TD) als zentrale Plattform zur Fertigung und Dissoziation der *coated pits* fungiert. Durch Verwendung sogenannter *pitstops* war es möglich die Ligandenbindung an die Clathrin-TD zu inhibieren und somit die rezeptorvermittelte Endozytose, sowie die Aufnahme von HIV und den Recyclingprozess synaptischer Vesikel zu beeinträchtigen. Aus dieser Beobachtung wurde geschlussfolgert, dass die terminale Domäne von Clathrin die *coated pit dynamics* entscheidend regulierte und daher zukünftig *pitstops* als neue Werkzeuge zur Regulation der Clathrinfunktion und damit als potenzielle Inhibitoren für die Aufnahme von Viren und anderer Pathogene, sowie für Signalwege fungieren könnten<sup>33</sup>. Des Weiteren ist bekannt, dass nur etwa die Hälfte aller entstehenden *clathrin-coated pits* durch die 5'-Inositolphosphatase Synaptojanin 1 stabilisiert werden und weiterreifen, bevor sie als Clathrin-ummantelte Vesikel von der Plasmamembran abgeschnürt werden. Ein entscheidender Beitrag zum Aufbau der *clathrin-coated pits* wird durch den hauptsächlichen Bindepartner der endozytotischen Proteine Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) gewährleistet. Obwohl die Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-kinase nicht in den *clathrin-coated pits* lokalisiert ist, so reguliert sie dennoch ihre Initiierung und ihr Wachstum<sup>34</sup>. Außer der Endozytose von für den Clathrin-assoziierten Internalisierungsweg typischen Proteinen

wie Transferrin oder EGF sind mittlerweile auch verschiedenste Viren dafür bekannt, über diesen Weg internalisiert zu werden. Beispiele hierfür sind der bovine Parvovirus<sup>35</sup>, der Ebola-Virus<sup>36</sup> und lentivirale Pathogene<sup>37</sup>. Zur Regulierung der Internalisierung von GPCRs scheint ihr Phosphorylierungsstatus eine wichtige Rolle zu spielen, wie genau jedoch die involvierten Kinasen und Phosphatasen reguliert und wo sie lokalisiert sind, ist bislang noch nicht aufgeklärt und wird in Zukunft unerlässlich sein, um die Regulation der Rezeptorinternalisierung über Clathrin-ummantelte Vesikel zu verstehen<sup>38</sup>.

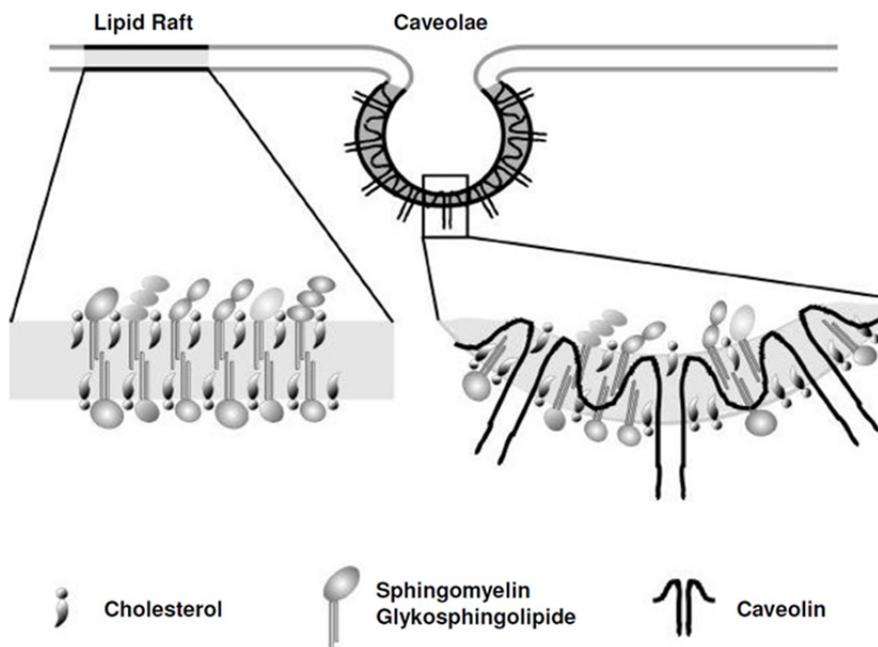


**Abbildung 2: Regulation des G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCRs)-Transportwegs durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) und Arrestine.** Die Bindung des Agonisten an den GPCR führt zur Rezeptoraktivierung, zur Anlagerung des G-Proteins und zur Signaltransduktion (1). GRKs phosphorylieren den aktivierten GPCR an seiner intrazellulären Domäne und mobilisieren dadurch die Arrestine. Durch die Arrestinbindung an den Rezeptor wird die Anlagerung des G-Proteins inhibiert und die Signaltransduktion unterbrochen. Dieser Prozess wird als Desensitivierung bezeichnet (2). Die Rezeptor/Arrestin-Komplexe werden zu den *clathrin-coated pits* geleitet, wo das Arrestin einen Multikomponentenkomplex mit Clathrin, Adapterprotein-2 (AP-2) und Phosphoinositiden bildet. Im Anschluss daran erfolgt die Rezeptorinternalisierung (3). Internalisierte GPCRs werden sortiert (4) und entweder zu Abbau- (5a) oder Recyclingkompartimenten (5b) transportiert. Abb. aus<sup>39</sup>.

### 1.1.2 Clathrin-unabhängige Endozytosewege

Aufgrund mangelnder Erkenntnisse über bekannte physiologische Moleküle, die nicht über eine Clathrin-abhängige Endozytose in die Zelle aufgenommen werden und fehlender Selektionsmarker wurden Studien über die sogenannten Clathrin-unabhängigen Endozytosewege lange Zeit auf die unspezifische Aufnahme löslicher Substanzen und exogener Moleküle, wie beispielsweise den bakteriellen Proteintoxinen, beschränkt. Erst

Fortschritte in der Aufklärung des Mechanismus der Clathrin-abhängigen Endozytose und der damit verbundenen Entwicklung spezifischer molekularer Inhibitoren für diesen Weg führten dazu, dass die physiologische Bedeutung Clathrin-unabhängiger Endozytosewege festgestellt wurde. Im Zuge der Intensivierung von Studien zur Erforschung dieser Endozytosewege wurden physiologische Marker identifiziert und Beweise dafür gesammelt, dass offenbar sogar mehrere Clathrin-unabhängige Endozytosewege existieren. Zu den Endozytosewegen, die zur Aufnahme von Substanzen ohne Beteiligung von Clathrin führen, gehören die Phagozytose, die Makropinozytose und die Endozytose über Caveolae und *lipid rafts*<sup>40</sup>. Aufgrund intensiver Forschung auf dem Gebiet der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege weiß man heute, dass sie u.a. entscheidende Aufgaben in der Reparatur der Plasmamembran, der zellulären Ausbreitung (*cellular spreading*), in der Zellpolarisierung und der Modulierung interzellulärer Signaltransduktionswege übernehmen<sup>41</sup>. Abbildung 3 zeigt den unterschiedlichen Aufbau zwischen *lipid rafts* und Caveolae.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung von *lipid rafts* und Caveolae in der Plasmamembran.** Entnommen aus der Dissertation von Ulrich Huth, 2005 und modifiziert nach<sup>42</sup>.

### 1.1.2.1 Caveolin-abhängige Endozytose

Obwohl die erste Beschreibung von Caveolae der Entdeckung der *clathrin-coated pits* um etwa zehn Jahre vorausging, erwies sich die Aufklärung ihrer Aufgabe in der Endozytose als schwierig. Zur Erlangung erster Erkenntnisse über diese kleinen Einschnürungen der Plasmamembran zeigten sich ihre typische, dem griechischen Omega ähnliche Struktur und die Tatsache, dass es in Epithelzellen manchmal zu Anhäufungen von Caveolae kommt, als hilfreich<sup>43</sup>. Erst durch die Entdeckung des integralen Proteins der Caveolae, Caveolin-1, im Jahre 1992 wurde die weitere molekulare Charakterisierung dieser Organellen beschleunigt<sup>44,45</sup>. Biochemisch sind Caveolae als spezielle Form eines *rafts* anzusehen<sup>45</sup>. Sie zeichnen sich im Unterschied zu den *lipid rafts* und den anderen Mikrodomänen durch das in Caveolae dominierende Protein Caveolin-1 aus<sup>45</sup>. Dass es sich bei Caveolae um *detergent-resistant*

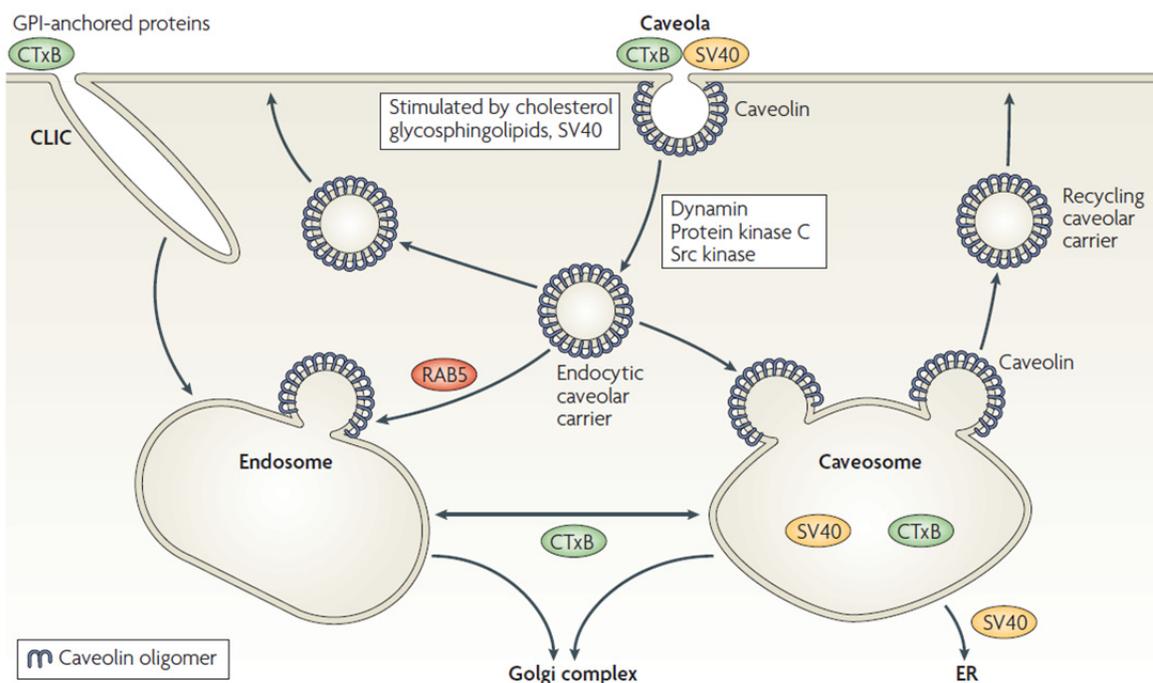
*membranes* (DRMs) handelt, die mit Glykosphingolipiden und Cholesterol angereichert sind, ist eine Eigenschaft, die sie mit den *lipid rafts* und übrigen Mikrodomänen gemeinsam haben<sup>40</sup>. Die Bedeutung des Proteins Caveolin-1 für die Bildung von Caveolae konnte in Lymphozyten gezeigt werden, in denen normalerweise kein Caveolin, weder post-transkriptional noch post-translational, nachgewiesen werden konnte und die auch keine Caveolae besitzen. Nach Expression von Caveolin wurde jedoch eine *de novo*-Bildung von Caveolae detektiert<sup>40,46</sup>. Auch nach transienter Transfektion von Caveolin in CHO-Zellen konnte eine Zunahme in der Endozytose von Wachstumshormonrezeptoren über Caveolae festgestellt werden<sup>47</sup>. Im Gegensatz dazu wurde von Le *et al.* unter denselben Bedingungen eine Blockierung der Endozytose von *autocrine motility factor receptor* (AMF-R) in NIH/3T3-Zellen beobachtet<sup>48</sup>. Dieser scheinbare Widerspruch in der Funktion von Caveolin für die Endozytose über Caveolae könnte mit der Verwendung unterschiedlicher Stimuli und verschiedener Zelltypen erklärt werden, vor allem unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Caveolae bislang nur in spezifischen Zelltypen detektiert werden konnten, zu denen u.a. auch HeLa-Zellen zählen wie Sjogren *et al.* und Nishizuka *et al.* in den Jahren 2001 und 2007 zeigen konnten<sup>49,50</sup>. Zusätzlich zu den HeLa-Zellen exprimieren auch Krebszelllinien, wie z.B. die *non-small-cell lung cancer* Zelllinien Calu-1 und Calu-6, sowie die humane Ovarien-Karzinomazelllinie A2780 Caveolin-1<sup>51,52</sup>.

Trotz Unklarheiten bezüglich der genauen Funktion von Caveolae und ihres Beitrags zur Clathrin-unabhängigen Endozytose konnte zweifelsfrei ihr Mitwirken im Cholesterol-Transport und der Homeostase<sup>53</sup>, sowie in der Clathrin-unabhängigen Endozytose einiger *GPI-anchored proteins* und von Cholera-Toxin belegt werden<sup>45</sup>. Des Weiteren wird vermutet, dass Caveolae und Caveoline in die dynamische Cholesterol-abhängige Regulation spezifischer Signaltransduktionswege involviert sind<sup>45</sup>. Der Clathrin-unabhängige Endozytoseweg über Caveolae wird trotz seiner erwiesenen Vermittlung der Transzytose von Molekülen wie beispielsweise Albumin in Epithelzellen<sup>54</sup> zu denjenigen Endozytosewegen gezählt, die durch einen Stimulus induziert werden und nicht konstitutiv ablaufen. Von Parton *et al.* konnte im Jahre 1994 erstmals gezeigt werden, dass in nicht-transfizierten Zellen die Internalisierung von Caveolae durch Stimulation mit dem Phosphataseinhibitor Okadainsäure induziert wird<sup>55</sup>. Von einem Stimulus abhängige Internalisierungen von Caveolae konnten auch in Studien zur Aufnahme von SV40 Virus in lebende Zellen<sup>56</sup> und für die Aufnahme von *E.coli* in Mastzellen aus der Maus (BMMC, *bone marrow-derived mast cells*)<sup>57</sup> beobachtet werden. Wie bei anderen vesikulären Transportmechanismen so wird auch in der Endozytose über Caveolae die Abschnürung von der Plasmamembran durch die GTPase Dynamin gewährleistet<sup>58-60</sup>. Kang *et al.* zeigten, dass die Internalisierung von normalem zellulären Prionprotein zwar über einen Clathrin-unabhängigen für die Inhibitoren Filipin und Nystatin sensitiven Aufnahmeweg erfolgt und von Dynamin abhängig ist, die aktive GTPase in diesem Fall aber nicht Dynamin selbst, sondern die GTPase Arf6 ist<sup>61</sup>.

### *CHOLERATOXIN B*

Bei Cholera toxin B (CTxB) handelt es sich um die B-Untereinheit des vom Bakterium *Vibrio cholerae* produzierten Toxins Cholera toxin (CTx). Außer den insgesamt fünf B-

Untereinheiten besteht das vollständige Bakterientoxin noch aus der toxischen A-Untereinheit. Die A-Untereinheit hat die Funktion einer ADP-Ribosyltransferase und verhindert die Signalweiterleitung über die G-Proteine und kann die Dehydrierung der Zelle verursachen<sup>62</sup>. Die nicht-toxische B-Untereinheit hingegen wird vom Proteinkomplex benötigt, um die Bindung des Proteins über die Pentasaccharidkette des Gangliosids  $G_{M1}$  an die Zellmembran zu gewährleisten<sup>63</sup>. Da Cholera toxin B sich während seines Internalisierungswegs in den Caveosomen (Caveolae) anreichert, wird es seit 1998/1999 auch als Marker für *lipid rafts* in zellbiologischen Fragestellungen verwendet<sup>64,65</sup>. Der schematische Ablauf der Endozytose von CTxB wird in Abbildung 4 verdeutlicht.



**Abbildung 4: Caveola –Endozytose.** Caveolae, die sich von der Plasmamembran her nach innen einschnüren, können Cholera toxin B (CTxB) und SV40 umhüllen und ins Zellinnere befördern. Dieser Prozess wird durch die GTPase Dynamin, sowie durch Proteinkinase C und Tyrosinkinasen wie beispielsweise Src-Kinase reguliert. Die sich abschnürenden Caveolae bilden im Zellinneren als *endocytic caveolar carrier* bezeichnete Vesikel, die entweder mit den Caveosomen oder mit den frühen Endosomen verschmelzen können oder aber ohne ein endosomales Intermediat zurück zur Plasmamembran gelangen und mit ihr fusionieren<sup>56,66,67</sup>. SV40 wird von den Caveosomen zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Caveolin wird nach Verschmelzung der *endocytic caveolar carrier* mit der Caveosomenmembran über *recycling caveolar carrier* zurück zur Plasmamembran gebracht. CTxB wird nach seinem Transport zu den Caveosomen oder in die frühen Endosomen vermutlich über die frühen Endosomen zum Golgi-Apparat transportiert. In der Abbildung ist zusätzlich ein unabhängig vom Vorhandensein von Caveolae in der Zelle vorkommender Internalisierungsweg über Clathrin- (und Caveolin-) unabhängige *carrier*, sogenannte CLICs, eingezeichnet, über den die gleichen Oberflächenmarker u.a. CTxB in Endosomen internalisieren können. Über diesen Endozytoseweg gelangen hauptsächlich Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine in die Zelle<sup>68</sup>. Entnommen aus<sup>69</sup>.

### 1.1.2.2 Endozytose über lipid rafts/ membrane microdomains

Dynamische Anordnungen von Cholesterin und Glykosphingolipiden in Membranen wurden als *rafts* definiert. Die Hypothese, dass diese *lipid rafts* eine funktionelle Aufgabe im Membrantransport besitzen, basierte ursprünglich auf den beiden Beobachtungen, dass Glykosphingolipide bevorzugt zum apikalen Pol polarisierter Zellen transportiert werden und

dass diese Teil der *detergent resistant membranes* sind, die auch zum apikalen Pol transportierte *GPI-anchored proteins* enthalten<sup>70</sup>. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass entsprechend des Gehalts an Cholesterol und Sphingolipiden unterschiedliche sogenannte Mikrodomänen gebildet werden, in die sich unterschiedliche Proteine bevorzugt einlagern<sup>71,72</sup>. Mikrodomänen scheinen eher kleine dynamische Strukturen zu sein, die durch Interaktionen mit dem Zytoskelett stabilisiert werden und auf einen variablen Stimulus hin zu größeren Flächen aggregieren können<sup>40</sup>. Obwohl sowohl mit *rafts* als auch mit Caveolae assoziierte Proteine als DRMs bezeichnet werden können, müssen dennoch Caveolae und *lipid rafts* als zwei verschiedene Strukturen auf der Zelloberfläche unterschieden werden, die unterschiedliche Moleküle kompartimentieren können<sup>73,74</sup>. Eine Funktion von Mikrodomänen für Signaltransduktionswege wurde in vielen Berichten dokumentiert. Allerdings können außer der eingangs beschriebenen Funktion für das *apical targeting* nur wenige Studien über eine Aufgabe in anderen intrazellulären Transportwegen gefunden werden<sup>75</sup>. Laut Simons *et al.* können *lipid rafts*, die einen bestimmten Satz an Proteinen beinhalten, ihre Größe und Zusammensetzung als Reaktion auf intra- oder extrazelluläre Stimuli ändern und somit bestimmte Protein-Protein-Interaktionen begünstigen, woraufhin eine Aktivierung von Signalkaskaden induziert wird<sup>75</sup>. Studien zur genauen Aufklärung der Aufgabe von Mikrodomänen und *lipid rafts* in intrazellulären Transportmechanismen fehlen bis heute weitgehend aufgrund mangelnder „spezifischer Werkzeuge“. Wirksame Substanzen zur Inhibierung des Cholesterols durch Einschluss (Cyclodextrine) oder Bindung (Nystatin, Filipin) zerstören die Ordnung in Mikrodomänen und verhindern somit die Endozytose über *lipid rafts* und Mikrodomänen. Allerdings entdeckten Rodal *et al.* und Subtil *et al.* im Jahre 1999, dass eine Extraktion des Cholesterols durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin oder ein akuter Cholesterolmangel auch die Bildung und Abschnürung Clathrin-beschichteter Vesikel inhibiert<sup>76,77</sup>.

Als eines der ersten Beispiele für einen physiologischen Transmembranrezeptor, der effizient über die Endozytose über *lipid rafts* und Membranmikrodomänen internalisiert wird, wird der Interleukin-2 (IL-2) Rezeptor angesehen. Diese Überzeugung ergab sich anhand von Ergebnissen von Lamaze *et al.*, Benmerah *et al.* und Damke *et al.*, in denen gezeigt werden konnte, dass IL-2-Rezeptoren trotz selektiver Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose durch dn-Mutanten von Eps15 internalisieren konnten, durch dn-Mutanten von Dynamin die Endozytose inhibiert wurde und eine Endozytose von IL-2-Rezeptoren in Lymphozyten, die keine Caveolae bilden, stattfand<sup>78-80</sup>. Aufgrund obiger Erkenntnisse kann die Endozytose über Clathrin-beschichtete Vesikel ausgeschlossen werden, da diese durch die dn-Mutanten von Eps15 zum Erliegen gekommen wäre. Ein Endozytoseweg, der Dynamin-unabhängig abläuft, wie die Makropinozytose, kann aufgrund der möglichen Blockade durch dn-Mutanten von Dynamin ebenfalls ausgeschlossen werden. Von den beiden nun noch möglichen Endozytosewegen für IL-2-Rezeptoren, Endozytose über Caveolae und Endozytose über *lipid rafts* und Membranmikrodomänen, kann erstere aufgrund einer stattfindenden Endozytose in Lymphozyten ohne Caveolae auch ausgeschlossen werden. Als einziger Endozytoseweg für die Internalisierung von IL-2 Rezeptoren verbleibt demnach nur noch die Endozytose über *lipid rafts* und Membranmikrodomänen.

### 1.1.3 Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytose

Die als Clathrin- und Caveolin-unabhängige Endozytosewege zusammengefassten Internalisierungsmöglichkeiten sind nicht genau verstanden und werden wohl hauptsächlich von GPI-verankerten Proteinen zur Aufnahme in Zellen genutzt. Von Kirkham *et al.* wurde jedoch auch eine Internalisierung von z.B. CTxB über diesen Weg beschrieben<sup>68</sup>.

### 1.1.4 Mikro- und Makropinozytose

Die Mikropinozytose oder Pinozytose wird auch als „*cell drinking*“ oder „*fluid-phase endocytosis*“ bezeichnet und beschreibt einen Vorgang, bei dem Flüssigkeiten oder in Flüssigkeiten gelöste kleine Partikel mit einem Durchmesser von bis zu 0,1 µm in Vesikeln, die sich von der Zellmembran abschnüren, aufgenommen werden. Zur Mikropinozytose sind grundsätzlich alle Zellen fähig.

Durch Ausstülpungen der Zellmembran, sogenanntes „*membrane ruffling*“, kommt es häufig zur Bildung großer, heterogener, dynamischer und vesikulärer Strukturen, den Makropinosomen. Der Vorgang der Makropinozytose ist meistens auf die Zustellung gelöster Substanzen und Membranen, deren Einhüllung in Membranausstülpungen (Makropinosomen) durch Wachstumsfaktoren oder mitogene Agenzien induziert wird, beschränkt. In einigen Tumorzelllinien hingegen kommt sie konstitutiv vor. In speziellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) ist die Makropinozytose außerdem in die Antigenaufnahme und die -präsentation auf MHC Klasse I- und II-Molekülen involviert<sup>81</sup>. Des Weiteren konnten Marechal *et al.* und Watarai *et al.* Bakterien wie *Legionella* und Viren wie HIV in Makropinosomen lokalisieren, nachdem sie in Makrophagen aufgenommen wurden<sup>82,83</sup>.

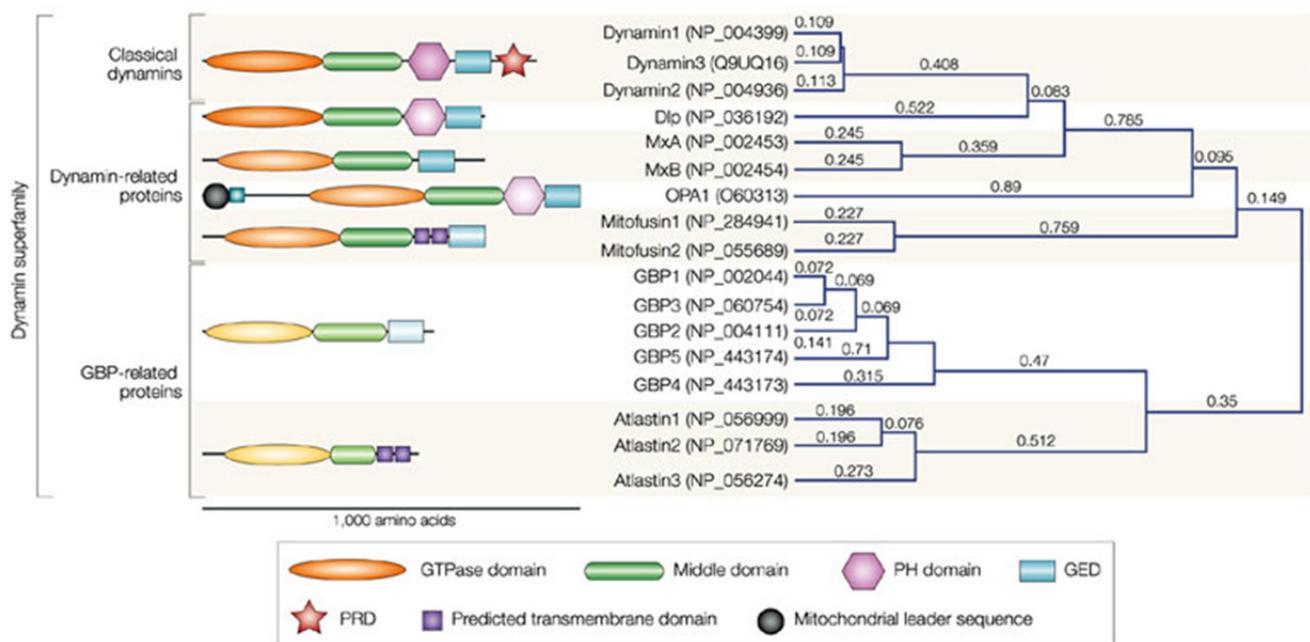
### 1.1.5 Phagozytose

Die Phagozytose unterscheidet sich in der Hinsicht von den anderen Clathrin-unabhängigen Endozytosewegen, dass Partikel aufgenommen werden, die im Lichtmikroskop sichtbar sind. Dies können Bakterien und Zellbruchstücke oder aber parasitäre Zellen sein. Zur Aktivierung der phagozytierenden Zelle ist eine Bindung an entsprechende Rezeptoren notwendig durch die die Ausbildung von Pseudopodien induziert wird. Die Pseudopodien umschließen anschließend die Partikel und bilden durch Verschmelzung ihrer Enden ein sogenanntes Phagosom. Die Phagozytose ist somit ein aktiver, energieverbrauchender Prozess, der entweder zur Deaktivierung von Bakterien in Lysosomen oder aber zum Abbau von Zellbruchstücken, z.B. in Makrophagen, führt<sup>84</sup>.

### 1.1.6 GTPase Dynamamin

Die Superfamilie der Dynamine in Menschen umfasst drei verschiedene Unterfamilien, die klassischen Dynamine (*classical dynamins*, z.B. Dynamamin-I), Dynamamin-ähnliche Proteine (*dynamamin-like proteins*, Dlps), zu denen auch die Mx Proteine, OPA1 (*optic atrophy 1*) und die Mitofusine (*mitochondrial fusion factor*) zählen, und GBP/Atlastin-verwandte Proteine (*GBP-related proteins*). Es wird angenommen, dass es sich bei allen Mitgliedern dieser Superfamilie

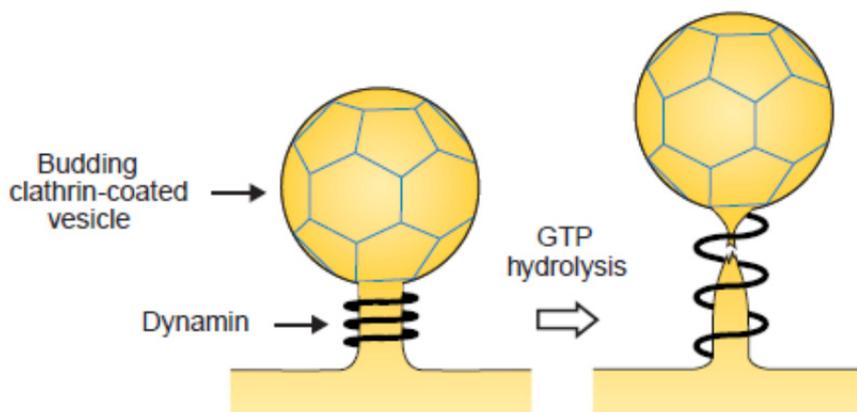
um membrangebundene und von einer Oligomerisierung abhängige mechanochemische GTPasen mit Funktionen in der Abschnürung eines Vesikels oder eines als *tubulation* bezeichneten Prozesses handelt. Der mechanochemische Mechanismus der Dynamine ist bedeutsam für alle für diese Superfamilie bekannten biologischen Funktionen wie u.a. die Vesikelabschnürung, die Mitochondrienteilung und –verschmelzung, die Zytokinese und die antivirale Aktivität <sup>85</sup>. Alle Mitglieder der Dynamine-Superfamilie weisen mindestens die GTPase-, die mittlere (*Middle*) und die GED(*GTPase effector domain*)-Domäne auf, wohingegen die meisten zusätzliche Domänen besitzen, um ihrer Funktion gerecht zu werden. Abbildung 5 veranschaulicht die verschiedenen Unterfamilien der Dynamine-Superfamilie mit ihrem strukturellen Aufbau, wobei diejenigen Dynamindomänen, deren Sequenz am wenigsten Homologie zum klassischen Dynamine, Dynamine 1, aufweisen, in blässerer Farbe dargestellt sind. Einige Dynamine besitzen statt einer PH-Domäne eine Transmembrandomäne.



**Abbildung 5: Struktur der verschiedenen Domänen der humanen Dynamine-Superfamilie.** Die Domänen werden durch unterschiedliche Symbole repräsentiert. Die Farbauswahl der Symbole wird umso blässer, desto weniger Sequenzhomologie zu den Domänen des klassischen Dynamins, Dynamine 1, besteht. Alle Dynamine bestehen aus einer GTPase-Domäne, über die GTP gebunden und hydrolysiert wird, einer mittleren Domäne und einer GTPase Effektordomäne (GED), die für die Oligomerisierung und Stimulation der GTPase-Aktivität benötigt wird. Zusätzlich zu diesen drei Domänen besitzen die meisten Dynamine noch eine Domäne für Interaktionen mit Lipidmembranen. Diese Aufgabe kann sowohl von einer Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne, als auch von einer Transmembrandomäne oder einer einfachen Sequenz für die Lipidbindung gewährleistet werden. Klassische Dynamine enthalten zusätzlich eine Prolinreiche Domäne (PRD) an ihrem carboxyterminalen Ende, wodurch sie mit Src-Homologie-3 (SH3)-Domänen interagieren können. Die Mitglieder der humanen Dynamine-Superfamilie sind entsprechend ihrer Domänenstruktur in Gruppen klassifiziert worden. DLP1, dynamine-like protein 1; GBP1, guanylate-binding protein 1; OPA1, optoc atrophy 1. Die Abbildung wurde entnommen aus <sup>85</sup>.

Wie bereits oben kurz erwähnt, übernehmen die Dynamine verschiedenste biologische Funktionen. Dynamine-1 gehört zu den klassischen Dynaminen. Als große GTPase (96 kDa)

ist es an der Abschnürung sich bildender Vesikel von der Plasmamembran beteiligt. Der Mechanismus der Abschnürung erfolgt folgendermaßen: Dynamin bildet eine Helix um den „Hals“ des entstehenden Vesikels und in einer schrittweisen Verlängerung der Helix durch Oligomerisierung des Dynamins kommt es zur GTP-Hydrolyse und schließlich zum Bruch des Vesikelhalses und zur Freisetzung des Vesikels ins Zellinnere (Abbildung 6). Obwohl die Funktion von Dynamin bei der Abschnürung Clathrin-ummantelter Vesikel (*clathrin-coated vesicle*, CCV) am meisten untersucht wurde<sup>80,86</sup>, so ist Dynamin auch an der Abschnürung von CCV an anderen Zellkompartimenten, an der Abschnürung von Caveoli<sup>87</sup>, der Phagozytose und dem Vesikeltransport an der Synapse beteiligt<sup>88</sup>.



**Abbildung 6: Modell einer gezielten helikalen Verlängerung des Vesikelhalses zur Abschnürung eines reifen Clathrin-ummantelten Vesikels von der Plasmamembran.** Nach Rekrutierung der GTPase Dynamin zum Hals eines reifen Vesikels legt sie sich durch GTP-Bindung als Helix um den Vesikelhals. Durch die gezielte GTP-Hydrolyse verlängert sich die Dynaminhelix und durchtrennt den Lipidhals an der Stelle mit der geringsten Stabilität, meist nahe der Clathrinhülle. Die Abbildung wurde entnommen aus<sup>88</sup>.

Die Dynamin-ähnlichen Proteine (Dlps) z.B. Dlp1 sind in genau definierten Regionen der Außenseite von Organellen zu finden und tragen zu deren Teilung bei. Mutationen im Bereich des konservierten GTP-Bindemotivs führen zu einer Röhrenbildung (*tubulation*) der Mitochondrien und verlängerten Netzwerken untereinander<sup>89</sup>. Die ebenfalls zur Unterfamilie der Dynamin-ähnlichen Proteine gehörenden Dynamine OPA1 und die Mitofusine sind am Prozess der Mitochondrienverschmelzung beteiligt. Sie fungieren antagonistisch gegenüber der Dlps und sind entweder in der inneren Mitochondrienmembran und im Intermembranraum der Mitochondrien (OPA1) oder auf der Außenseite der äußeren Mitochondrienmembran (Mitofusin) lokalisiert. Mitofusin und OPA1 stehen über die Transmembranregionen des Mitofusions in Kontakt miteinander und fördern gemeinschaftlich das sogenannte *tethering* (Anbinden) benachbarter Mitochondrien aneinander und die Verschmelzung der inneren und äußeren Membranen. Die Mitofusine 1 und 2 (Mfn1 und Mfn2) tragen in entscheidendem Maße zu diesem Prozess bei, indem sie über eine homo- oder heterotypische Interaktion den Kontakt zwischen angrenzenden Mitochondrien herstellen. Die andere GTPase OPA1 trägt dann durch Kooperation mit den Mitofusinen zur Verschmelzung der Membranen bei<sup>90</sup>. OPA1 wird vielerorts exprimiert, aber ist reichlich in der Retina lokalisiert. Entsprechend seiner Konsensussequenz wird das Genprodukt zu den Mitochondrien transportiert und fungiert hier sowohl in der Mitochondrienbiogenese als auch in der Stabilisierung der mitochondrialen Membranintegrität<sup>91</sup>. Mutationen in beiden Proteinen bewirken eine Fragmentierung der

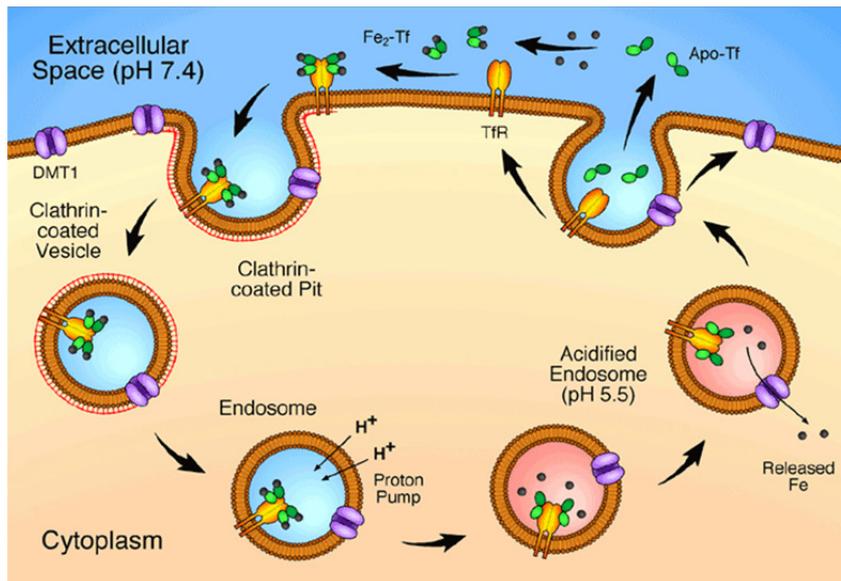
Mitochondrien. Übereinstimmend mit den Dlps sind OPA1 und die Mitofusine evolutionär konserviert, so dass sie in allen Organismen von der Hefe bis zum Menschen vorzufinden sind. Mx Proteine, die ebenfalls in die Unterfamilie der Dlps eingeordnet werden und nur innerhalb der Säugtiere konserviert sind, zeichnen sich durch ihre Beteiligung am Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen aus. Nach ihrer Induktion durch Typ I-Interferone verhindern sie die Replikation vieler Viren, u.a. von *viral nervous necrosis virus* (VNNV)<sup>92</sup>.

Die dritte Unterfamilie der Dynamine-Superfamilie umfasst die GBP (*guanylate-binding proteins*)/Atlastin-verwandten Proteine. Diese werden durch Typ I- und Typ II-Interferone (z.B. IFN- $\gamma$ ) und pro-inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) induziert<sup>93,94</sup>. Ihre Hauptfunktion besteht neben ihrer antiviralen in ihrer anti-proliferativen Wirkung. Atlastine gehören ebenfalls zur Superfamilie der Dynamine und sind neuronale Proteine. Mutationen innerhalb der humanen Atlastin-GTPase 1 (ATL1) führen zu einer angeborenen Form der spastischen Paraplegie (*spastic paraplegia*). ATL1 ist am Vesikeltransport zwischen endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat beteiligt und spielt eine Rolle bei der Morphogenese des Golgi-Apparats<sup>95,96</sup>. Auch konnte für die in ER-Membranen lokalisierte GTPase Atlastin eine Funktion während der homotypischen Fusion von ER-Membranen nachgewiesen werden. Für die ER-Bildung und dessen Erhalt ist eine GTP-Hydrolyse Voraussetzung. Da es naheliegend ist, dass die entsprechende GTPase mit der ER-Membran assoziiert ist, kommt auch hierfür die GTPase Atlastin in Frage. Ein Verlust der Atlastin-Funktion durch Knockout nach Verwendung von RNA<sub>i</sub> bewirkt eine ER-Fragmentierung, während eine Überexpression zur Ausdehnung des ERs durch vermehrte Fusion von ER-Membranen führt<sup>97</sup>.

### 1.1.7 Recyclingweg über *recycling endosomes* am Beispiel von Transferrin

Nach Internalisierung eines bestimmten Proteins oder Rezeptors gelangt die „Fracht“ aus den Vesikeln in die frühen, *sorting endosomes* und kann von dort aus wie im Falle von Transferrin über die sogenannten *recycling endosomes* zurück zur Plasmamembran transportiert werden. Transferrin ist ein für den Transport von Eisen aus dem Blut verantwortliches lösliches Glykoprotein. Nach Komplexierung mit Eisenionen bindet Transferrin an seine Rezeptoren (TfR) auf der Zelloberfläche und wird über einen Clathrin-vermittelten Endozytoseweg in Zellen internalisiert<sup>98,99</sup>. Den genauen Endozytoseweg von Transferrin sowie seine Funktion für den Eisenmetabolismus zeigt Abbildung 7.

Bislang wurde angenommen, der Mechanismus, über den Epithelialzellen die Clathrin-vermittelte Endozytose von Transferrin regulieren, sei ein konstitutiver Prozess, der unabhängig von regulatorischen Stimuli ablief. Seit 2010 weiß man, dass der Endozytoseprozess einer aktivierten Src-Kinase und der Phosphorylierung der zwei für die endozytotische Maschinerie wichtigen Komponenten Dynamine-2 (Dyn2) und des assoziierten Aktin-Bindeproteins Cortactin (Cort) bedarf, um erfolgreich abzulaufen. Demzufolge handelt es sich also um einen konstitutiven Src-Kinase-regulierten Prozess<sup>100</sup>.



**Abbildung 7: Internalisierungsweg von Transferrin.** Transferrin (Tf) bindet komplexiert mit zwei Eisen-Ionen (Fe) an seinen Rezeptor (TfR) auf der Zelloberfläche. Zusammen mit dem für den Eisenmetabolismus wichtigen Transporter DMT1 (*divalent metal transporter 1*) wird der Tf-Rezeptor in *clathrin coated pits* von der Plasmamembran aus ins Zelllumen eingeschnürt. Nach der Abschnürung der Clathrin-umhüllten Vesikel durch die GTPase Dynamin wird Transferrin zusammen mit seinem Rezeptor zu den Endosomen geleitet. Aufgrund der Ansäuerung der Endosomen infolge der Aktivität der Protonenpumpe sinkt der pH-Wert im Endosom auf ca. pH 5,5, wodurch das komplexierte Eisen vom Transferrin dissoziiert und über den DMT1-Transporter ins Zytoplasma gelangt. Durch anschließende Verschmelzung dieser *recycling endosomes* mit der Plasmamembran gelangen Transferrin, sein Rezeptor und der DMT1-Transporter zurück auf die Zelloberfläche und der Zyklus kann erneut ablaufen. Die Abbildung wurde entnommen aus der Vorlesung „Biologie für Mediziner-Allgemeine Genetik“ aus dem Wintersemester 2007/2008 von Herrn Prof. Dr. U. Homberg, Universität Marburg.

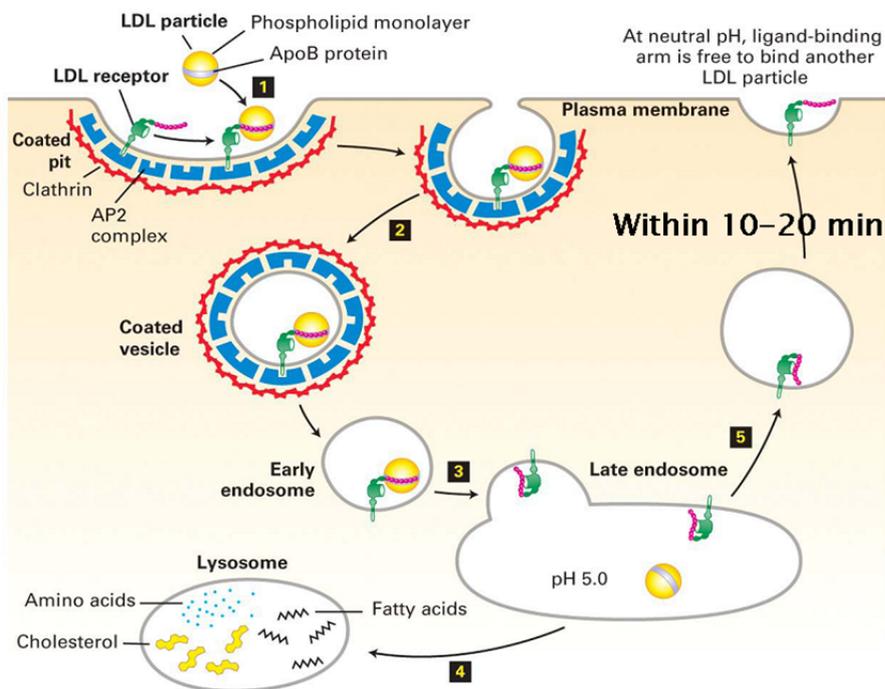
### 1.1.8 Degradationsweg über Lysosomen am Beispiel zweier Proteine

Im Anschluss an den Endozytoseprozess und den Transport des internalisierten Materials in die frühen Endosomen kann es von dort aus auch statt in die *recycling endosomes* zu gelangen, in den Degradationsweg in Richtung später Endosomen und Lysosomen einsortiert werden. Dies gilt beispielsweise für die beiden Proteine LDL (*low density lipoprotein*) und EGF (*epidermal growth factor*). Ihr Endozytoseweg soll im Folgenden exemplarisch erläutert werden.

#### 1.1.8.1 *Low density lipoprotein (LDL)*

LDL-Partikel sind aus einer aus Phospholipiden und unveresterten Cholesterolen bestehenden polaren Oberfläche und einem apolaren Kern aus Cholesterylestern aufgebaut. Bei der als progressive Erkrankung arterieller Blutgefäße definierten Atherosklerose gelten LDL-Partikel als Initiator, da ihre Infiltrierung in die Intima und ihre anschließende Modifizierung, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Ausschüttung von Chemokinen induzieren und somit den Entzündungsprozess anregen<sup>101</sup>. Die Endozytose von LDL-Partikeln erfolgt über Bindung an ihren Rezeptor LDLR an der Zelloberfläche und anschließende Abschnürung Clathrin-umhüllter Vesikel. Nach Fusionierung mit den frühen Endosomen wird LDL, anders als Transferrin, nach Transport in die späten Endosomen weiter zu den Lysosomen geleitet und dort abgebaut, wohingegen sein Rezeptor über *recycling endosomes* zur Beförderung

weiterer LDL-Partikel zurück zur Plasmamembran gebracht wird. Abbildung 8 veranschaulicht den gerade beschriebenen Prozess der LDL-Endozytose.



**Abbildung 8: LDL-Endozytose.** LDL-Partikel werden nach Bindung an ihren LDL-Rezeptor (LDLR) (1) über Clathrin-umhüllte Vesikel in die Zelle transportiert (2). Der Fusionierung der Clathrinvesikel mit den frühen Endosomen folgt die Aufnahme in die späten Endosomen (3). Dort trennt sich der weitere Transportweg von LDL und seinem Rezeptor. Während LDLR über *recycling endosomes* zurück zur Plasmamembran gelangt (5), wird LDL in Lysosomen abgebaut (4). Die Abbildung wurde entnommen aus der Vorlesung „Biologie für Mediziner-Allgemeine Genetik“ aus dem Wintersemester 2007/2008 von Herrn Prof. Dr. U. Homberg, Universität Marburg.

### 1.1.8.2 Epidermal growth factor (EGF)

Auch der Internalisierungsweg des epidermalen Wachstumsfaktors EGF folgt dem Clathrin-vermittelten Aufnahmeweg. Die Clathrin-assoziierte Endozytose galt lange Zeit als Hauptaufnahmeweg für den EGF-Rezeptor und es wurde angenommen, dass die Internalisierung über diesen Weg der Abschwächung des EGFR-Signalings über längere Zeit diene, indem der Rezeptor für den Abbau bestimmt wurde. Allerdings entstand Ratlosigkeit nach Entdeckung eines zweiten, Clathrin-unabhängigen, Internalisierungswegs für EGFR vor allem über den Sinn und Zweck dieser beiden Aufnahmewege. Aufschluss darüber brachten Studien von Sigismund *et al.*, in denen gezeigt werden konnte, dass nicht die Clathrin-assoziierte Endozytose den Abbau von EGFR bewirkte, sondern vielmehr dessen Transport zurück zur Plasmamembran induzierte. Der Abbau des Rezeptors hingegen wird bevorzugt nach dessen Internalisierung über den Clathrin-unabhängigen Weg initiiert<sup>102</sup>. Durch Veränderung des Gleichgewichts zwischen beiden Aufnahmewege z.B. hin zu mehr *Recycling* und weniger Abbau des Rezeptors konnte die Dauer des induzierten Signalings verlängert werden. Der Clathrin-vermittelte Weg entscheidet also über die Langlebigkeit von EGFR-aktivierten Signalwegen und ist z.B. für die DNA-Synthese absolut unabhkmmlich<sup>102</sup>. Von Goh *et al.* konnten im Jahre 2010 vier verschiedene Mechanismen zur Regulation der

Clathrin-vermittelten Internalisierung aktivierter EGF-Rezeptoren nachgewiesen werden. Diese Mechanismen sind sowohl unabhängig als auch kooperativ untereinander und beinhalten die Ubiquitinierung der Rezeptorkinasedomäne, den Clathrinadaptorkomplex AP-2, das Grb2-Adaptorprotein und die drei c-terminalen Lysinreste (K1155, K1158 und K1164). Studien mit einer ersten für die Internalisierung von EGFR defekten Mutante verdeutlichten, dass dieser Vorgang für eine *sustained*-Aktivierung der Proteinkinase B (AKT), nicht aber für die Aktivierung der MAP-Kinase unerlässlich war<sup>103</sup>.

## 1.2 Zytokine

Zytokine sind wichtige multifunktionale Mediatoren, die allgemein angeborene und adaptive Immunantworten über zielzellspezifische Rezeptor-vermittelte Wege regulieren. Häufig zu den Glykoproteinen oder löslichen Mediatoren zählend übernehmen Zytokine regulierende Funktionen bezüglich Differenzierung und Wachstum verschiedener Zelltypen. Während der Immunantwort von aktivierten T-Zellen des Immunsystems und anderen Zellen sezerniert dienen sie als Botenstoffe zur Kommunikation zwischen Zellen und werden deshalb auch als Effektormoleküle zur Regulation und Koordination der angeborenen und adaptiven Immunantwort verstanden. Diejenigen Zytokine, die Proliferation und Differenzierung von Zellen induzieren, werden gemäß ihrer Funktion auch als Wachstumsfaktoren bezeichnet. Zytokine können entsprechend ihrer Funktion in vier verschiedene Untergruppen klassifiziert werden: Wachstumsfaktoren, Interferone, Interleukine und Chemokine. In die Untergruppe der Wachstumsfaktoren werden zusätzlich die kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF), die Wachstumsfaktoren der roten und weißen Blutkörperchen, eingegliedert. Während die Interferone wichtige Aufgaben in der Proliferationshemmung, der Virusabwehr und der Apoptose übernehmen, spielen die Interleukine eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr, der Steuerung der Entzündungsreaktion, sowie bei der Hämatopoese und Apoptose. Die Chemokine hingegen steuern die Chemotaxis von Zellen und bewirken somit die gerichtete Migration beispielsweise von Leukozyten zum Entzündungsherd.

Aufgrund einer Produktion und möglichen Sezernierung von Zytokinen sowohl von hämatopoetischen, als auch von nicht-hämatopoetischen Zellen erfolgen Synthese und Sekretion anders als bei den Hormonen und Neurotransmittern, deren Synthese und Sekretion auf Organe bzw. Nervenendigungen beschränkt ist, in und aus vielfältigen verschiedenen Gewebsarten.

Der Vorgang der Endozytose von Zytokin/Zytokin-Rezeptorkomplexen erfolgt schnell infolge einer Bindung des Zytokins an seinen Rezeptor und dient häufig der Abschaltung der dadurch hervorgerufenen zellulären Antwort (Thomson, *The Cytokine Book II*, 2003). Durch die Zytokinbindung aktivierbare Signaltransduktionswege können speziell nach Endozytose eines Ligand/Rezeptorkomplexes infolge der Zytokinbindung induziert werden und demzufolge Zytokin-induziertes *endosomal signaling* bewirken<sup>1</sup>.

### 1.2.1 Chemokine

Die Chemokine bilden eine Untergruppe der Zytokine. Ihr Name leitet sich aus ihrer zentralen Rolle während der Immunantwort ab. Als inflammatorische und immunregulative Mediatoren bewirken sie eine gerichtete Migration von Zellen, besonders von Leukozyten, aus dem Blut zum Entzündungsherd hin (Leukozytenaktivierung und – rekrutierung). Da diese Bewegung entlang eines Konzentrationsgradienten zur höchsten Chemokinkonzentration hin als Chemotaxis bezeichnet wird, wurden die entsprechenden Zytokine als **chemotaktische Zytokine** oder kurz Chemokine bezeichnet. Zu den Chemokinen zählen bislang ungefähr 50 Mitglieder mit einem Molekulargewicht von 8-14 kDa. Bezüglich der Ligandenbindung besteht eine Redundanz, da diese ca. 50 Chemokine an nur ca. 20 Rezeptoren binden<sup>104</sup>. Obwohl die Aminosäuresequenz der Chemokine unterschiedlich stark konserviert ist, ist ihre Tertiärstruktur untereinander hoch konserviert. Dementsprechend findet sich bei allen Mitgliedern der Chemokinfamilie ein durch die Cysteine definierter Amino-Terminus, ein durch ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt charakteristischer Hauptkörper und ein Carboxy-Terminus, der mit einer  $\alpha$ -Helix endet. Ein besonderes Merkmal der Chemokine besteht zudem in einem konservierten Cysteinmotiv am N-Terminus. Gemäß der Anzahl an vorkommenden Cysteinresten werden die Chemokine strukturell in vier Gruppen klassifiziert: C-, CC-, CXC- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine<sup>104</sup>, wobei die meisten Chemokine zu den CC- und CXC-Chemokinen zählen. C- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine sind eher selten. Außer der oben bereits erwähnten Bedeutung der Chemokine für die gerichtete Migration von Immunzellen übernehmen Chemokine auch wichtige Aufgaben u.a. beim Homing dendritischer Zellen und T-Zellen<sup>105</sup>, bei der Hämatopoese (Blutbildung), Angiogenese, Proliferation und Differenzierung von B- und T-Zellen und bei Allergien<sup>106-110</sup>.

#### 1.2.1.1 CLF-Chemokine

Die sogenannten CLF (*chemokine-like-function*)-Chemokine bilden eine fünfte Gruppe unter den Chemokinen, da sie zwar strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Chemokine aufweisen, sie aber aufgrund des Fehlens des für die Gruppeneinteilung charakteristischen Cysteinmotivs keiner der vier oben erwähnten kanonischen Untergruppen der C-, CC-, CXC- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine zugeordnet werden können. Neben dem chromosomalen Protein HMGB1 (*high mobility group binding protein-1*)<sup>111,112</sup> gehören auch die  $\beta$ -Defensine<sup>113</sup> und MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) zu dieser Untergruppe der Chemokine<sup>112,114</sup>. Mit Ausnahme des HMGB1 können die hier genannten CLF-Chemokine an Chemokinrezeptoren binden und somit Signale an die Zelle weiterleiten.  $\beta$ -Defensine können u.a. an die CC-Chemokinrezeptoren CCR6<sup>115</sup> und CCR2 binden und somit Chemotaxis bewirken<sup>113</sup>. Das Zytokin MIF weist in seiner Tertiärstruktur eine erhebliche Homologie zum Dimer des CXCL-8 (IL-8) auf und kann auch an dessen Chemokinrezeptor, CXCR2, binden<sup>112,116</sup>. Zusätzlich bindet MIF an CXCR4 und an CD74<sup>112,117,118</sup>.

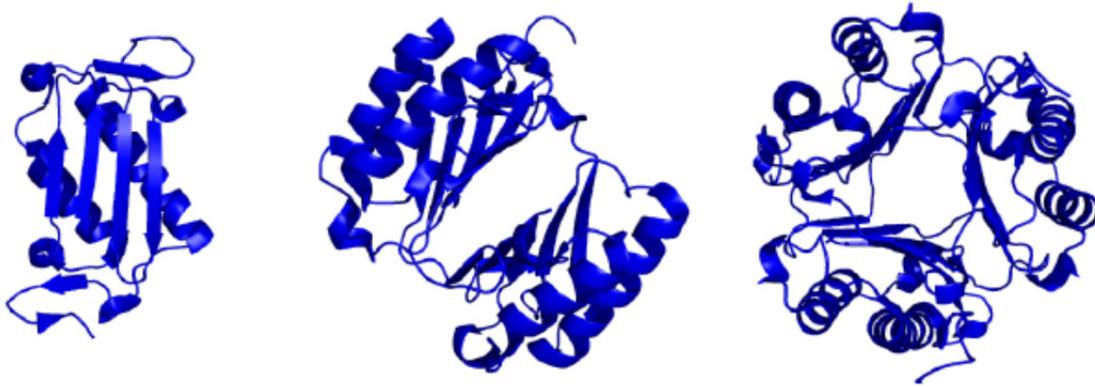
### 1.2.1.2 Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF)

#### HISTORIE

Als eines der ersten Zytokine wurde Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF) bereits im Jahre 1932 entdeckt<sup>119</sup>. Seinen Namen erhielt MIF aufgrund der Studien von Bloom *et al.* und David *et al.* zur Spättyp-Hypersensitivität (*delayed hypersensitivity*, DTH) im Jahre 1966<sup>120 121</sup>, die eine Inhibition der zufälligen Migration von Makrophagen durch MIF beobachteten. Neben der inhibierenden Wirkung von MIF konnte in den nachfolgenden Jahren auch eine Funktion bei der Aktivierung der Oberflächenadhäsion und der Phagozytose herausgestellt werden<sup>122,123</sup>. Die Charakterisierung des Zytokins MIF blieb dennoch lange Zeit unvollständig. Die aus heutiger Sicht eher irreführende Bezeichnung als Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor wurde erstmals nach Studien von Thurman *et al.*, McInnes *et al.* und Weiser *et al.* bezüglich seiner Richtigkeit in Frage gestellt, da sie auch eine inhibierende Wirkung anderer Zytokine, u.a. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin 4 (IL-4), des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF) und bakterieller Lipopolysaccharide (LPS) auf Makrophagen nachweisen konnten. Demzufolge schien die inhibierende Wirkung auf Makrophagen nicht allein von MIF, sondern vielmehr auf ein Gemisch aus einer Vielzahl von Zytokinen und bakteriellen Produkten zurückzuführen zu sein<sup>124 125,126</sup>. Trotz der ersten erfolgreichen Klonierung von humanem MIF in T-Zellen im Jahre 1989 und von murinem MIF im Jahre 1993<sup>124,127</sup> vermochte erst die Expression von bioaktivem MIF in *E.coli* und die Etablierung seiner Aufreinigungsmethode den Durchbruch für weitere Strukturanalysen, die Aufklärung seiner enzymatischen Aktivität und der molekularen Eigenschaften von MIF zu erzielen<sup>128</sup>.

#### STRUKTUR UND ENZYMATISCHE AKTIVITÄT

Der Oligomerisierungsstatus von MIF konnte bis heute nicht eindeutig aufgeklärt werden. Laut kristallographischen Studien und Röntgenstrukturanalysen liegt MIF als Trimer vor<sup>116,129,130</sup>, in der *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie<sup>131</sup> jedoch wurde es als Dimer nachgewiesen und *cross-linking* Studien deuteten auf eine Mischung aus Mono-, Di- und Trimer hin<sup>130,132</sup> (Abbildung 9). Bezüglich seiner dreidimensionalen Struktur weist MIF eine strukturelle Homologie mit den drei bakteriellen Enzymen 4-Oxalocrotonat-Tautomerase(4-OT)<sup>130</sup>, 5-Carboxymethyl-2-hydroxyuconat-Isomerase (CHMI)<sup>133</sup> und Chorismat-Mutase auf<sup>133</sup>. Sequenzhomologien mit den bakteriellen Enzymen konnten jedoch nicht festgestellt werden. MIF-Homologe sind in Vertebraten, Nematoden, Fischen und sogar in Pflanzen zu finden<sup>134,135</sup>. Da zwischen den mammalischen MIF-Proteinen (Mensch, Maus, Ratte und Rind) sogar eine Homologie von ca. 90% besteht, ist von einer hohen Konservierung während der Evolution auszugehen<sup>136</sup>. Des Weiteren besitzt MIF zwei enzymatische Aktivitäten: die D-Dopachrom-Tautomerase- (DDT) und die Thiol-Protein-Oxidoreduktaseaktivität<sup>137-139</sup>.



**Abbildung 9: Kristallstrukturen des MIF-Monomers, -Dimers und Trimers**<sup>116</sup>. Die dargestellten Strukturen wurden mit Hilfe des Programms PyMOL erstellt.

### *ROLLE BEI KRANKHEITEN*

MIF ist ein 12,5 kDa (114 Aminosäuren) großes Zytokin mit wichtigen Aufgaben in der angeborenen und adaptiven Immunabwehr und bei akuten und chronischen Entzündungserkrankungen. Strukturell lässt sich MIF keiner der bekannten Zytokinfamilien zuordnen. Seit die Möglichkeit besteht, durch biologisch aktives rMIF<sup>127</sup> die MIF-Konzentration an Zellen künstlich zu erhöhen, die Wirkung von MIF durch Gabe von anti-MIF-Antikörpern zu neutralisieren<sup>127,140</sup> oder den Einfluss eines MIF-Mangels in MIF-*knock-out* Mäusen<sup>141</sup> oder durch Gabe von siRNA für MIF<sup>142</sup> zu studieren, werden zahlreiche Studien zur Aufklärung der Rolle von MIF u.a. bei Krankheiten wie beispielsweise septischem Schock<sup>127,140</sup>, Morbus Crohn, rheumatoider Arthritis<sup>143-147</sup>, Glomerulonephritis<sup>148,149</sup>, der akuten Lungenerkrankung ARDS (*acute respiratory distress syndrome*)<sup>150,151</sup>, Atherosklerose<sup>152,153</sup> sowie bei Krebserkrankungen<sup>114,154-156</sup> durchgeführt.

In den meisten Fällen war es möglich, der infolge der Erkrankung erhöhten MIF-Expressionsrate oder MIF-Konzentration durch Gabe von anti-MIF-Antikörpern entgegenzuwirken und somit ein Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern.

Seine wichtige Rolle bei Krankheiten wurde erstmals im Jahre 1993 während Studien zur Endotoxämie in Mäusen deutlich, bei denen sich die Sekretion des Zytokins MIF aus Zellen des vorderen Hypophysenlappens, aus Monozyten und Makrophagen in Folge einer Stimulation mit LPS als Ursache für den endotoxischen Schock herausstellte<sup>127 157</sup>. Nach Entdeckung der Zytokine TNF und IL-1 als entscheidende Mediatoren des endotoxischen Schocks<sup>158,159</sup> konnte nun auch MIF in Versuchen, bei denen Mäusen intraperitoneal nur LPS oder LPS in Kombination mit rMIF injiziert wurde, als wichtiger Mediator für Endotoxämie nachgewiesen werden. rMIF bewirkte eine Verschlimmerung der LPS-Toxizität, während eine Neutralisierung der MIF-Aktivität durch Gabe von anti-MIF-Antikörpern selbst bis zu 8 Stunden nach Eintritt der Peritonitis die Mäuse vor endotoxischem Schock bewahrte<sup>127,140</sup>. Im Jahre 1999 gelang es Bozza *et al.* eine erhöhte Resistenz gegenüber endotoxischem Schock in MIF-*knock-out* Mäusen herauszustellen<sup>141</sup>. Die Begründung hierzu lag u.a. in einer reduzierten Expression des *Toll-like receptor 4* (TLR4), der das entscheidende Molekül für die Signaltransduktion des LPS-Rezeptorkomplexes darstellt, und einer demzufolge

abgeschwächten Reaktion auf LPS und Gram-negative Bakterien in diesen Mäusen<sup>136,160,161</sup>. Zusätzlich kann die Anwesenheit von MIF bei gleichzeitiger Präsenz von TNF- $\alpha$  und iNOS Makrophagen zur Abtötung des Parasiten *Leishmania major* veranlassen<sup>162</sup>. Entgegen seines aus der Historie resultierenden Namens wurden für MIF chemokinähnliche Eigenschaften gezeigt<sup>112,163</sup>, sodass es heutzutage als pleiotropes inflammatorisches Zytokin bekannt ist, das an der Regulation einer Vielzahl an immunologischen und inflammatorischen Abläufen beteiligt ist. Dysregulierte Funktionen von MIF können u.a. zu den oben bereits erwähnten akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen führen.

Unter den chronischen Entzündungskrankheiten, bei denen MIF eine wichtige Rolle für den Krankheitsverlauf zukommt, ist die Rheumatoide Arthritis (RA) eine der am besten erforschten. Bereits im Jahre 1997 gelang es Mikulowska *et al.* in einem experimentellen Mausmodell der Typ II-Kollagen-induzierten Arthritis, einem etablierten Modell der humanen RA, eine merkliche Reduktion der Immunantwort durch Gabe von anti-MIF-Antikörpern zu induzieren<sup>143</sup>. An typischen Entzündungsherden für RA konnten in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten um ein Vielfaches höhere Konzentrationen für MIF im Vergleich zu Patienten mit Osteoarthritis und gesunden Menschen detektiert werden<sup>164</sup>. Eindringende T-Lymphozyten, Makrophagen und Synovialzellen wurden als Quelle für die Sekretion des Zytokins identifiziert. Um den genauen Einfluss der MIF-Sekretion auf das Krankheitsbild der Rheumatoiden Arthritis aufzuklären, wurden in *in vitro*-Studien mit aus RA-Patienten stammenden Synovialfibroblasten nach Zugabe von MIF Messungen der mRNA-Level der Matrixmetalloproteinasen MMP-1 und -3 unternommen. Es zeigte sich eine Erhöhung der mRNA-Level für beide MMPs. Da die Matrixmetalloproteinasen für die Verschlimmerung des Krankheitsbildes durch Initiation des Abbaus der Knorpelsubstanz bekannt sind, konnten diese Studien veranschaulichen, wie MIF zum Fortschreiten der Rheumatoiden Arthritis beiträgt<sup>165</sup>. Des Weiteren konnte von Santos *et al.* ein Zusammenhang zwischen antigen-induzierter Arthritis, Glucocorticoiden und MIF herausgestellt werden. Es zeigte sich zum einen, dass durch Behandlung mit dem Glucocorticoid Dexamethason eine Hemmung der antigen-induzierten Arthritis erreicht werden konnte, die durch Zugabe des Zytokins MIF aufgrund seiner Glucocorticoid-*overriding*-Aktivität wieder aufgehoben wurde. Zum anderen konnte die antigen-induzierte Arthritis durch Behandlung mit anti-MIF-Antikörpern gehemmt werden und eine gesteigerte MIF-Synthese in Synovialzellen bei niedriger Glucocorticoidkonzentration nachgewiesen werden. In Studien konnte MIF demnach als wirksamer Antagonist zur glucocorticoiden Kontrolle von synovialen Entzündungen herausgestellt werden<sup>146</sup>.

Erhöhte MIF-Konzentrationen konnten auch im Blut und den Alveolen bei einer akuten Lungenerkrankung des Menschen, dem *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), beobachtet werden<sup>150,151</sup>. Donnelly *et al.* gelang es, eine Zunahme in der Sekretion der beiden proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-8 durch MIF nachzuweisen, die durch anti-MIF-Antikörper reduziert werden konnte<sup>150</sup>. Nicht nur bei der akuten Lungenerkrankung ARDS, sondern auch bei Asthma konnte das Zytokin MIF als wichtiger Mediator identifiziert werden. So enthielt die „*bronchoalveolar*“ Lavage-Flüssigkeit von Asthmapatienten deutlich erhöhte Mengen an MIF, die laut Rossi *et al.* auf die MIF-Sekretion aus zirkulierenden Eosinophilen nach Stimulation zurückzuführen war<sup>166</sup>. Außer bei den Lungenerkrankungen

konnte auch eine Beteiligung von MIF an der Entwicklung entzündlicher Darmkrankheiten wie Morbus Crohn herausgestellt werden. Durch Behandlung mit anti-MIF-Antikörpern gelang es ein Fortschreiten der Krankheit zu verhindern. Aus diesem Grund wäre ihre Anwendung sowohl präventiv, als auch therapeutisch durchaus denkbar. Zusätzlich konnte von de Jong *et al.* gezeigt werden, dass die Krankheit bei MIF-*knock-out* Mäusen nicht ausbrach<sup>167</sup>.

Bei der Atherosklerose, die als chronische Entzündungsantwort auf eine Verletzung der Arterienwand verstanden werden muss, ist MIF ebenfalls von Bedeutung. Von Lin *et al.* wurde im Jahre 2000 eine *de novo*-Expression von MIF in vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen in der Anfangsphase der Atherogenese bei Kaninchen beschrieben. Die verstärkte MIF-Expression in den Läsionen der Gefäßwand ging mit einer Monozytenadhäsion an das Endothel und einer sofortigen Migration in die Intima einher. Die Adhäsion der Monozyten könnte als Folge der verstärkten Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) auf den vaskulären Endothelzellen durch MIF zurückzuführen sein. Folglich scheint die verstärkte MIF-Expression sowohl auf die Makrophagenadhäsion und die transendotheliale Migration, als auch auf die Ausbildung der sogenannten „*foam cells*“ Einfluss zu nehmen<sup>168</sup>. Der Nachweis von MIF in humanen atherosklerotischen Läsionen ließ vermuten, dass MIF auch eine bedeutsame Rolle in der frühen Plaquebildung und der Entwicklung fortgeschrittener komplizierter Läsionen in der humanen Atherosklerose zukommt<sup>152</sup>. Mausexperimente zeigten eine Stabilisierung des Zustands atherosklerotischer Plaques in *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen nach einer durch einen Draht hervorgerufenen Verletzung der Halsschlagader, wenn die Wirkung des Makrophagenmigrationsinhibierenden Faktors (MIF) durch Antikörperbehandlung blockiert wurde. Ein deutlicher Rückgang neointimaler Makrophagen, sowie eine Inhibierung der Transformation der Makrophagen zu Schaumzellen (*foam cells*) waren zu verzeichnen<sup>169</sup>. Zusätzlich bewirkte die Blockierung von MIF durch die Antikörperbehandlung eine Reduktion der lokalen Aortenexpression u.a. von ICAM-1, MMP-2 und von TNF- $\alpha$ , die mit einer kleinen, wenngleich nicht-signifikanten Verkleinerung der Größe des aortischen Plaques einherging<sup>170</sup>. Eine starke Reduktion bezüglich der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen konnte auch in LDLr<sup>-/-</sup>-Mäusen nach MIF-Blockierung festgestellt werden<sup>171</sup>. Eine Hochregulierung von MIF und der Matrix-Metalloproteinase MMP-1 mit der Folge einer Schwächung der *fibrous cap* konnte von Kong *et al.* durch immunohistochemische Auswertung humaner atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden und bestätigt die Daten von Burger-Kentischer aus dem Jahre 2002 und Schober *et al.* aus dem Jahre 2004, dass MIF zur Destabilisierung und zu weiterer Plaquebildung führt<sup>152,169,172</sup>. Aus der Tatsache, dass MIF sowohl als Initiator von Rheumatoider Arthritis (RA), als auch von Atherosklerose gilt und daraus resultierend, dass in beiden Erkrankungen die Hochregulierung der Matrix-Metalloproteinasen MMP-1 und -3 eine Rolle spielt, sowie aufgrund der Glucocorticoid-*overriding*-Aktivität von MIF resultierte 2006 die Idee, die beiden Krankheiten könnten über MIF miteinander in Beziehung stehen und möglicherweise könnte MIF als neues therapeutisches *target* für die Entwicklung von *small-molecule*- oder Antikörper-basierter anti-Zytokin-Medikamente dienen<sup>156</sup>. Im Jahre 2007 wurde von Bernhagen *et al.* MIF als sogenannter *non-cognate* Ligand der beiden Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4 entdeckt und zudem die Bildung eines Rezeptorkomplexes aus CD74 und CXCR2

herausgestellt. Beide Rezeptoren, CD74 und CXCR2, waren in den Monozytenarrest in entzündeten oder atherosklerotischen Arterien involviert. *In vivo*-Studien verdeutlichten, dass eine Blockierung von MIF, aber nicht die der kanonischen Liganden von CXCR2 und CXCR4 in Mäusen mit fortgeschrittener Atherosklerose zu einer Plaque-Regression und einem Rückgang der Anzahl an Monozyten und T-Zellen in den Plaques führte. Abschließend konnte festgestellt werden, dass MIF sowohl Chemokin-ähnliche Funktionen, als auch solche als Regulator für die Rekrutierung von Immunzellen während der Entzündung und in der Atherogenese über seine Bindung an CXCR2 und CXCR4 ausübt<sup>112,173</sup>.

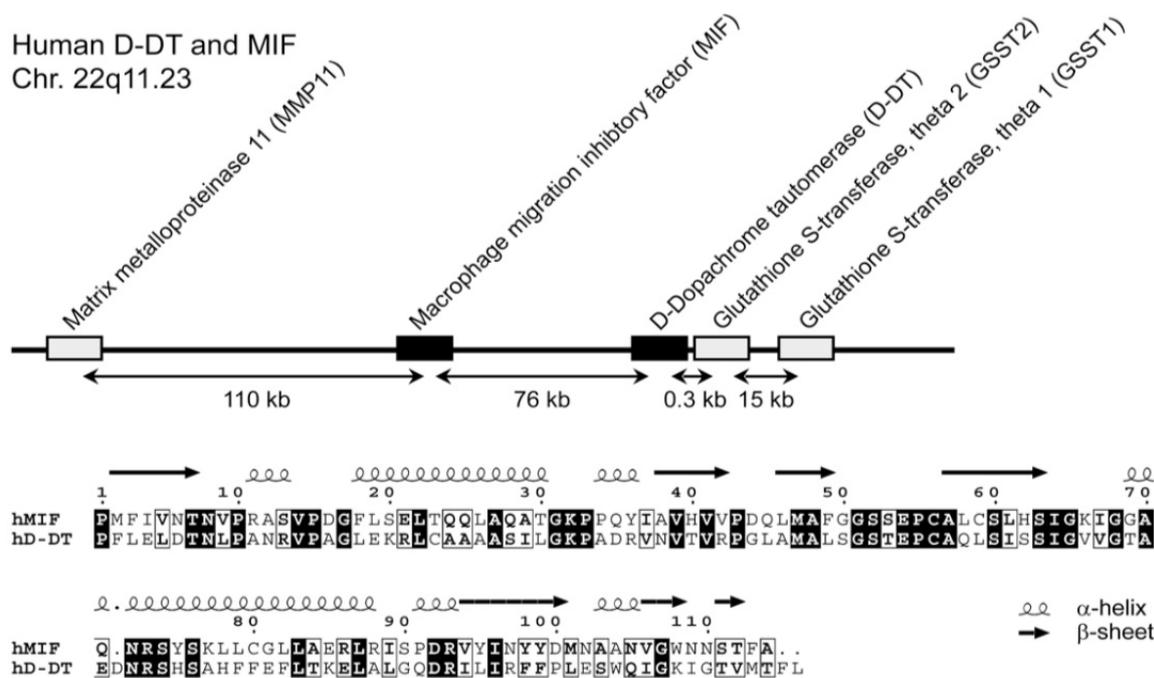
MIF wird in einer Vielzahl verschiedener Gewebe und Zelltypen u.a. in Epithelzellen des Gefäßsystems, des Dünn- und Dickdarms, des Magens und der Nieren, aber auch u.a. in Fibroblasten, Hepatozyten und Kupfferzellen quasi-konstitutiv exprimiert<sup>136</sup>. Außer den T-Lymphozyten<sup>120,121</sup> gelten heute zusätzlich zu den Monozyten und Makrophagen<sup>174</sup> auch die Eosinophilen, dendritischen Zellen und B-Zellen als MIF-produzierende Zellen<sup>175</sup>. Im Gegensatz dazu wird es allerdings nur speziell nach einem inflammatorischen Stimulus, z.B. durch TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , LPS oder *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1), oder infolge von Redoxstress über einen nicht-klassischen Weg hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, T-Zellen oder bestimmten parenchymalen Zellen sekretiert<sup>174,176,177</sup>. Eine Beteiligung des Golgi-assoziierten Proteins p115 an diesem Sekretionsprozess konnte kürzlich nachgewiesen werden<sup>178</sup>. Die Sezernierung des meist präformierten MIFs induziert während der Immunabwehr die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL-8 (IL-8) und IL-1 und stimuliert deren Phagozytose aus den Makrophagen in autokriner und parakriner Weise<sup>179</sup>. Aufgrund seiner Kollokalisierung mit dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH) und mit Thyrotropin (TSH) in sekretorischen Vesikeln und seiner Sekretion nach LPS-Stimulation, kann MIF auch als Hormon mit neuroendokrinen Funktionen verstanden werden, das nach infektiösem Stimulus oder Stresseinwirkung aus der Hypophyse in die Blutbahn ausgeschüttet wird<sup>127,180</sup>.

### *MIF-REZEPTOREN*

Bislang wurden drei Rezeptoren für MIF entdeckt, von denen einer ausschließlich mit MIF interagiert, während die beiden anderen eher promiske Bindungseigenschaften aufweisen. Die an der Zelloberfläche exprimierte Form von CD74/Ii, die als ein nur einmal die Membran durchspannendes Typ II-Membranprotein und auch als invariante Kette des MHC-Klasse II-Komplexes (*major histocompatibility complex*) oder MHC II-Chaperon<sup>181-183</sup> bezeichnet wird, wurde als hoch-affiner Rezeptor für MIF auf MHC-Klasse II-positiven Zellen, u.a. Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten, entdeckt<sup>118,184</sup>. Erst kürzlich wurde MIF auch als Ligand der beiden G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4 entdeckt<sup>112</sup>. In Abhängigkeit des jeweiligen Zellursprungs und seines Gesundheitszustands werden durch MIF vermittelte Signaltransduktionswege über seine Rezeptoren CXCR2, CXCR4 und/oder CD74 gesteuert. Näheres zu den hier genannten MIF-Rezeptoren und den Signaltransduktionswegen soll später weiter erläutert werden.

### 1.2.1.3 D-Dopachromtautomerase (D-DT)

Bei D-DT (D-Dopachromtautomerase) handelt es sich wie auch bei MIF um ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 12 kDa. Sein Name resultiert aus seiner enzymatischen Aktivität und geht auf die Jahre 1991 und 1993 zurück. 1991 beschäftigten sich Aroca *et al.* mit der Spezifität der Dopachromtautomerase und analysierten dessen aktives Zentrum<sup>185</sup>. 1993 wurde D-DT von Odh *et al.* als ein Enzym im Zytoplasma humaner Melanomzellen und humaner und Ratten-Leber entdeckt, das D-Dopachrom bei gleichzeitiger Decarboxylierung zu 5,6-Dihydroxyindol (DHI) tautomerisierte<sup>186</sup>. Eine erste Klonierung und Sequenzierung von Ratten-D-DT wurde 1995 und von humanem D-DT erst 1998 erfolgreich durchgeführt<sup>187,188</sup>. Das native Molekulargewicht von Ratten-D-DT wurde anhand der Aufreinigung über Sephadex G-100 Säulenchromatographie auf ca. 37 kDa geschätzt. Da das anhand der cDNA prognostizierte Molekulargewicht von D-DT aufgrund seiner 117 Aminosäuren jedoch bei 12,5 kDa lag, gingen Yoshido *et al.* davon aus, dass D-DT in seiner nativen Form als Homotrimer vorlag. Aufgrund der Ergebnisse aus NMR-Studien hat D-DT einen hydrophoben Kern, in dem Methyl- und aromatische Gruppen eng beieinander liegen, und beinhaltet laut einfacher Integration eines eindimensionalen NMR-Spektrums 16%  $\alpha$ -helices, 68%  $\beta$ -Faltblatt und 16% *random coil*. Wegen dieses hohen Anteils an  $\beta$ -Faltblattstrukturen liegt die Denaturierungstemperatur von D-DT mit 90 bis 100 °C äußerst hoch<sup>189</sup>. Im Jahre 1999 gelang es Sugimoto *et al.* die Kristallstruktur von D-DT aufzuklären<sup>138</sup>. Auch diese deutete auf die Bildung eines Homotrimers hin, dessen Untereinheiten über  $\beta$ -Faltblätter miteinander in Kontakt stehen. Hinsichtlich seiner Topologie und Trimerbildung ähnelt D-DT derjenigen von humanem MIF<sup>138</sup>. Zwischen D-DT und MIF besteht auch eine Sequenzhomologie. Ihre Intron-Exon-Struktur und die kodierenden Regionen sind untereinander hoch konserviert, beide Gene sind sowohl auf dem humanen Chromosom 22, als auch auf dem murinen Chromosom 10 in geringer Entfernung (0,1 kb) voneinander lokalisiert<sup>190</sup> und beide sind von Genen für die Matrix-Metalloproteinase 11 (MMP11) und zwei zur Theta-Klasse gehörenden Glutathion-S-Transferasen (GSST1, GSST2) umgeben (Abbildung 10). Aus diesem Grund wird vermutet, dass diese Gencluster während der Evolution aus einer Duplikation der Region entstanden sind<sup>191,192</sup>. Krystallisierungs- und Röntgenstrukturanalysen verdeutlichten eine Ähnlichkeit zwischen MIF und D-DT bezüglich ihrer 3D-Struktur und lieferten erste Hinweise auf eine pathophysiologische Bedeutung von D-DT in inflammatorischen und immunologischen Vorgängen<sup>138,193</sup>.



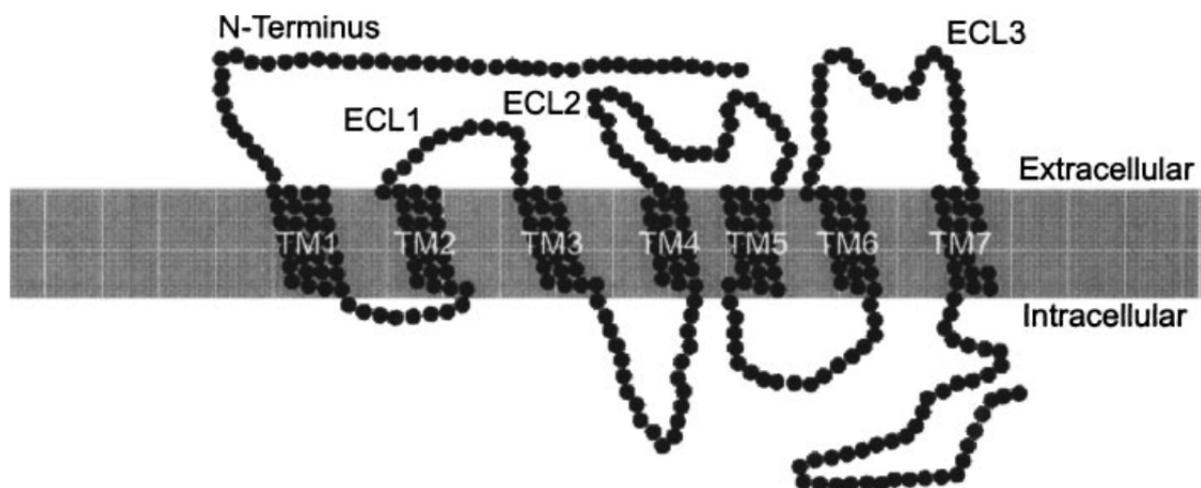
**Abbildung 10: Lokalisierung von D-DT und MIF im Humangenom und Homologie der Proteinsequenz zwischen D-DT und MIF.** Das schematische Diagramm veranschaulicht die Lage des humanen MIF- und D-DT-Gens zwischen den Genen der Matrix-Metalloproteinase 11 und den beiden Genen der Glutathione-S-Transferasen. Die Abbildung wurde entnommen aus <sup>192</sup>.

Eine tatsächliche Bedeutung für den Verlauf von Krankheiten konnte für D-DT erstmals von Coleman *et al.* 2008 nachgewiesen werden, als gezeigt werden konnte, dass die Expression der proangiogenen Faktoren CXCL8 und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) in NSCLC (*non-small cell lung carcinoma*) Zellen von beiden Zytokinen MIF und D-DT abhängig war. Zusätzlich waren die durch Zellüberstände ohne MIF oder/und D-DT induzierte HUVEC-Migration und die Ausbildung von Verbindungen zwischen den Endothelialzellen (*tube formation*) reduziert gegenüber denjenigen mit MIF und/oder D-DT <sup>194</sup>. In den nachfolgenden Jahren konnte D-DT auch eine protektive Rolle bei Leberschäden von Ratten infolge einer Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung <sup>195</sup> und eine prokarzinogene Rolle über die Förderung der COX-2-Expression bei Darmkrebs zugeschrieben werden <sup>196</sup>. Im Rahmen einer funktionellen Charakterisierung von humanem und murinem D-DT war es erst kürzlich möglich, anhand der Ergebnisse einiger Studien die Hypothese zu untermauern, dass es sich bei D-DT um einen MIF-ähnlichen Liganden handelt. Diverse Studien von Merk *et al.* veranschaulichten eine hochaffine Bindung von D-DT an den MIF-Rezeptor CD74 und an das intrazelluläre Protein JAB1, das auch ein Bindungspartner von MIF ist. Außerdem konnte D-DT mittels Western Blot Analyse analog zu MIF in Niere, Leber, Milz, Lunge und im Darm von C57Bl/6-Mäusen detektiert werden. Über seine Bindung an CD74 induziert D-DT in Anwesenheit seines Korezeptors CD44 die Phosphorylierung von ERK1/2 und initiiert somit den ERK-MAPK-Signaltransduktionsweg <sup>192</sup>. Eine Beteiligung des MIF-Rezeptors CD74 an der D-DT-induzierten JNK-Aktivierung konnte auch von Coleman *et al.* bereits gezeigt werden <sup>194</sup>. Auch kann D-DT die durch MCP-1-induzierte Makrophagenmigration im Sinne einer heterologen Desensitierung inhibieren und zeigt eine ähnliche negativ-regulative Wirkung auf die durch Glucocorticoide-induzierte Immunsuppression wie MIF. Stimulation mit LPS bewirkt außer der Produktion von MIF auch die von D-DT und führt ebenfalls zur

Auslösung einer Lethalendotoxämie, der durch Immunneutralisierung mit spezifischen anti-D-DT-Antikörpern, die MIF nicht erkennen, entgegengewirkt werden kann. Äquivalent zum Anstieg der MIF-Expression in septischen Patienten oder Krebspatienten (Eierstockkrebs) konnten auch erhöhte D-DT-Konzentrationen gemessen werden<sup>192</sup>. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Funktionen von D-DT in vielerlei Hinsicht mit denjenigen von MIF übereinzustimmen scheinen oder aber ähnlich sind, wobei es auch spezifische funktionelle Unterschiede zu geben scheint (Dissertation von W. Schulte, RWTH Aachen, 2011). Auf Grundlage dieser Erkenntnis und auf derer weiterer Forschungsstudien bieten D-DT und MIF möglicherweise zukünftig interessante Angriffspunkte für die Entwicklung medizinischer Therapeutika zur Behandlung vieler durch MIF- und D-DT-induzierter akuter und chronischer Krankheiten.

### 1.3 Chemokinrezeptoren

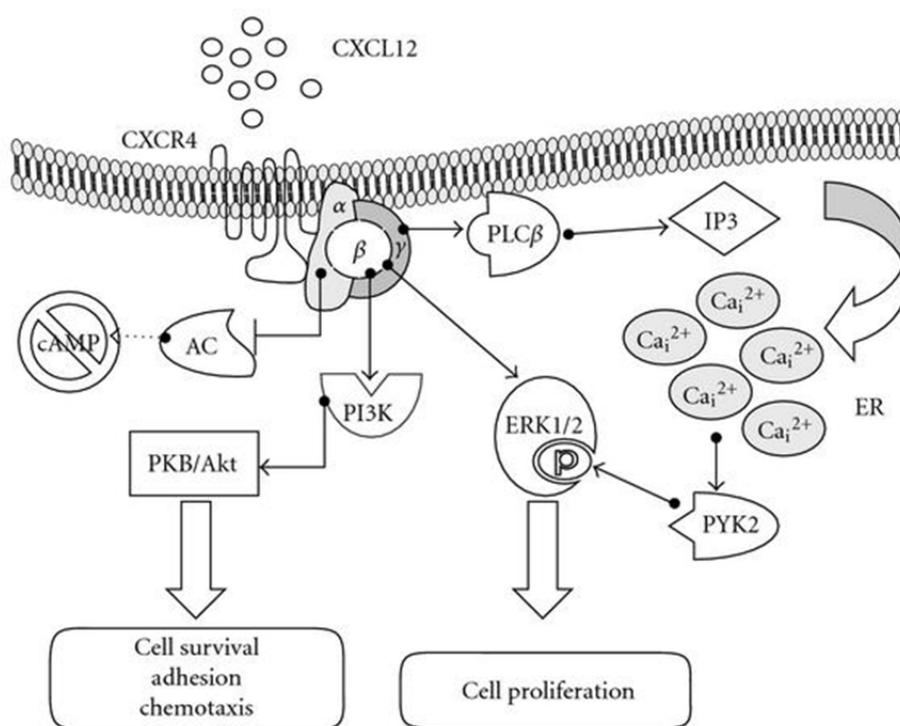
Chemokinrezeptoren werden gemäß der Untergruppe der an sie bindenden Chemokine als CR, CCR, CXCR, CX<sub>3</sub>CR (C-, CC-, CXC- oder CX<sub>3</sub>CR-Chemokinrezeptor) bezeichnet. Strukturell sind alle Chemokinrezeptoren Sieben-Transmembran-Helix-Rezeptoren (7TMR) und werden entsprechend ihrer Funktion zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) gezählt<sup>104,108</sup>. Die CLF-Chemokine bilden eine Besonderheit, da ihre Bezeichnung keinen Rückschluss auf ihre Rezeptoren zulässt. Bekannt ist jedoch, dass einige CLF-Chemokine an bestimmte CC- oder CXC-Rezeptoren binden können. Die Topologie eines typischen Chemokinrezeptors veranschaulicht Abbildung 11.



**Abbildung 11: Topologie eines typischen Chemokinrezeptors.** ECL: extracellulärer loop; TM: Transmembrandomäne. Entnommen aus<sup>197</sup>.

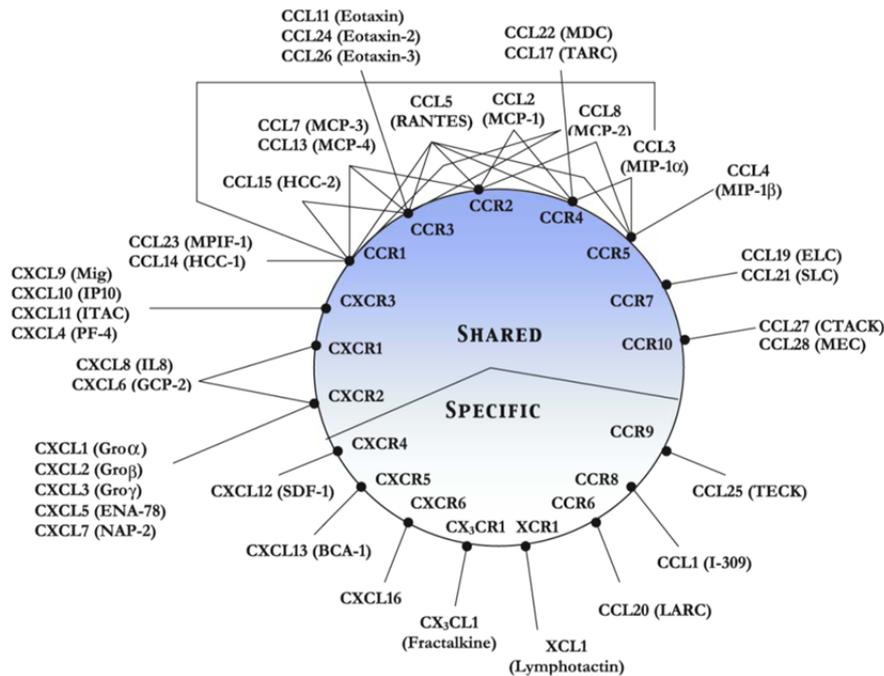
Zur Initiierung einer Signaltransduktionskaskade nach Aktivierung von Chemokinrezeptoren infolge einer Ligandenbindung erfolgt ein Austausch des Guanosindiphosphats (GDP) gegen ein Guanosintriphosphat (GTP) an der gebundenen  $\alpha$ -Untereinheit der an den Rezeptor gekoppelten G-Proteine. Neben der  $\alpha$ -Untereinheit bestehen heterotrimere G-Proteine noch aus einer  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit, die von der  $\alpha$ -Untereinheit nach deren Aktivierung dissoziieren. Obwohl es von den einzelnen Untereinheiten wiederum verschiedene Isoformen u.a.  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_s$  gibt, so binden die bisher bekannten Chemokinrezeptoren nahezu

ausschließlich an heterotrimere  $G_{\alpha i}$ -Proteine<sup>198</sup>. Diese G-Proteine bewirken eine Hemmung des Enzyms Adenylatzyklase, was wiederum eine Hemmung der cAMP-Bildung zur Folge hat. Die von der  $\alpha$ -Untereinheit dissoziierten  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten induzieren eine Öffnung der  $K^+$ -Kanäle bei gleichzeitiger Schließung der  $Ca^{2+}$ -Kanäle und bewirken die Aktivierung der Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) und der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), wodurch verschiedenste Signalkaskaden u.a. der MAPK/ERK-Signalweg oder auch der PLC $\beta$ /IP $_3$ /Ca $^{2+}$ -Signalweg aktiviert werden können<sup>197,199</sup>. Abbildung 12 zeigt exemplarisch die Initiierung verschiedener Signalkaskaden nach Bindung von CXCL12 an seinen Chemokinrezeptor CXCR4<sup>200</sup>.



**Abbildung 12: Induktion von Signaltransduktionswegen nach Bindung eines Chemokins an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor am Beispiel der Bindung von CXCL12 an CXCR4.** Die Bindung von CXCL12 an seinen GPCR CXCR4 bewirkt die Aktivierung des Rezeptors, wodurch an der  $\alpha$ -Untereinheit der  $G_i$ -Proteine ein Austausch des gebundenen GDPs zu GTP erfolgt. Durch Konformationsänderungen in den  $G\alpha$ -Austauschregionen (I, II, III) wird die aktive  $\alpha$ -Konformation erreicht, was in der Dissoziation des  $G\alpha$ - $G\beta\gamma$ -Komplexes und der Aktivierung verschiedener paralleler Signalwege resultiert. Durch Induktion der Signalkaskaden wird im Falle der Bindung von CXCL12 an CXCR4 Tumorzellwachstum, Zellmigration oder *survival* der Zelle gesteuert. AC, Adenylatzyklase; ER, endoplasmatisches Retikulum; PLC, Phospholipase C; PI3K, Phosphoinositid-3-kinase; PKB/Akt, Proteinkinase B; PKC, Proteinkinase C; PYK2, prolinreiche Tyrosinkinase 2; ERK1/2, *extracellular regulated kinase*. Entnommen aus<sup>200</sup>.

Dem Chemokin-Chemokinrezeptor-Bindungssystem obliegt eine gewisse Redundanz und Komplexität, die sich dadurch äußert, dass es nicht immer hochselektiv einen Liganden für einen bestimmten Chemokinrezeptor gibt, sondern dass es vielmehr sowohl auf Rezeptor-, als auch auf Ligandenseite neben der „monogamen“ hochspezifischen Chemokin/Rezeptor-Bindung auch eine Promiskuität zwischen verschiedenen Liganden und einem Rezeptor, als auch *vice versa* geben kann (Abbildung 13)<sup>104,201-203</sup>.



**Abbildung 13: Komplexität bei gleichzeitiger Spezifität im Chemokin/Chemokinrezeptor-Interaktionssystem.** Unter den Chemokinrezeptoren finden sich sowohl solche, die hochspezifisch an nur einen Liganden binden (unterer Halbkreis, *specific*), als auch solche, die mit mehreren Liganden interagieren können. Eine ähnliche Redundanz besteht auch auf Seiten der Liganden, so dass auch ein Ligand an verschiedene Chemokinrezeptoren binden kann (oberer Halbkreis, *shared*). In der Abbildung sind die Rezeptoren im Inneren des Kreises vermerkt, ihre Liganden außerhalb. Die Abbildung wurde entnommen aus <sup>202</sup>.

#### 1.4 Major histocompatibility complex (MHC) class II invariant chain (CD74)

Bei CD74 handelt es sich im Gegensatz zu den anderen bekannten MIF-Rezeptoren nicht um einen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptor, sondern vielmehr um ein Typ II-Membranprotein mit nur einer Transmembrandomäne. CD74, das auch als invariante Kette des MHC Klasse II-Komplexes bezeichnet wird, umfasst je nach Spezies und in Abhängigkeit seines Spleißing- und Glykosylierungsgrads zwischen 31 und 45 kDa. In Abhängigkeit der Initiation der Translation und des Spleißingvorgangs der Transkriptionsprodukte entstehen verschiedene Isoformen von CD74, die in der Maus als p31 und p41 und im Menschen als p33, p35, p41 und p43 bezeichnet werden.

CD74 wird auf ruhenden und aktivierten B-Zellen, Monozyten, Langerhans'schen Zellen und auf dendritischen Zellen exprimiert <sup>204</sup>. Eine maximale Expression von CD74 in nicht-zirkulierenden peripheren B-Lymphozyten, sowie ein Rückgang des CD74-Niveaus bei Reifung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen konnte bereits von Rahmsdorf *et al.* im Jahre 1983 nachgewiesen werden. Auch war es möglich, eine selektive Induktion der CD74-Synthese in allen Ii-negativen Zelllinien durch Behandlung der Zellen mit Replikationsinhibitoren anzuregen <sup>205</sup>. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der Cytofluorometrie konnte von Koch *et al.* die Expression von CD74 (*MHC class II-associated invariant chain*, Ii) auf der Oberfläche von humanen B-Lymphozyten durch Verwendung von murinen Antikörpern gegen die extrazytoplasmatische Domäne humaner Ii erneut

veranschaulicht werden. Zusätzlich wurde die Expression von CD74 auf Lymphomzellen durch diese Techniken nachgewiesen<sup>206</sup>.

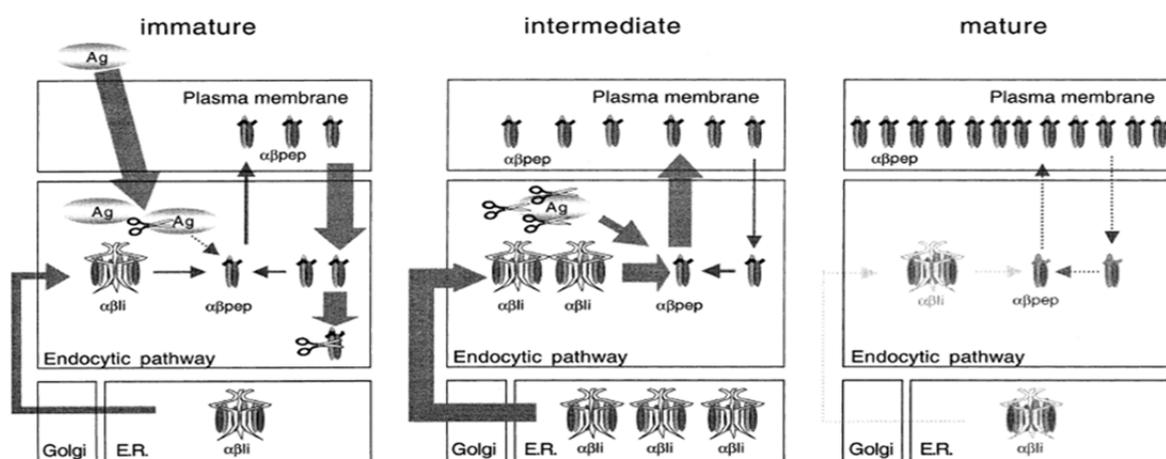
### 1.4.1 *MHC class II*-Antigen-Prozessierung und Präsentation

Dass CD74 entscheidend am Vorgang der *MHC class II*-Antigen-Prozessierung und an der Präsentation der Antigene auf der Zelloberfläche beteiligt ist, wurde von Koch *et al.* bereits im Jahre 1989 aufgedeckt<sup>207</sup>. In den Jahren 1985 bis 1991 blieb der genaue Mechanismus der Beteiligung von Ii an der Antigen-Präsentation jedoch weitgehend ungeklärt. Eine mögliche molekulare Aufgabe des Ii bezüglich des intrazellulären Transports, der Fertigung und der Sortierung der Klasse II-Moleküle wurde lange Zeit vermutet<sup>207-212</sup>. Erst im Jahre 1991 gelang die grobe Aufklärung des Mechanismus<sup>206</sup>, die in den folgenden Jahren verfeinert wurde<sup>213</sup>. MHC-Klasse II-Moleküle werden mit Ii koexprimiert und fügen sich kurz nach Eintritt in die ER-Membran zusammen<sup>214</sup>. Während des intrazellulären Transports durch ER und Golgi-Apparat kommt es zu einer Modifizierung der Polypeptide und ihrer Kohlenhydrate (N-Glykosylierung). Nach Verlassen des Golgi-Apparats werden die Komplexe aus Ii und Klasse II-Molekül in den endosomalen Weg einsortiert<sup>215</sup>. 1990 fanden Bakke *et al.* eine Signalsequenz am N-Terminus der Ii, die für den Transport der Komplexe und neugebildeter MHC-Klasse II-Moleküle in die Endosomen verantwortlich war<sup>213,216,217</sup> und konnten somit Vermutungen von Long *et al.* und Koch *et al.* aus dem Jahre 1989 bestätigen<sup>207,209</sup>. Im Unterschied zu MHC-Klasse I-Molekülen, die ihre immunogenen Peptide bereits im ER binden, schienen MHC-Klasse II-Moleküle ihre Peptide erst später im Transportweg zu binden<sup>218</sup>. Dies unterstützte die Idee, dass die Bindung des dritten Glykoproteins Ii im ER, eine vorzeitige Bindung von Peptiden an die MHC-Klasse II-Moleküle verhinderte<sup>218</sup>. Zusätzlich konnte von Long *et al.* im Jahre 1992 und von Germain im Jahre 1993 festgestellt werden, dass zur Prozessierung der Antigene eine Freisetzung dieser in saure endosomale oder lysosomale Kompartimente notwendig war, wo die Antigene entfaltet und in Peptide gespalten wurden, bevor sie an die MHC Klasse II-Moleküle binden<sup>219,220</sup>. Erst nach proteolytischer Abspaltung und Degradation von CD74 in einem Kompartiment hinter dem Golgi<sup>221</sup>, vermutlich in MIICs (*MHC class II molecule-containing cytoplasmic vacuoles*)<sup>222</sup>, können die MHC Klasse II- $\alpha\beta$ -Heterodimere mit Antigenen beladen werden und weiter zur Zelloberfläche transportiert werden. Dort präsentieren sie die Antigene gegenüber CD4+ T Zellen (T-Helfer-Zellen)<sup>213</sup>.

Der Frage, ob zumindest ein Teil von CD74 nach seiner Dissoziation von den MHC Klasse II-Molekülen selbst auch auf der Zelloberfläche erscheint, wurde von Wraight *et al.* im Jahre 1990 nachgegangen. In Studien mit drei monoklonalen Antikörpern, die eine bestimmte extrazytoplasmatische Domäne, die in allen Formen von CD74 vorhanden ist, erkennen, konnte gezeigt werden, dass das äußerste C-terminale Ende von CD74 auf der Zelloberfläche intakter Zellen erscheint<sup>223</sup>.

Im Jahre 1993 wurde von Romagnoli *et al.* ein Zusammenhang zwischen der Expression der Ii und dem Transport der Komplexe aus Ii und MHC Klasse II-Molekülen herausgestellt. Nach initialem Transport des Ii/MHC II-Komplexes zu den frühen Endosomen erfolgte bei niedrigen Expressionsraten von CD74 oder nach Entfernen der hochkonservierten Region im zytoplasmatischen Schwanz von CD74 eine Weiterleitung der Komplexe zu den späten

Endosomen und Prälysosomen. Auch MHC Klasse II-Moleküle nach proteolytischer Abspaltung von Ii konnten dann hauptsächlich in diesen Kompartimenten lokalisiert werden. Bei hoher Expressionsrate von CD74 hingegen kam es zu einer Verzögerung der Weiterleitung zu den späten endozytotischen Kompartimenten, sodass die Komplexe aus Ii und MHC Klasse II-Molekülen in den frühen Endosomen akkumulierten. Dies lässt sich vermutlich auf die unerwartete Fähigkeit von Ii, die Struktur und Funktion der frühen Endosomen modifizieren zu können, zurückführen. Eine mögliche Funktion dieser Fähigkeit könnte in der Regulierung des *processing pathway* bestehen<sup>224</sup>. Abbildung 14 veranschaulicht exemplarisch das MHC II-*trafficking* und die Funktion von Ii in sich entwickelnden murinen dendritischen Zellen.

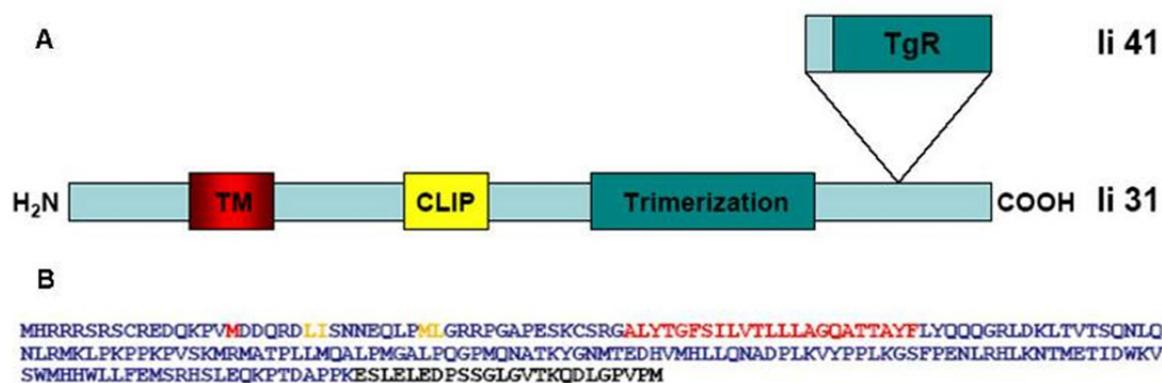


**Abbildung 14: Vereinfachtes Modell des MHC II-*trafficking* in sich entwickelnden murinen dendritischen Zellen (DC).** Drei verschiedene Reifungsstadien der DCs sind dargestellt. Unreife (*immature*) DCs können durch inflammatorische Stimuli aktiviert werden und nach wenigen Stunden zu „*intermediate*“ DCs werden, die dann innerhalb von 24 h zu reifen (*mature*) DCs differenzieren. Die Pfeilweite symbolisiert die Menge an sich bewegenden Molekülen (MHC II oder Antigen). Blassere Symbole im Bereich des reifen Stadiums (rechts) stehen für die Reduzierung der MHC II-Synthese und des -*trafficking*. Ag, Antigen; αβpep, mit Peptid beladene MHC II-Komplexe<sup>225</sup>.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass CD74 ursprünglich als invariante Kette des MHC-Klasse II-Komplexes mit der Funktion der Verhinderung einer vorzeitigen Beladung der MHC II-Moleküle mit antigenen Peptiden beschrieben wurde<sup>225</sup>. Heute ist bekannt, dass es sich bei Ii um die intrazelluläre Form von CD74 handelt, die wichtige Aufgaben in der Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen übernimmt, während CD74 die membranständige Form der Ii meint, von der nur eine geringe Prozentzahl an die Plasmamembran transportiert wird, wahrscheinlich nach Modifizierung durch Chondroitinsulfat<sup>226</sup>. CD74 befindet sich in MHC Klasse II-positiven Zellen nach seiner Expression häufig an der Zelloberfläche. In MHC Klasse II-negativen Zellen inklusive stromalen und epithelialen Zelltypen hingegen kann es infolge eines inflammatorischen Stimulus an die Zelloberfläche gelangen<sup>183,227</sup>. Während Ii mit MHC-Klasse II-Molekülen während seines Transports durch das Endoplasmatische Retikulum und die endolysosomalen Kompartimente assoziiert und als Klasse II-Chaperon zur Kontrolle der Beladung antigener Peptide fungiert, wurde für die membranständige Form eine Funktion in der Signaltransduktion, worauf im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll, nachgewiesen.

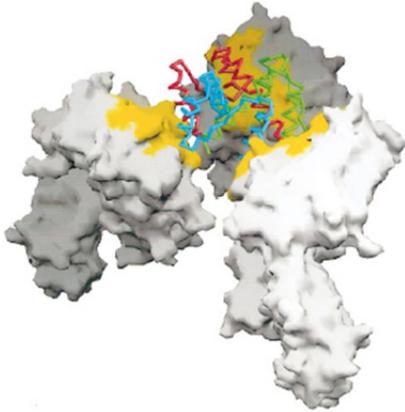
### 1.4.2 Struktur und Signaltransduktionsmechanismen

Die Aufklärung der Struktur von CD74 geht auf das Jahr 1998 zurück, als es Jasanoff *et al.* gelang Struktur und Bedeutung der verschiedenen Domänen herauszufinden<sup>84</sup>. Die Region zwischen den Aminosäuren 81-104 wurde als *class II-associated invariant chain peptide segment* (CLIP) bezeichnet und ist die Bindestelle für HLA-DR-Moleküle. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die CLIP-Region zur Förderung von Faltung und Lokalisierung der MHC-Klasse II-Heterodimere unerlässlich ist<sup>228,229</sup>. Ii 118-216 liegt C-terminal zur CLIP-Region und vermittelt die Trimerisierung der Ektodomäne von Ii und stört die DM/Klasse II-Bindung. Durch eine Sequenz in der Nähe des N-Terminus (Ii 32-56) ist CD74 in der Membran verankert. Drei weitere Domänen liegen im luminalen Teil von CD74 (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Struktur der MHC class II-associated invariant chain/ CD74.** A CD74 ist ein integrales Membranprotein vom Typ II. Es hat einen kurzen N-terminalen zytoplasmatischen Schwanz (30 Aminosäuren). Die sich anschließende Transmembrandomäne (TM) umfasst nur 25 Aminosäuren und geht zum C-Terminus hin in eine luminaire Region über (Ii 81-104). Diese Region wird auch als CLIP-Region (*class II associated invariant chain peptide domain*) bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle für die Trimerisierung (*trimerization*). Ii existiert in zwei Isoformen, die aufgrund von unterschiedlichem *Splicing* der Transkriptionsprodukte entstehen, p31 und p41 in Maus<sup>230</sup>. B Aminosäuresequenz des humanen CD74. Im zytoplasmatischen Schwanz von CD74 befinden sich zwei Internalisierungssignale, das Leucin-Isoleucin- und das Methionin-Leucin-Motiv, die beide unabhängig voneinander das *endosomal sorting* und eine effiziente Internalisierung vermitteln (gelbe Buchstaben). Diese befinden sich N-terminal zur Transmembrandomäne (rot).

In NMR-Studien konnte die dreidimensionale Struktur von Ii 118-192 aufgeschlüsselt werden und festgestellt werden, dass eine gleichzeitige Interaktion mit drei MHC-Klasse II-Molekülen möglich ist (Abbildung 16)<sup>84</sup>.



**Abbildung 16: Hypothetisches Modell für die Interaktionen zwischen der Domäne Ii 118-192 und drei MHC-Klasse II-Molekülen.** In der Darstellung sind die nahe an der Membran gelegenen Kettenenden der Ii und der Klasse II-Moleküle so ausgerichtet, dass sie nach unten zeigen. Die gelben Flächen auf den drei MHC-Klasse II-Molekülen zeigen die Kontaktflächen mit der Domäne Ii 118-192. Abbildung aus <sup>84</sup>.

Als hochaffiner Bindungspartner und Rezeptor des Zytokins MIF ist CD74 seit 2003 bekannt. Durch Bindung von MIF an die extrazelluläre Domäne von CD74 an der Plasmamembran wird die ERK1/2-MAPK-Kaskade aktiviert und somit die Zellproliferation und PGE2-Produktion induziert <sup>118</sup>. Für die Aktivierung des ERK1/2-MAPK-Signalwegs ist zusätzlich zur Bindung von MIF an CD74 die Rekrutierung von CD44 und einer Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, Src-Kinase, für die Signalweiterleitung nötig, da CD74 selbst über keine derartige Domäne verfügt <sup>118,231</sup>. In Studien zu *Helicobacter pylori* konnten Beswick *et al.* in den Jahren 2005 und 2006 herausfinden, dass CD74 auf Epithelzellen des Magens (GECs, *gastric epithelial cells*) exprimiert wird, eine Interaktion von *H.pylori* mit CD74 direkt möglich ist und dass es zu einer Wechselbeziehung zwischen CD74-Expression und IL-8-Produktion in Folge der Immunantwort eines Wirts auf eine Infektion mit *H.pylori* kommt. Bei der Suche nach dem bakteriellen Protein, das mit CD74 interagiert, wurde die Urease B identifiziert und außerdem gezeigt, dass über die Interaktion zwischen Urease B und CD74 außer der IL-8 Produktion eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B induziert wird <sup>232-234</sup>. Becker-Herman *et al.* und Starlets *et al.* konnten eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B bestätigen. In ihren Studien zeigte sich, dass CD74 die B-Zelldifferenzierung und ihr *survival* reguliert. Dies geschieht durch Induktion eines Signalweges, der zur Aktivierung der Transkription von Genen führt, die durch das NF- $\kappa$ B p65/RelA-Homodimer und seinen Coaktivator TAFII105 induziert wird <sup>235,236</sup>. Zusätzlich zur Aktivierung von *rapid and sustained* ERK1/2-Signaling konnten in den letzten Jahren weitere über die MIF/CD74-Achse initiierte Funktionen u.a. in der Aktivierung des PI3K/AKT-Signaling und des JNK-Signaling, in der Zellproliferation, sowie der Regulation anti-apoptotischer Funktionen durch Bindung von MIF an CD74 nachgewiesen werden <sup>231,237-241</sup>. Eine Zusammenfassung aller bis 2011 bekannten Funktionen für CD74 zeigt Tabelle 1. Erst kürzlich wurde CD74 als sich abzeichnendes neues therapeutisches Zielprotein (*target*) zur Behandlung von Krebserkrankungen und Autoimmunkrankheiten beschrieben <sup>181</sup>.

**Tabelle 1: Zusammenfassung der bekannten Funktionen von CD74 bis 2011.** Modifiziert und erweitert nach

225

Ii functions	Reference
Chaperone for MHC II $\alpha$ and $\beta$ chains	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002
Inhibition for peptide binding to MHC II	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002
Egress of MHC II from the ER	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002
Targeting to the endocytic pathway of MHC II	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002
Endocytosis of $\alpha\beta$ Ii complexes	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002
Induction of large vacuoles/MVB	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002
Modulation of proteolytic enzymes	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002
Retention of $\alpha\beta$ Ii and $\alpha\beta$ Ii fragments	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002
Protection of H2-DM from degradation	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002
Promoting differentiation of immature B cells	Stumptner-Cuvelette and Benaroch, <i>Biochim Biophys Acta</i> , 2002; Matza <i>et al.</i> , <i>Proc Natl Acad Sci</i> , 2002
Antigen presentation	Wu and Gorski, <i>Mol Immunol</i> , 1996
Regulated intramembrane proteolysis	Starlets <i>et al.</i> , <i>Blood</i> , 2006
Modulation of the activity of several cathepsins by direct binding	Mihelic <i>et al.</i> , <i>J Biol Chem</i> , 2008
Receptor complex formation with CD44 for AKT, Syk and NF $\kappa$ B signaling	Naujokas <i>et al.</i> , <i>Cell</i> , 1993; Gore <i>et al.</i> , <i>J Biol Chem</i> , 2008
Initiation of NF $\kappa$ B activation, proliferation and survival via MIF binding	Matza <i>et al.</i> , <i>J Biol Chem</i> , 2001
Reduction of dendritic cell motility	Vascotto <i>et al.</i> , <i>J Cell Biol</i> , 2007
Key molecule in thymic selection	Borghese and Clanchy, <i>Expert Opinion On Therapeutic Targets</i> , 2011
Increased expression in atherosclerosis	Martin-Ventura <i>et al.</i> , <i>Cardiovasc Res</i> , 2009
Increased expression in systemic lupus erythematosus (SLE)-affected mice	Lapter <i>et al.</i> , <i>Immunology</i> , 2010
Upregulation in Alzheimers disease	Yoshiyama <i>et al.</i> , <i>Neurosci Lett</i> , 2000; Bryan <i>et al.</i> , <i>Mol Neurodegener</i> , 2008
Increased expression in gastric epithelium in association with <i>H.pylori</i> infection	Beswick <i>et al.</i> , <i>J Immunol</i> , 2005
Link to several forms of cancer	Borghese and Clanchy, <i>Expert Opin On Therapeutic Targets</i> , 2011
Increased expression in non-small cell lung cancer, renal and gastric cancers	McClelland <i>et al.</i> , <i>Am J Pathol</i> , 2009; Liu <i>et al.</i> , <i>J Immunol</i> , 2008
Potential as a therapeutic target, e.g. Milatuzumab	Stein <i>et al.</i> , <i>Clin Cancer Res</i> , 2007; Berkova <i>et al.</i> , <i>Expert Opin Investig Drugs</i> , 2011; Mark <i>et al.</i> , <i>Expert Opin Investig Drugs</i> , 2009

## 1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie eine Sieben-Transmembran-Helixdomäne besitzen und über die an die Rezeptoren gekoppelten G-Proteine Signaltransduktionskaskaden infolge einer Ligandenbindung aktivieren können, um biologische Funktionen zu initiieren. Bei zwei der drei hier aufgeführten GPCRs handelt es sich um die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR2, für die MIF als nicht-kognitiver Ligand entdeckt wurde<sup>112</sup>. Der dritte GPCR, CXCR7, gilt derzeit noch nicht als MIF-Rezeptor, könnte jedoch aufgrund seiner Heteromerisierung mit dem MIF-Rezeptor CXCR4 als solcher in Frage kommen. Für CXCR7 ist derzeit noch völlig unklar, ob über ihn nach Ligandenbindung überhaupt *Signaling* stattfindet.

### 1.5.1 CXCR4

Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist ein 41 kDa großer G-Protein-gekoppelter Rezeptor. CXCR4 wird ubiquitär auf nahezu allen Zelltypen exprimiert, wohingegen sich das meiste auf Stamm- und Tumorzellen finden lässt<sup>104,242,243</sup>. Für CXCR4-defiziente Mäuse konnte eine embryonale Lethalität nachgewiesen werden, bei der die Mausembryonen bereits im Uterus versterben<sup>244</sup>. Außerdem bewirkte der *knockout* von CXCR4 Defekte im haematopoetischen System und im zentralen Nervensystem der Mäuse<sup>245</sup>. Bislang gilt CXCR4 als einziger Rezeptor des Chemokins CXCL12 (*stromal-cell-derived factor-1 $\alpha$* , SDF-1 $\alpha$ ), wobei kürzlich auch CXCR7 als möglicher alternativer Rezeptor beschrieben wurde<sup>246</sup>. Das Dogma der monogamen CXCR4/CXCL12-Beziehung verlor zusätzlich dadurch an Bedeutung, dass auch HIV gp120 und MIF als Liganden für CXCR4 entdeckt wurden<sup>112,114,247</sup>. Aufgrund seiner Beteiligung an der HI-Viruserkrankung besteht ein großes Interesse vor allem seitens der medizinischen Forschung am Chemokinrezeptor CXCR4<sup>248,249</sup>. Durch Bindung des Virusproteins gp120 an humanes CD4 wird infolge einer Konformationsänderung die Bindung des HI-Virus (*human immunodeficiency virus*) an CXCR4 erleichtert, wodurch das Virus wiederum über Invasion der T-Lymphozyten seine Wirtszelle infizieren kann<sup>250,251</sup>. Die CXCL12/CXCR4-Achse ist in verschiedenste homeostatische und inflammatorische Zellmigrationsprozesse involviert, u.a. in die inflammatorische und atherogene T-Zell-Rekrutierung und den Integrin-abhängigen T-Zell-Arrest<sup>112,252</sup>, dem Stammzell-Homing<sup>253,254</sup> und der Krebszellmetastasierung<sup>255-259</sup>. In BRET-Studien und durch *firefly luciferase complementation*-Experimente konnte für CXCR4 sowohl eine konstitutive, als auch eine ligandenabhängige Homodimerisierung nachgewiesen werden<sup>260,261</sup>. Auch Heterodimerisierungen für CXCR4 mit anderen Chemokinrezeptoren u.a. mit CCR2<sup>262-264</sup>, CCR5<sup>265,266</sup> und erst kürzlich entdeckt auch mit CXCR7<sup>267,268</sup> sind bekannt.

### 1.5.2 CXCR2

Auch bei CXCR2 handelt es sich um einen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptor. CXCR2 ist ein für die bereits in Kapitel 1.3 beschriebene mögliche redundante Ligandenbindung typischer Rezeptor. Neben dem Liganden CXCL8 (IL-8) nach dem CXCR2 früher auch als CXCL8-Rezeptor  $\beta$  (IL8R $\beta$ ) bezeichnet wurde, sind die Chemokine CXCL1 (GRO- $\alpha$ , *growth regulated oncogene- $\alpha$* ), CXCL2 (GRO- $\beta$ ), CXCL3 (GRO- $\gamma$ ), CXCL5 (ENA-78, *epithelial cell-derived neutrophil-activating factor*), CXCL6 (GCP-2, *granulocyte chemoattractant protein-2*) und CXCL7 (NAP-2, *neutrophil-activating protein-2*) als Liganden für CXCR2 beschrieben. All diesen Chemokinen gemein ist, dass sie aufgrund des Vorhandenseins eines ELR-Motivs als ELR+ Chemokine bezeichnet werden<sup>269</sup>. Erstmals erfolgreich kloniert wurde CXCR2 im Jahre 1991 durch Homologie-Hybridisierung aus einer mit Dibutyryl-cAMP-induzierten HL-60-Zellbibliothek unter Verwendung eines der Transmembrandomäne 2 (TMD2) von Kaninchen-CXCR1 entsprechenden Oligonukleotids<sup>270</sup>. Spätere cDNAs wurden dann aus einer Neutrophilenbibliothek isoliert<sup>271</sup>. Die Klonierung von CXCR2 über CXCR1 war nur möglich, da beide Rezeptoren zu 78% in ihrer Aminosäuresequenz übereinstimmen<sup>104</sup>. Außer auf Neutrophilen und auf Monozyten/Makrophagen werden CXCR1 und CXCR2 auf Zytokin-aktivierten Eosinophilen, Basophilen, T-Lymphozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen exprimiert<sup>104</sup>. Neben einer

ligandenunabhängigen Homodimerisierung von CXCR2<sup>272,273</sup> konnte für CXCR2 auch eine Heterodimerisierung mit dem ihm sehr ähnlichen CXCR1-Rezeptor nachgewiesen werden<sup>273,274</sup>. Über die CXCL8/CXCR2-Interaktion werden verschiedene pathophysiologische Prozesse angefangen bei entzündungsbedingter Leukozytenrekrutierung über Krebszellmigration bis hin zu Angiogenese vermittelt<sup>275</sup>. Die Bindung des Chemokins MIF an CXCR2 erfolgt über das sogenannte pseudo(E)LR-Motiv, das so bezeichnet wird, da es an das ELR-Motiv der anderen an CXCR2 bindenden Chemokine erinnert, und über den N-Loop<sup>276</sup>. Über seine Interaktion mit CXCR2 und CXCR4 vermittelt MIF sowohl Monozyten-, als auch T-Zell-Arretierung auf atherogenem Endothelium, fördert die Transmigration von Leukozyten und erhöht die Bildung und Entwicklung atherosklerotischer Plaques<sup>112,114</sup>.

### 1.5.3 CXCR7

Ursprünglich als Rezeptor des vasoaktiven Intestinalpeptids (VIP)<sup>277</sup> und für die sogenannten *calcitonin gene-related peptides* beschrieben<sup>278</sup> gilt CXCR7, der auch als RDC1 bezeichnet wird, heute aufgrund der Ergebnisse phylogenetischer und chromosomaler Lokalisationsanalysen einer Vielzahl anderer GPCR als orphane G-Protein-gekoppelter Chemokinrezeptor<sup>279</sup>. Die Richtigkeit der neuen Bezeichnung und Klassifizierung des RDC1-Rezeptors wurde zusätzlich durch Studien von Balabanian *et al.* bestätigt, die auf T-Zellen eine Bindung des Chemokins CXCL12 an den Rezeptor zeigen konnten<sup>246</sup>. Eine zusätzliche Ligand/Rezeptor-Interaktion besteht auch für das Chemokin CXCL11 (I-TAC, *interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant*) und den CXCR7-Rezeptor<sup>280</sup>. Das Gen des 37,7 kDa großen CXCR7-Rezeptors ist im Humangenom zusammen mit den Genen für die Chemokinrezeptoren CXCR1, CXCR2 und CXCR4 im selben Gencluster auf Chromosom 2 lokalisiert<sup>281,282</sup>. Des Weiteren konnten für CXCR7 eine hohe Sequenzhomologie beispielsweise mit dem Chemokinrezeptor CXCR2 (43 %), sowie verschiedene Charakteristika typischer Chemokinrezeptoren u.a. eine CxNPxxY-Sequenz in der siebten Transmembrandomäne und vier Cystein-Reste im extrazellulären Segment gefunden werden<sup>283</sup>. CXCR7 wird auf der Zelloberfläche vieler Krebszelllinien (u.a. Brust-, Prostata- und Lungenkrebs), auf T- und B-Lymphozyten und aktivierten Endothelzellen exprimiert<sup>281,283,284</sup>. Während der B-Zell-Entwicklung nimmt die Expression von CXCR7 sogar zu, was auf eine regulative Rolle schließen lässt<sup>283</sup>. Rezeptor-Internalisierungsstudien zeigten eine Abnahme des CXCR7-Rezeptors auf der Plasmamembran von HEK293-Zellen nach Behandlung mit CXCL12 oder dem agonistisch auf CXCR7 wirkenden CXCR4-Inhibitor AMD3100<sup>246,285,286</sup>. Aufgrund von Modifikationen innerhalb des Bindungsmotivs für die G-Proteine kann CXCR7 vermutlich zwar seine Liganden CXCL11 und CXCL12 binden, aber keinerlei Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden induzieren. Aus diesem Grund wird CXCR7 heute auch als nicht-konventioneller Chemokinrezeptor bezeichnet und dient vermutlich als Chemokinspeicher, weil er hauptsächlich in nicht näher beschriebenen intrazellulären Kompartimenten vorzufinden ist<sup>287,288</sup>. Zu dieser Gruppe von Chemokinrezeptoren, die unfähig sind Signaltransduktionswege nach Ligandenbindung zu induzieren, wird u.a. auch der DARC-Rezeptor gezählt<sup>289</sup>. Auch medizinisch scheint CXCR7 relevant zu sein, denn es konnte bislang eine von ihm ausgehende Förderung von Tumorwachstum und Metastasierung im Tiermodell<sup>290,291</sup>, eine Bedeutung als Korezeptor für

einige HI-Virusstämme<sup>292-294</sup>, sowie eine regulative Rolle bei der CXCR4-abhängigen Aktivierung der Integrine und der Adhäsion von T-Lymphozyten auf Endothelzellen nachgewiesen werden<sup>284</sup>. Auch der Chemokinrezeptor CXCR7 ist zu einer Heterodimerisierung fähig. Sierro *et al.* konnte nach CXCR4/CXCR7-Dimerisierung eine Erhöhung des Calciumspiegels in HEK293-Zellen feststellen<sup>295</sup>. Abschließend kann festgehalten werden, dass der Chemokinrezeptor CXCR7 aufgrund seiner vielfältigen biologischen Funktionen u.a. in der B-Zell-Entwicklung, der Tumorgenese, der HIV-Infektion, Adhäsion und Atherosklerose zukünftig als wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapien auf dem interdisziplinären Gebiet zwischen Inflammation und Krebs dienen könnte.

## 1.6 heteromere Rezeptorkomplexe

### 1.6.1 CXCR2/CD74

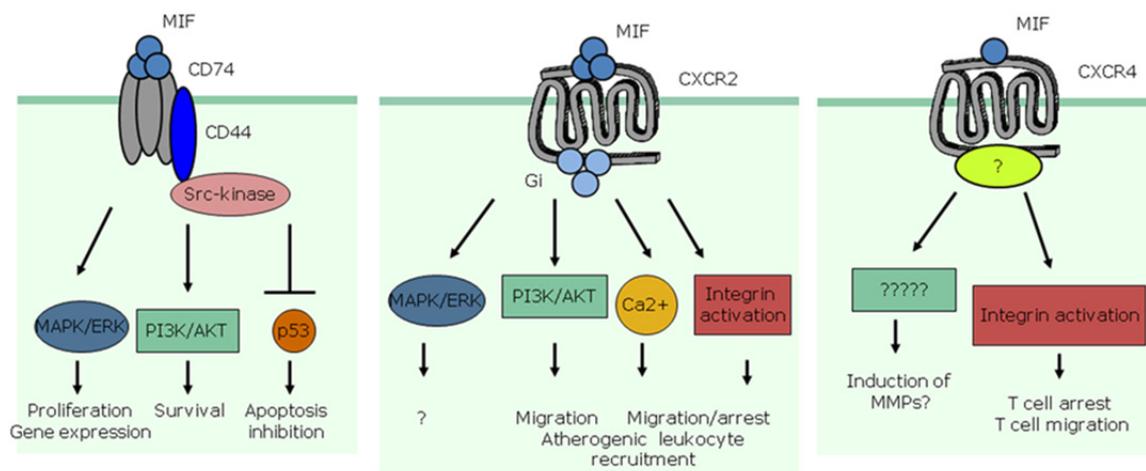
Zusätzlich zu den bekannten und bereits beschriebenen Heterodimerisierungen zwischen zwei G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren verdeutlichen neueste Forschungsstudien immer mehr Heterodimerisierungen zwischen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren und einem Membranprotein mit nur einer Transmembrandomäne oder anderen Rezeptoren. Ein Beispiel eines solchen heteromeren Rezeptorkomplexes bilden die beiden MIF-Rezeptoren CXCR2 und CD74. Eine Interaktion zwischen diesen beiden Rezeptoren konnte sowohl durch konfokalmikroskopische Kollokalisationsstudien fluoreszierender Rezeptorfusionsproteine, als auch durch Koimmunopräzipitationen verdeutlicht werden. Genaue molekulare Details bezüglich dieser Interaktion sind nicht bekannt. Allerdings konnte eine wichtige Rolle derartiger Komplexe für die MIF-gesteuerte atherogene Leukozytenrekrutierung herausgestellt werden<sup>112</sup>. Auch könnte eine derartige Rezeptorkomplexbildung mit einem *Crosstalk* zwischen Rezeptortyrosinkinasen und GPCRs einhergehen<sup>112,114</sup>. Außer dieser Heterodimerisierung zweier MIF-Rezeptoren sind einige weitere Heterodimerisierungen zwischen jeweils einem der beiden Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4 und einem anderen weiteren Rezeptor bekannt. Von Lax *et al.*, Limatola *et al.* und Trettel *et al.* wurde eine Dimerisierung von CXCR2 und dem AMPA Glu1 (AMPA = (*RS*)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl) propionic acid, Glu1 = Glutamatrezeptor 1) festgestellt<sup>272,296,297</sup>. Auch konnte in Koimmunopräzipitationsstudien mittels verschiedener BRET-Analysetechniken und durch Verwendung von Fusionsproteinen der G-Protein- $\alpha$ -Untereinheit von Parenty *et al.* eine Interaktion zwischen CXCR2 und dem Opioid- $\delta$ -Rezeptor veranschaulicht werden<sup>298</sup>. Der Chemokinrezeptor CXCR4 hingegen heteromerisiert mit CD4 und bildet dann eine komplexe heterooligomere Struktur bestehend aus dem Chemokinrezeptor, CD4 und dem HIVgp120<sup>299</sup>. CXCR4 kann auch mit der Dipeptidylpeptidase IV (CD26) und den beiden Opioid-Rezeptoren- $\delta$  und - $\kappa$  heteromere Komplexe bilden<sup>300-302</sup>. Heterodimerisierungen zwischen BILF1 und den Chemokinrezeptoren CCR9, CCR10, CXCR3 und CXCR4 wurden über Koimmunopräzipitationen und FRET-Analysen detektiert<sup>303</sup>. Die Informationen über alle hier genannten Interaktionen zwischen den Chemokinrezeptoren CXCR2, CXCR3 und CXCR4 und ihren Bindungspartnern stammen aus der Datenbank für Interaktionspartner G-

Protein-gekoppelter Rezeptoren (GRIPDB, *G protein coupled Receptor Interaction Partners DataBase*).

## 1.7 Intrazelluläre Signaltransduktionswege

Dass über seine Bindung an die drei bekannten Rezeptoren CD74, CXCR4 und CXCR2 durch MIF verschiedenste Signaltransduktionskaskaden initiiert werden können, wurde bereits in den entsprechenden Kapiteln zu MIF (Kapitel 1.2.1.2), zu CD74 (Kapitel 1.4), zu CXCR4 (Kapitel 1.5.1) und zu CXCR2 (Kapitel 1.5.2) beschrieben. An dieser Stelle sollen nun nochmal alle durch MIF-aktivierbaren Signaltransduktionswege zusammenfassend genannt werden, um dann im Kapitel zum „*Endosomal signaling*“ auf eine mögliche Aktivierung aus dem endolysosomalen Kompartiment einzugehen.

Über die MIF/CD74-Achse kann sowohl *rapid* und *sustained* ERK1/2-Signaling, als auch PI3K/AKT-Signaling und JNK-Signaling initiiert werden<sup>238,239,241</sup>. Außer an CD74 bindet MIF auch mit hoher Affinität an die beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR2, die beide der Gruppe von mit sieben Helices die Membran durchspannenden G-Proteingekoppelten Rezeptoren angehören<sup>112,247,304</sup>. Durch die Aktivierung der Rezeptoren CXCR2 bzw. CXCR4 fördert MIF die Chemotaxis von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen (Bindung an CXCR2) bzw. die Integrin-abhängige Arretierung auf atherogenen endothelialen Oberflächen (Bindung an CXCR4). In zahlreichen *in vivo*-Studien in pro-atherogenen Mausmodellen wurde nachgewiesen, dass die MIF/CXCR-Achse wesentlich zur atherogenen Leukozytenrekrutierung und Atheroprogression beiträgt<sup>112,114,152,169,276</sup>. Über die MIF/CXCR4-Achse werden auch die Migration endothelialer Progenitorzellen und die Krebszellmetastasierung reguliert<sup>305-307</sup>. Einige wesentliche Funktionen von MIF nach Bindung an einen seiner Rezeptoren sind schematisch in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Übersicht über die von MIF durch Bindung an seine Rezeptoren induzierten Signaltransduktionswege.** MIF, Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor; CD74, invariante Kette des MHC Klasse II-Komplexes; CD44, Glykoprotein; Src-kinase, Tyrosinkinase (zusammengesetztes Akronym aus *cellular* und *sarcoma* (c-Src)); MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; ERK, *extracellular signal-regulated kinase*; PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase; AKT, Proteinkinase B; G<sub>i</sub>, inhibitorisches G-Protein; Ca<sup>2+</sup>, zweiwertige Calciumionen; MMP, Matrixmetalloproteinase. Modifiziert nach Bucala, R., *The MIF Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition, MIF and the Chemokine Axis (Kap.I-2), World Scientific Pub Co, New Jersey, Singapur, in press.

## 1.8 *Endosomal signaling*

Im Gegensatz zur schon lange bekannten Initiation von Signaltransduktionskaskaden infolge der Bindung von Liganden an ihren Rezeptor auf der Plasmamembran ist mittlerweile auch noch ein zweiter möglicher Vorgang zur Aktivierung von Signalwegen beschrieben. Dabei handelt es sich um einen Prozess, der u.a. als *endosomal signaling* bezeichnet wird und bei dem nach der Endozytose von Rezeptor und Ligand aus dem endolysosomalen Kompartiment heraus noch Signale an bestimmte Effektormoleküle wie beispielsweise Kinasen weitergeleitet werden können, die dann entsprechende biologische Funktionen initiieren. Für den Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*) ist ein derartiger Prozess zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs bekannt.

## 1.9 Zielsetzung

Ein Interesse an den Endozytosemechanismen des Zytokins MIF wurde erstmalig im Zusammenhang mit Studien zum Nachweis seiner intrazellulären Interaktion mit der COP9-Signalosom (CSN)-Untereinheit JAB1/CSN5 im Zytosol geweckt, in denen sich zeigte, dass exogen zu Makrophagen hinzugegebenes MIF nach seiner Aufnahme und Translokation aus dem endolysosomalen Endozytoseweg mit CSN5 interagiert. Aufgrund dieser anfänglichen Studien wurde von einem rezeptorunabhängigen Endozytosemechanismus für MIF ausgegangen. Allerdings deuteten spätere Studien auf einen kanonischen Rezeptorvermittelten Aufnahmeweg hin, da MIF in physiologischen Konzentrationen sehr schnell internalisiert wurde. Um welchen der in Säugerzellen bekannten Endozytosewege es sich bei der MIF-Aufnahme jedoch handelt und welcher Mechanismus dem zugrundeliegt, blieb unbekannt. Erste Hinweise deuten darauf hin, dass  $\beta$ -Arrestin-1 und CD74 in den MIF-Endozytoseprozess involviert sein könnten und eine Komplexbildung mit Thioredoxin (TRX) sich fördernd auf den Endozytosevorgang auswirken könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Endozytoseweg des Zytokins MIF sukzessive charakterisiert und seine molekularen Besonderheiten herausgestellt werden. Durch Verwendung von bioaktivem fluoreszenzmarkierten Alexa<sup>546</sup>-MIF sollte in ersten Internalisierungsversuchen MIFs Fähigkeit zur Endozytose in Abhängigkeit der Temperatur gezeigt werden. In Kolokalisationsstudien mit verschiedenen an das *green fluorescence protein* (GFP) gekoppelten endosomalen Markern für die unterschiedlichen Kompartimente - frühe Endosomen, späte Endosomen, Lysosomen – war es das Ziel zunächst grob den Internalisierungsweg von MIF nachzuzeichnen. Um im Anschluss daran aufzuklären, um welchen der in Säugetierzellen möglichen Endozytosewege es sich bei der Internalisierung des Zytokins handelt, sollten verschiedenste für die einzelnen Wege spezifische Inhibitoren (Monodansylcadaverin, Chlorpromazin, Nystatin, Filipin) verwendet werden und deren Einfluss auf das Endozytoseverhalten von Alexa<sup>546</sup>-MIF durch Analyse der Kolokalisation mit dem späten endosomalen Marker Rab7GFP mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie festgestellt werden. Zusätzlich war von Interesse, ob die MIF-Endozytose von der Funktionalität der GTPase Dynamin, der Intaktheit der Mikrotubuli und der Ansäuerung der endosomalen Kompartimente abhängig war. Erstere Fragestellung sollte durch Überexpression eines dominant-negativen Dynaminkonstruktes und unter Verwendung des Dynamininhibitors Dynasore in Kolokalisationsstudien beantwortet werden. Zur Klärung der beiden anderen Abhängigkeiten sollten ebenfalls spezifische Inhibitoren eingesetzt werden. Durch Kolokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkierten Referenzproteinen für die unterschiedlichen Endozytosewege und Alexa<sup>546</sup>-MIF sollten die bisher erlangten Ergebnisse untermauert werden. In Rezeptorüberexpressionsversuchen und durch Inhibierung einzelner Rezeptoren durch Verwendung von Inhibitoren sollte herausgefunden werden, ob die bekannten MIF-Rezeptoren in den Internalisierungsvorgang des Zytokins involviert sind. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf CD74 aufgrund seiner hohen *Recyclingrate* von der Plasmamembran und auf den ubiquitär exprimierten Rezeptor CXCR4 gelegt werden. Aufgrund der Kenntnis darüber, dass CD74 mit dem G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptor CXCR2 einen heteromeren Komplex eingehen konnte, bestand das weitere Interesse darin, aufzuklären, ob dies auch für CXCR4 galt. Falls einer der beiden MIF-

Rezeptoren CD74 und CXCR4 in irgendeiner Weise Einfluss auf die Endozytose hatte, sollte untersucht werden, ob CD74 und CXCR4 mit Alexa<sup>546</sup>-MIF kolokalisierten und in welchem Kompartiment sich die Rezeptoren befanden. Abschließend sollte analysiert werden, ob das Zytokin MIF ähnlich wie der Wachstumsfaktor EGF zu *endosomal signaling* fähig ist, oder ob seine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs sich auf von der Plasmamembran ausgehende Signale begrenzt. Da für das Strukturanalogen D-DT immer mehr Eigenschaften entdeckt werden, die ähnlich zu denen zu MIF sind, sollte zudem in Pilotversuchen humanes D-DT in *E.coli BL21(DE3)* exprimiert, aufgereinigt und fluoreszenzgefärbt werden, um anfängliche Kolokalisationsstudien mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT durchzuführen, um evtl. Tendenzen zu dessen Endozytoseverhalten herauszufinden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien & Reagenzien	Hersteller
Accutase	PAA, Pasching
Acrylamid/Bis-Lösung (30%)	Bio Rad, München
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
AMD3100	Sigma, München
Ammoniak (NH <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Beta-Mercaptoethanol	Sigma, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Calbiochem, Merck, Darmstadt
CHAPSO	Calbiochem, Merck, Darmstadt
<i>Complete protease inhibitor cocktail tablets</i>	Roche, Grenzach-Wyhlen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, München
D-MEM-Medium (Gibco)	Invitrogen, Karlsruhe
D-MEM-Medium ohne Phenolrot (Gibco)	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma, München
Doxycyclin	Sigma, München
EGTA	Fluka Chemie AG, Schweiz
Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Carl Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS) (Gibco)	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoromount-G	Southern Biotech/ Biomol, USA
Glycerin	Sigma, München
Glycin	Fluka Chemie AG, Schweiz
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Hoechst33342	Invitrogen, Karlsruhe
Insulin Rapid	Aventis, Frankfurt
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	KMF Laborchemie, Lohmar

---

Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
MTT (98%)	Sigma, München
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Serva, Heidelberg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Fluka Chemie AG, Schweiz
NEAA (nicht-essenzielle Aminosäuren)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage MES-SDS- <i>running buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage LDS- <i>sample buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage <i>transfer buffer</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM I (Gibco)	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma, München
Penicillin/ Streptomycin-Lösung (Gibco)	Invitrogen, Karlsruhe
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma, München
Puromycin	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Protein-Assay (Bradford-Reagenz)	Bio Rad, München
Protein-G- <i>beads</i>	NEB, Frankfurt
RPMI-1640-Medium (Gibco)	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Fluka Chemie AG, Schweiz
Silbernitrat	Sigma, München
TEMED	Bio Rad, München
Titriplex III (EDTA)	Merck, Darmstadt
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Sigma, München
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween 20	Fluka Chemie AG, Schweiz
Zitronensäure	Fluka Chemie AG, Schweiz

---

## 2.2 Transfektionsreagenzien

Reagenz	Hersteller
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche, Grenzach-Wyhlen
Lipofectamine <sup>TM</sup> LTX Reagent	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.3 Endozytoseinhibitoren

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Hersteller
Bafilomycin A <sub>1</sub> ( <i>Streptomyces griseus</i> )	100 µM in DMSO	Sigma, München
Chlorpromazin	10 mM in ddH <sub>2</sub> O	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Dynasore monohydrat	14,7 mM in DMSO	Sigma, München
Filipin III	5 mg/ml in DMSO	Sigma, München
Monodansylcadaverin	50 mM in DMSO	Sigma, München
Nocodazol	10 mM in DMSO	Sigma, München
Nystatin	5 mg/ml in DMSO	Sigma, München

## 2.4 Für die Fluoreszenzmarkierung mit Alexa<sup>546</sup> Fluor verwendete MIF-Präparationen

Datum der MIF-Präparation	Konzentration laut Bradford
18.04.2008	227 µg/ml
17.07.2008	250 µg/ml
24.09.2008	226 µg/ml
20.11.2008	245 µg/ml
13.03.2009	344 µg/ml
04.06.2009	175 µg/ml
08.09.2009	204 µg/ml
29.01.2010	150 µg/ml
09.03.2010	200 µg/ml
28.05.2010	200 µg/ml
15.09.2010	188 µg/ml
13.01.2011	168 µg/ml

## 2.5 Fluoreszenzmarkierte Proteinkonjugate und Organellmarker

Reagenz	Konzentration der Stammlösung	Lösungsmittel	Hersteller
Alexa <sup>488</sup> -AcLDL	1 mg/ml	10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,3 mM EDTA, pH 8.3, 2 mM NaN <sub>3</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa <sup>488</sup> -Choleratoxin B	1 mg/ml	1 x PBS, 0,1% BSA	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa <sup>488</sup> -Transferrin	5 mg/ml	ddH <sub>2</sub> O, 2 mM NaN <sub>3</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa <sup>546</sup> -Transferrin	5 mg/ml	ddH <sub>2</sub> O, 2 mM NaN <sub>3</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
DiI-AcLDL	200 µg/ml		CellSystems, Troisdorf
LysoSensor Green DND-189	1 mM	DMSO	Invitrogen, Karlsruhe
LysoTracker Red DND-99	1 mM	DMSO	Invitrogen, Karlsruhe

Reagenz	Absorption (nm)	Emission (nm)	pK <sub>a</sub>
Alexa Fluor 488	495	519	NA
Alexa Fluor 546	556	573	NA
DiI	540	610	NA
LysoSensor Green DND-189	443	505	5,2
LysoTracker Red DND-99	577	590	NA

## 2.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Amxa Nucleofector II	Amxa, Köln
Analysenwaage Adventurer	Ohaus, Gießen
Analysenwaage Analytical Plus	Ohaus, Gießen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
BioRuptor (Ultraschallgerät)	Diagenode, Liège, Belgium

---

Cary 1 Bio UV-Visible Spectrophotometer	Varian, Darmstadt
CO <sub>2</sub> -Inkubationsschrank	Heraeus Instruments, Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator MCO-17AIC	SANYO Electric Biomedical Co., Japan
Eismaschine AF 100	Scotsman, Italien
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech, München
FACS Calibur™ Flow Cytometer	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Canto Flow Cytometer	BD Bioscience, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop IX50	Olympus, Hamburg
Heizblock UBD	Grant Instruments, UK
Konfokalmikroskop Axiovert 100M, LSM510	Carl Zeiss, Oberkochen
Konfokalmikroskop LSM710	Carl Zeiss, Oberkochen
4°C Kühlschranks Premium frost-free	Liebherr, Ochsenhausen
LAS-3000 Image Reader	Fujifilm, Düsseldorf
Magnetrührer MSH basic yellowline	IKA, Staufen
Magnetrührer Variomag Mono	Variomag, USA
Mikroskop Olympus CK40	Olympus, Hamburg
MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Neubauerzählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, USA
PHM82 Standard pH-Meter	Radiometer, Dänemark
Pipetten Pipetman	Gilson, USA
Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS integra biosciences, Fernwald
Power Pac 300	BioRad, München
Rotationsüberkopfschüttler RS-60 tube rotator	BioSan, Riga, Lettland
Schüttler MM1	Desaga, SARSTEDT-Gruppe, Nümbrecht
Schüttler Vibrax VXR electronic	IKA, Staufen
SDS-PAGE NuPage <i>XCell SureLock Mini Cell</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Spektrophotometer Nanodrop ND-1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sterilwerkbank Biowizard	Kojair Tech Oy, Finnland
Sterilwerkbank HERAsafe	Heraeus Instruments, Hanau
-20°C Tiefkühlschrank Premium	Liebherr, Ochsenhausen
-20°C Tiefkühlschrank Premium NoFrost	Liebherr, Ochsenhausen
-80°C Tiefkühlschrank Ultra Low	SANYO Electric Biomedical Co., Japan
-152°C Tiefkühltruhe Ultra Low MDF-1155	SANYO Electric Biomedical Co., Japan

Transferpette	Brand, Wertheim
VICTOR <sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer, USA
Wasserbad Typ 1004	GFL, Burgwedel
Western-Blot NuPage/ <i>X Cell II Blot Modul</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Wippe Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
Zentrifuge Z383K	Hermle, Wehingen
Zentrifuge Z400K	Hermle, Wehingen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

## 2.7 Software

Software	Hersteller
AIDA Image-Analyser	Raytest Isotopen GmbH, Berlin
Cell F	Olympus, Hamburg
Origin 8	OriginLab Corporation, USA
WinMDI	Flow Cytometry Application, J. Trotter

## 2.8 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser 12 mm	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Deckgläser 42 x 0.17 mm (Order No. 0727.016)	PeCon, Erbach
FACS-Röhrchen 5 ml	Falcon, Heidelberg
Gewebekulturflaschen (50 ml, 25 cm <sup>2</sup> )	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen (250 ml, 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Gewebekulturschalen (3 cm, 6 cm, 10 cm)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Greiner PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nalgene, USA
Liquipettes	Elkay, UK
Multiwell-Platte Cellstar (6-well, 24-well)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
NuPage/ Bis-Tris 4-12% Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage-Kassetten	Invitrogen, Karlsruhe
NuPage-Kämme	Invitrogen, Karlsruhe

Objektträger	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger SuperFrost Plus	Gerhard Menzel, Braunschweig
Objektträgermappen	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträgerkästen	NeoLab, Heidelberg
Pipettenspitzen blau (1000 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen gelb (200 µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen weiß (10 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
PROTRAN Nitrocellulosetransfermembran 0,2µm	Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel
Reaktionsgefäß 1.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß 2 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Thermoblock TDB 120	Biosan Laboratories, USA
UV-Küvetten UVette	Eppendorf, Hamburg
Wägeschalen groß	Carl Roth, Karlsruhe
Whatman Filterpapier	Greiner Labortechnik, Frickenhausen

## 2.9 Molekulare Größenstandards für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Standard	Hersteller
Novex® Sharp Protein-Standard	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.10 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Akt Kinase Assay Kit (Nonradioactive, #9840)	Cell Signaling, USA
Alexa-Fluor 546 Protein Labeling-Kit(Molecular Probes)	Invitrogen, Karlsruhe
MEF2 Nucleofector-Kit ( <i>mouse embryonic fibroblast</i> )	Amamax, Köln
Nucleobond MaxiPlus Maxi-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Qiagen Plasmid Maxi-Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Super Signal West Dura Extended Duration Signal	Pierce Biotechnology, USA

## 2.11 Enzyme

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Go Taq Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim
T4 Ligase	Fermentas/Thermo Scientific, St. Leon-Roth
Sal I	Fermentas/Thermo Scientific, St. Leon-Roth
Bgl II	Fermentas/Thermo Scientific, St. Leon-Roth
EcoR I	Fermentas/Thermo Scientific, St. Leon-Roth

## 2.12 Antikörper für Western-Blots

### 2.12.1 Primärantikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Typ</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
Aktin (clone C4)	Maus IgG (monoklonal)	1:1000	MP Biomedicals, USA
Caveolin-1 (N-20, sc-894)	Kaninchen (polyklonal)	1:500	Santa Cruz Biotechnology, USA
Clathrin (CON.1, ab24579)	Maus IgG (monoklonal)	1:250	Abcam, USA
CD74 (C-16, sc-5438)	Ziege (polyklonal)	1:500	Santa Cruz Biotechnology, USA
CD74 (LN2, Ab 555612)	Maus (monoklonal)		BD Pharmingen, Heidelberg
CXCR4 (MAB171)	Maus		R&D Systems, Wiesbaden
CXCR4 (Fusin 182-196, c8352)	Kaninchen (polyklonal)	1:1000	Sigma, München
D-DT	Kaninchen	1:1000	Bucala, Yale, USA
HA	Ratte IgG (monoklonal)	1:10000	Roche Diagnostics, Mannheim

Phospho-AKT(Ser473)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, USA
Phospho-AKT (Thr308)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, USA
V5 (R960-25)	Maus IgG (monoklonal)	1:5000	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.12.2 Sekundärantikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Typ</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
anti-Kaninchen	F(a,b') <sub>2</sub> aus Esel, HRP-konjugiert	1:1000	Pierce Biotechnology, USA
anti-Kaninchen	F(a,b') <sub>2</sub> aus Esel, HRP-konjugiert	1:10000	GE Healthcare, USA
anti-Maus	F(a,b') <sub>2</sub> aus Schaf, HRP-konjugiert	1:1000	Pierce Biotechnology, USA
anti-Maus	F(a,b') <sub>2</sub> aus Schaf, HRP-konjugiert	1:10000	GE Healthcare, USA
anti-Ratte	F(a,b') <sub>2</sub> aus Ziege, HRP-konjugiert	1:10000	GE Healthcare, Freiburg
anti-Ziege	IgG aus Kaninchen HRP-konjugiert	1:1000	GeneTex, USA

### 2.13 Antikörper für FACS

<u>Bezeichnung</u>	<u>Typ</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Hersteller</u>
CD74 (555540)	anti-human aus Maus, FITC-konjugiert	1:7	BD Pharmingen, Heidelberg
CXCR4 (FAB170f)	anti-human aus Maus, FITC-konjugiert	1:4	R&D Systems, Wiesbaden
IgG, Isotypkontrolle	anti-Maus aus Ziege, chromeo™488-konjugiert	1:10000	Active Motif, USA
IgG1 Isotypkontrolle	Maus	500 µg/ml	Bioscience, UK

## 2.14 Antikörper für Koimmunpräzitationen

<i><b>Bezeichnung</b></i>	<i><b>Typ</b></i>	<i><b>Verdünnung</b></i>	<i><b>Hersteller</b></i>
CD74 (555538)	anti-human	4 µg pro ml Zelllysate	BD Biosciences Pharmingen, USA
HA	Ratte IgG (monoklonal)	1:1000	Roche Diagnostics, Mannheim
IgG1 Isotypkontrolle	Maus	500 µg/ml	Bioscience, UK
V5 (R960-25)	Maus IgG (monoklonal)	1:5000	Invitrogen, Karlsruhe

## 2.15 Neutralisierende Antikörper

<i><b>Bezeichnung</b></i>	<i><b>Typ</b></i>	<i><b>Konzentration</b></i>	<i><b>Hersteller</b></i>
CD74 (LN2, Ab 555612)	Maus (monoklonal)	10 µg/ml	BD Pharmingen, Heidelberg
CXCR4 (MAB171)	Maus	10 µg/ml	R&D Systems, Wiesbaden

## 2.16 Plasmide

<i><b>Name</b></i>	<i><b>Herkunft</b></i>
pBABEpuro	Addgene, USA
pCD74minRTS	Carolus Therapeutics, USA
pcDNA3.1-CD74-V5-His	Bucala, Yale, USA
pcDNA3.1-CXCR4(HA) <sub>3</sub>	Missouri S&T cDNA Resource Center
pCMVRab5wt	AG Krüttgen
pECFP-CXCR4	AG Bernhagen
pEGFP-Rab5	AG Bernhagen
pEGFP-Rab7	Dr. Marino Zerial, Dresden
pEYFP-CD74	AG Bernhagen

pEYFP-CD74minRTS	AG Bernhagen
pET22b-hD-DT	Bucala, Yale, USA
pUHG16wtdynamin	Dr. Marino Zerial, Dresden
pUHG16K44Adynamin	Dr. Marino Zerial, Dresden

## 2.17 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
Rab5-Primer-forward	5'-AAGTCGACTTAGTTACTACAACACTGATT-3'
Rab5-Primer-reverse	5'-CCCAGATCTATGGCTAGTCGAGGCGCAACA-3'
pEGFPC1-forward	5'-GATCACTCTCGGCATGGAC-3'
CMV-forward	5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'

## 2.18 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.18.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Konzentration
<b>PBS pH 7,2</b>	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM
<b>TBS pH 7,3</b>	
NaCl	150 mM
Tris-Cl	20 mM
<b>10% SDS</b>	
SDS	10 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
<b>10% APS</b>	
Ammoniumpersulfat	1 g
ddH <sub>2</sub> O	10 ml

**Trenngelpuffer pH 8,8 (1,5 M Tris)**

Tris	90,75 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**Sammelgelpuffer pH 6,8 (0,5 M Tris)**

Tris	30,3 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**100x Proteaseinhibitor-Cocktail 1 (PIC 1)**

$\alpha$ 2-Macroglobulin	100 $\mu$ g/ml
AEBSF	100 mM in DMSO
Aprotinin	30 $\mu$ M in DMSO
EDTA	100 mM in DMSO
E-64	1 mM in DMSO
Leupeptin	1 mM in ddH <sub>2</sub> O

**2.18.2 Markierung von huMIF bzw. huD-DT mit Alexa-Fluor 546 und Reinigung über Gelfiltration**

<u>Puffer</u>	<u>Menge</u>
<b>Natriumphosphatpuffer pH 7,2</b>	
Natriumphosphat	13,76 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 5000 ml

**2.18.3 Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays**

<u>Puffer/Lösung</u>	<u>Konzentration/ Menge</u>
<b>Glycinpuffer pH 2,8</b>	
Glycin	50 mM
NaCl	150 mM
<b>Paraformaldehyd pH 7,6</b>	
Paraformaldehyd	3,6%

### 2.18.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blotting

<u>Puffer/Lösung</u>	<u>Menge</u>
<b>Zellysierungspuffer</b>	
NuPage LDS <i>sample buffer</i> (4x)	1 ml
DTT (1 M)	0,5 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,5 ml
<b>1x Lämmli-Puffer</b>	
Bromphenolblau	15 mg
Glycerin	2 ml
SDS (20%)	2 ml
β-Mercaptoethanol	0,4 ml
1 M Tris (pH 6,8)	1 ml
<b>12% Trenngel pH 8,8 (2 Gele)</b>	
ddH <sub>2</sub> O	4,7 ml
Acrylamid	10 ml
Trenngelpuffer pH 8,8 (1,5 M Tris)	5 ml
10% SDS	200 µl
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl
<b>4% Sammelgel pH 6,8 (2 Gele)</b>	
ddH <sub>2</sub> O	6 ml
Acrylamid	1,34 ml
Sammelgelpuffer pH 6,8 (0,5 M Tris)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl
<b>Laufpuffer (5x) (für selbst gegossene Gele)</b>	
Tris	15,14 g
Glycin	72,05 g
10% SDS	50 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Laufpuffer (1x)** (für selbst gegossene Gele)

Laufpuffer (5x)	160 ml
ddH <sub>2</sub> O	640 ml

**Laufpuffer**

NuPage MES SDS <i>running buffer</i>	40 ml
ddH <sub>2</sub> O	760 ml

**Transferpuffer (1 Gel)**

NuPAGE Transferpuffer (20x)	12,5 ml
Methanol	25 ml
ddH <sub>2</sub> O	212,5 ml

**Immunblot-Waschpuffer**

Tween 20	1 ml
TBS	1000 ml

**1% BSA-Lösung**

BSA	1 g
ddH <sub>2</sub> O	100 ml

---

**2.18.5 Silbergefärbung**

<u>Puffer/Lösung</u>	<u>Menge</u>
<b>Fixierlösung</b>	
Methanol	250 ml
Essigsäure	50 ml
ddH <sub>2</sub> O	200 ml
<b>50% Methanol</b>	
Methanol	250 ml
ddH <sub>2</sub> O	250 ml
<b>Färbelösung</b>	
NaOH (0,36%)	11 ml

Ammoniak (32%)	545 µl
Silbernitrat	0,3 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

**Entwicklerlösung**

Zitronensäure (1%)	250 µl
Formaldehyd (37%)	25 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 ml

**2.18.6 Koimmunpräzipitation**

Puffer	Menge
<b>Koimmunpräzipitationspuffer</b>	
TrisHCl (1 M)	1,3 ml
NaCl (4 M)	0,6 ml
EGTA (0,5 M)	0,8 ml
Triton (10 %)	2,5 ml
CHAPSO	250 mg
NaN <sub>3</sub> (10 %)	50 µl
PIC 1 (Zugabe immer frisch)	250 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 25 ml

**2.18.7 Durchflusszytometrie**

Puffer	Menge
<b>FACS-Puffer</b>	
FCS	1 ml
PBS	100 ml

**2.18.8 Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Methode**

Puffer	Menge
<b>2x HeBS pH 7,1</b>	
NaCl	8 g
Hepes-Säure	4,98 g

KCl	0,36 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,132 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 500 ml
steril filtrieren mit 0,45 µm Nitrozellulosefilter	

**2,5 M CaCl<sub>2</sub>**

CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	36,75 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 100 ml
steril filtrieren mit 0,45 µm Nitrozellulosefilter	

**2.18.9 Medien für Bakterien- und Zellkultur**

Medium	Konzentration/ Menge
<b>LB-Medium</b>	
Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml
<b>Ampicillin</b>	
100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O bei -20°C gelagert	Arbeitskonzentration: 1:1000 in LB-Medium
<b>Kanamycin</b>	
5 mg/ml in Ethanol bei -20°C gelagert	Arbeitskonzentration: 1:1000 in LB-Medium
<b>Zellkulturmedium für MEF-, HtTA1-, HEK293-Zellen und humane Dermalfibroblasten(F277)</b>	
Dulbecco's MEM	500 ml
FCS	10%
Penicillin/ Streptomycin	1%
Natriumpyruvat	1%
<b>Zellkulturmedium für Jurkat-T-, THP-1- und YT2C2-Zellen</b>	
RPMI 1640-Medium	500 ml

---

FCS	10%
Penicillin/Streptomycin	1%
<b>Zellkulturmedium für Mono Mac 6-Zellen</b>	
RPMI-1640-Medium	500 ml
FCS	10%
Penicillin/Streptomycin	1%
NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren)	1%
Insulin Rapid (4,5 g)	3,2 ml

**Einfriermedium**

Zellkulturmedium	20 ml
DMSO	20%

---

**2.18.10 Bakterienstämme**

---

Stamm	Hersteller
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E.coli</i> XL-10	Stratagene, Santa Clara, USA
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	Invitrogen, Karlsruhe

---

## 3 Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Techniken

#### 3.1.1 Kultivierung auf Agarplatten

Nach einer Transformation wurden Bakterienstämme auf LB-Selektionsplatten ü.N. bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Agarplatten mit Parafilm umwickelt bei 4°C im Kühlraum gelagert.

#### 3.1.2 Anzucht in Flüssigmedium

Zur Anzucht von Bakterienstämmen in Flüssigmedium wurde LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum in Erlenmeyerschikanenkolben gefüllt und mit einer Einzelkolonie einer LB-Agarplatte angeimpft. Zur Kultivierung wurden die Erlenmeyerschikanenkolben in einen Schüttler gestellt und die Bakterien bei 37°C und 220 rpm bis zum Erreichen ihrer log-Phase angezogen.

#### 3.1.3 Expression von huD-DT in *E.coli* BL21(DE3)

Vor Beginn einer Expression des Proteins D-DT in *E. coli* BL21(DE3) waren einige Arbeitsschritte vorab notwendig. Zunächst musste die Plasmid-DNA, die das entsprechende Protein exprimiert, mittels einer Hitzeschock-Transformation kompetenter *E.coli* (siehe Kapitel 3.5.1) in den Bakterienstamm *E.coli* BL21(DE3) eingebracht werden. Anschließend bedurfte es einer Schüttelvorkultur mit einem Volumen von 5 ml, die mit einem Klon der LB-Platte angeimpft wurde und für ca. 8 h bei 37°C inkubiert wurde, um die spätere Hauptkultur mit einem Volumen von 500 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (hier: Ampicillin) anzuimpfen. Nach Animpfen der in einem Schikanenkolben befindlichen Hauptkultur mit der Vorkultur wurde diese bei 37°C im Schüttler inkubiert. Um das Bakterienwachstum zu kontrollieren und das Erreichen der log-Phase der Bakterien nicht zu versäumen, wurde die optische Dichte der Kultur bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) in regelmäßigen Zeitabständen mittels eines Biophotometers bestimmt. Bei Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5 wurde die Expression des Proteins D-DT durch Induktion des Plasmids mit 1 mM IPTG (für Kultivierung bei 37°C) bzw. mit 0,1 mM IPTG (für Kultivierung bei 22°C) induziert. Nach einer Expressionsdauer von 4 h bei 37°C bzw. ü.N. bei 22°C im Schüttler wurde von der Kultur nach Berechnung des Verhältnisses von 250 zu gemessener  $OD_{600}$  das entsprechende Volumen abgenommen und bei 4000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Bakterienpellets als Probe für ein folgendes Silbergel zur Überprüfung der Effizienz der Induktion in je 50 µl 1x Lämmli-Puffer lysiert und bei -20°C eingefroren. Die restliche Schüttelkultur wurde mit jeweils 50 ml Volumen in Falconröhrchen aliquotiert, ebenfalls bei 4000 rpm und 4°C für 15 min abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands wurden die Bakterienpellets bei -20°C gelagert.

### 3.1.4 Bestimmung der optischen Dichte ( $OD_{600}$ )

Die optische Dichte ( $OD_{600}$ ) einer Bakterienkultur wird mittels eines Biophotometers der Firma Eppendorf bestimmt und gibt Aufschluss über den Status ihrer Wachstumsphase. Die Induktion einer Proteinexpression sollte immer in der log-Phase des Bakterienwachstums erfolgen.

## 3.2 Proteinbiochemische Techniken

### 3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD

Zur Bestimmung der Konzentration der beiden Proteine Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>546</sup>-D-DT nach deren Markierung mittels Säulenchromatographie wurde die Methode nach BRADFORD verwendet. Die Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie-Blau an die Aminosäure Arginin und hydrophobe Aminosäuren der Proteine bindet, wodurch sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Aufgründessen ist eine indirekte photometrische Bestimmung des Proteingehalts möglich.

Für die Messung wurden Einmalküvetten verwendet. In diese wurden 980  $\mu$ l einer 1:5 Verdünnung des Bradford-Reagenzes mit 20  $\mu$ l der entsprechenden Proteinlösung bzw. Natriumphosphatpuffer als Blank zusammengegeben, gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die  $OD_{595nm}$  der Proben im Spektrophotometer gegeneinander gemessen. Durch Multiplikation der  $OD_{595nm}$  mit dem Faktor  $1,1 \cdot 10^3$  konnte der Proteingehalt der Probe ermittelt werden. Hierbei handelt es sich um eine vereinfachte Bestimmung für rMIF.

### 3.2.2 Gießen von Gelen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen in der SDS-PAGE werden Polyacrylamidgele benötigt. Hierbei handelt es sich um Hydrogele deren Vernetzung durch radikalisch initiierte Polymerisation des Monomers Acrylamid entsteht. Durch Zusatz des anionischen Detergenzes SDS wird eine Trennung der Proteine gemäß ihrer molekularen Masse gewährleistet. SDS bindet an hydrophobe Bereiche der Proteine, überlagert deren Eigenladung und bewirkt somit eine negative Ladung der Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht.

Polyacrylamidgele bestehen aus einem Sammel- und einem Trenngel, die nacheinander in einer Gelkassette gegossen werden. Vor Giessen des Trenngels muss der gewünschte Vernetzungsgrad festgelegt werden und die entsprechenden Volumina der Komponenten ddH<sub>2</sub>O, Acrylamid, Trenngelpuffer pH 8,8 und 10% SDS zusammengegeben werden. Unmittelbar vor dem Giessen werden 10% APS und TEMED, die zur Auslösung der radikalen Polymerisierungsreaktion benötigt werden, zugesetzt und das Trenngel gegossen. Durch Überschichten des Gels mit Isopropanol wird eine gerade Übergangsfläche zwischen Trenn- und Sammelgel gewährleistet.

Nach Polymerisation des Trenngels wird das Isopropanol mittels Filterpapier abgenommen und nach Zusammenführen der entsprechenden Komponenten das Sammelgel gegossen. Zur Formung der Geltaschen wird direkt ein Kamm mit 10 bzw. 15 Spuren eingelassen.

Das fertige Polyacrylamidgel kann nach Polymerisation des Sammelgels direkt verwendet oder nach Zugabe von wenig ddH<sub>2</sub>O bei 4°C im Kühlraum gelagert werden.

### **3.2.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese handelt es sich um die standardmäßig verwendete Technik zur Auftrennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. Für die SDS-PAGE wurde das NuPage-System von Invitrogen verwendet. Es wurden sowohl die oben beschriebenen selbst gegossenen Polyacrylamidgele als auch bei Invitrogen kommerziell erwerbliche Gradientengele mit einer Polyacrylamidkonzentration von 4 bis 12% verwendet. Das Elektrolyt für die selbst gegossenen Gele basiert auf einem Tris-Glycin-Puffersystem, während es sich bei den Gradientengelen von Invitrogen um Bis-Tris gepufferte Polyacrylamidgele handelt. Als Laufpuffer für die Gelelektrophorese diente je nach verwendetem Gel entweder ein Tris-Glycinpuffer oder der NuPage MES-SDS-*running buffer*.

Um eine Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse zu ermöglichen, mussten die Zellen einer speziellen Behandlung unterzogen werden. Bei der Probenvorbereitung wurden sie zunächst durch Zugabe von Lysepuffer lysiert. Das im Lysepuffer enthaltene anionische Detergenz SDS bindet an die Proteine, überdeckt deren Eigenladung und bewirkt somit ein konstantes Ladung/Masse-Verhältnis der SDS-Proteinkomplexe. Mit Hilfe der reduzierenden Thiolverbindung DTT im Lysepuffer wurden die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen innerhalb der Proteinkomplexe gespalten, wodurch eine teilweise Auflösung der Tertiär- und Sekundärstrukturen erreicht wurde. Durch zusätzliches Erhitzen der Proben auf 95°C wurde die vollständige Denaturierung der Proteine, d.h. Auflösung der Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen und Streckung der Moleküle durch das SDS, gewährleistet. Eine abschließende Ultraschallbehandlung diente dem vollständigen Zellaufschluss, so dass alle Proteine als lösliche Proteine in der Probe vorlagen.

Die negativ geladenen Polypeptidketten werden nach ihrer Auftragung zunächst am Übergang zwischen Sammel- und Trenngel fokussiert, bevor sie sich im Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichts anordnen. Proteine mit niedriger molekularer Masse laufen mit schnellerer Geschwindigkeit durch das Gel zur Anode, so dass sie am Ende der Elektrophorese im unteren Bereich des Gels zu finden sind. Um die entsprechenden Banden auf dem Gel später bestimmten Proteinen zuordnen zu können, wurde bei jeder SDS-PAGE mindestens ein molekularer Größenstandard zusätzlich zu den Proben aufgetragen.

### 3.2.4 Silberfärbung

Für die Silberfärbung eines Gels werden die Proteine nicht-induzierter und mit IPTG-induzierter Proben einer Bakterienkulturschüttelkultur aus der Expression von huD-DT in einem selbst gegossenen 15%-igem Gel ihres Molekulargewichts entsprechend aufgetrennt. Zur erstmaligen Fixierung der Proteine im Polyacrylamidgel wird dieses für 30 bis 60 min in Fixierlösung (II) inkubiert. Anschließend erfolgt ein zweimaliges Waschen für jeweils 10 min in einer wässrigen Methanollösung (III), gefolgt von 3x 5 min waschen in ddH<sub>2</sub>O. Zur Anfärbung der Proteine wird eine Inkubation für 20 min in Färbelösung (IV) durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen des Gels mit ddH<sub>2</sub>O für jeweils 5 min werden alle vorhandenen Proteine durch Inkubation in Entwicklerlösung für wenige Minuten sichtbar gemacht. Die Entwicklung des Gels wird durch Zugabe und zweimaliges Wechseln der wässrigen Methanollösung (III) innerhalb von 10 min gestoppt. Durch abschließendes Scannen oder Fotografieren des Gels mit Hilfe des Chemidocs kann das Ergebnis festgehalten werden.

### 3.2.5 Koimmunpräzipitation

Die Methode der Koimmunpräzipitation dient dazu, die Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen, indem mittels Beads und spezifischer Antikörper das eine Protein nach der Zelllyse herausgezogen wird, während der Interaktionspartner mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse auf einer Nitrozellulosemembran detektiert wird.

Zur Durchführung der Koimmunpräzipitation von getaggen Rezeptorfusionsproteinen wurden zunächst zwei Millionen HEK293-Zellen auf 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die transiente Transfektion der HEK293-Zellen mit jeweils 5 µg der Plasmide pcDNA3.1-CD74-V5-His und pcDNA3.1-CXCR4(HA)<sub>3</sub> (siehe auch Kapitel 3.4.7.2). Für die Koimmunpräzipitation wurden zwei Tage nach der transienten Transfektion zunächst die HEK293-Zellen abgelöst und die Gesamtzellzahl der in die Koimmunpräzipitation eingehenden Zellen bestimmt. Diese lag pro Ansatz bei ca. 10-20 Millionen. Nach Zentrifugation der Zellen wurden diese in 1 ml Koimmunpräzipitationspuffer resuspendiert, kurz gevortext und für 30 min bei 4°C inkubiert, um den vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen bei 16000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. 50 µl des Zellüberstands dienten als Input und wurden mit 20 µl NuPage LDS *sample buffer* (4x) und 10 µl DTT versetzt. Die restlichen 950 µl Zellüberstand wurden in zwei Hälften aufgeteilt, 475 µl für die Kontrolle und 475 µl für den Pulldown und mit entsprechender Menge an Antikörper versetzt, hierbei wurde sichergestellt, dass pro 1 ml Zellüberstand 4 µg Antikörper eingesetzt wurde. Als Antikörper für den spezifischen Pulldown eines der beiden Proteine CXCR4 oder CD74 wurden ein anti-HA- bzw. ein anti-V5-Antikörper verwendet. Für die Isotypkontrolle wurde ein IgG1-Antikörper aus Maus verwendet. Während der zweistündigen Inkubation aller Ansätze im Rotationsüberkopfschüttler bei 4°C wurden die Protein-G-beads blockiert. Hierzu wurden die Protein-G-beads anfangs solange auf einer Wippe bei 4°C belassen bis sich eine homogene Suspension gebildet hatte. Die Menge der eingesetzten beads richtete sich im Folgenden nach dem Volumen der Zellüberstände, wobei pro 1 ml 100 µl beads benötigt wurden. Das entsprechende Volumen an homogener beads-Suspension wurde in einem Reaktionsgefäß durch eine Kombination aus Zentrifugation bei 200 g für 5 min bei 4°C, Verwerfen des

Überstands, Blockierung der *beads* mit 200 µl 1x PBS mit 1% BSA für mindestens 20 min bei 4°C, erneutem Zentrifugieren und anschließendem Resuspendieren in 200 µl Koimmunpräzitationspuffer für die anschließende Inkubation mit dem Zellüberstand vorbereitet. Die oben genannten Proben (Kontrolle und Pulldown) wurden mit jeweils 60 µl der blockierten *beads* versetzt und für zweieinhalb Stunden oder über Nacht bei 4°C im Rotationsüberkopfschüttler inkubiert. Nach Zentrifugation der Ansätze bei 200 g für 5 min bei 4°C, erfolgten ein Waschschriff mit 500 µl Koimmunpräzitationspuffer und vier Waschschriffe mit je 500 µl wäßrig verdünntem Koimmunpräzitationspuffer (1:5). Zwischen den Waschschriffen wurde zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Proben in jeweils 40 µl NuPage LDS *sample buffer* (2x; 10 µl DTT (1 M), 20 µl NuPage LDS *sample buffer* (4x), 10 µl ddH<sub>2</sub>O) aufgenommen, bei 95°C gekocht und danach entweder bei -20°C gelagert oder direkt mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (siehe Kapitel 3.2.3 und 3.2.6). Der zu detektierende Interaktionspartner richtet sich nach dem Pulldown, bei Pulldown von CXCR4 wird CD74 im Western Blot nachgewiesen und vice versa. Zur Kontrolle der Effizienz des Pulldowns kann auch dieses Protein zusätzlich im Western Blot detektiert werden.

Für die semi-endogene Koimmunpräzitation wurden sechs Millionen transient mit dem Plasmid pCD74minRTS transfizierte HEK293-Zellen eingesetzt. Der verwendete Antikörper für den *Pulldown* war ein anti-CD74-Antikörper der Firma BD Pharmingen. Für die Detektion des CXCR4 auf der Blotmembran wurde ein anti-CXCR4-Antikörper der Firma Sigma verwendet. Zur Kontrolle der Effizienz des *Pulldowns* wurde CD74 mittels eines anti-CD74-Antikörpers der Firma Santa Cruz Biotechnology auf der Blotmembran detektiert.

Für die endogene Koimmunpräzitation musste das Zellsystem zugunsten der humanen Monozytenzelllinie MonoMac6 gewechselt werden, da HEK293-Zellen endogen kein CD74 exprimieren (siehe Kapitel 4.9.1). Es wurden zehn Millionen Zellen für die Koimmunpräzitation eingesetzt. Ein anti-CD74-Antikörper der Firma BD Pharmingen wurde für den *Pulldown* des endogenen CD74 verwendet. CXCR4 wurde mittels Western Blot Analyse auf der Blotmembran nachgewiesen. Der hierbei verwendete Antikörper war ein anti-CXCR4-Antikörper der Firma Sigma.

### 3.2.6 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine nach ihrer Auftrennung gemäß ihrer molekularen Masse in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran übertragen. Durch die Methode der Immundetektion können anschließend bestimmte Proteine über Antikörper spezifisch nachgewiesen werden.

Bei der hier verwendeten Methode des *Tank-Blots* wurden vor Aufbau des *sandwiches* alle Schwämme und Filterpapiere, sowie die Nitrozellulosemembran in NuPage *transfer buffer*, der als *Blotting* Puffer diente, getränkt und dann blasenfrei von Kathode bis Anode in folgender Reihenfolge übereinandergeschichtet: Schwämme, Filterpapier, Polyacrylamidgel, Nitrozellulosemembran, Filterpapier, Schwämme.

Die Kammer wurde geschlossen und in das *XCell II Blot Module* eingehängt. Der Kammerinnenraum wurde mit *Blotting* Puffer gefüllt und der Außenraum mittels Eis und Eiswasser gekühlt. Bei einer angelegten Spannung von 35 V betrug die Laufzeit 90 min.

### 3.2.7 Immundetektion

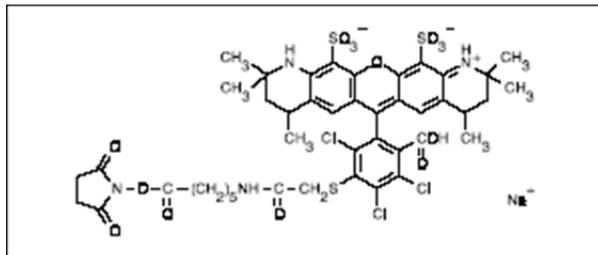
Im Anschluss an den Blotvorgang erfolgte die Immundetektion, bei der Proteine spezifisch über Antikörperbindung nachgewiesen werden können. Im ersten Schritt wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran durch Inkubation in 1%-iger BSA-Lösung abgesättigt. Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung der BSA-Lösung hinzugesetzt und die Transfermembran für 2 h bei RT oder bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Um unspezifisch gebundene Antikörper abzulösen, wurde die BSA-Lösung mit dem Primärantikörper abgegossen und die Nitrocellulosemembran unter mehrmaligem Wechsel des Immunoblot-Waschpuffers für mindestens 30 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechend verdünnten Sekundärantikörper ebenfalls in 1%-iger BSA-Lösung für 1 h bei RT. Der Sekundärantikörper richtete sich immer spezifisch gegen den konstanten Teil, F<sub>C</sub>-Fragment, des Primärantikörpers und war stets mit dem Enzym HRP konjugiert. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Transfermembran erneut für mindestens 30 min unter mehrmaligem Wechsel des Immunoblot-Waschpuffers gewaschen, bevor die Detektion der zu untersuchenden Proteinbanden am *Las3000 Image Reader* durchgeführt wurde. Hierzu wurden die beiden Komponenten des Super Signal West Dura Extended Duration Signal-Kits unmittelbar vor der Detektion im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Transfermembran gegeben. Das mit dem Sekundärantikörper konjugierte Enzym HRP kann diese Substratlösung unter Aussendung von Chemilumineszenz umsetzen. Diese kann im *Las3000 Image Reader* an all diejenigen Stellen, an denen der Sekundärantikörper auf der Membran gebunden ist, detektiert werden, sodass die entsprechenden Banden des Proteins auf dem Foto des Blots sichtbar werden.

### 3.2.8 Markierung von huMIF bzw. huD-DT mit Alexa-Fluor 546 und Reinigung über Gelfiltration

Dem verwendeten Kit zur Markierung von Proteinen mit dem fluoreszierenden Farbstoff Alexa-Fluor 546 liegt das Prinzip der Chromatographie zugrunde. Unter Chromatographie versteht man in der Chemie ein Verfahren zur Auftrennung eines Stoffgemischs durch unterschiedliche Verteilung seiner Einzelbestandteile zwischen einer mobilen und einer stationären Phase. Unter Berücksichtigung der weiteren Einteilung der chromatographischen Methoden nach ihrem Trennprinzip bzw. nach den verwendeten Phasen handelt es sich hierbei um eine Flüssigchromatographie in Form einer Säulenchromatographie. Das Trennprinzip bei der Gelfiltration basiert auf der Größe der Moleküle. Das Material der Trennsäule enthält viele kleine Kügelchen eines porösen hochvernetzten Polymers, in dessen Poren kleinere Moleküle besser hineindiffundieren können als entsprechend größere. Dies hat zur Folge, dass größere Moleküle eher von der Säule eluiert werden können als kleinere, weil

sie im Gegensatz zu den kleineren an den Kügelchen vorbei durch die Säule laufen, während die kleineren den zusätzlichen Weg durch die Kügelchen nehmen.

Für die beiden Markierungsreaktionen wurde das Alexa-Fluor 546 Protein Labeling-Kit von Invitrogen verwendet und die Markierung gemäß der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Zur Markierung von huMIF mit Alexa-Fluor 546 wurden jeweils ca. 1,5 ml huMIF einer Konzentration von ca. 200 µg/ml benötigt. Für die Markierung des huD-DT aus Yale wurden 800 µl einer Konzentration von ca. 450 µg/ml verwendet.



**Abbildung 18: Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa Fluor 546.** Abbildung entnommen aus dem Manual des Alexa-Fluor 546 Protein Labeling-Kits von Invitrogen.

Nach Ende der Säulenchromatographie wurde das markierte Protein von der Säule eluiert und mehrere Fraktionen in UV-Küvetten aufgefangen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den verschiedenen Fraktionen wurde deren Absorption bei 280 nm im BioPhotometer der Firma Eppendorf gemessen. Anschließend wurden alle Fraktionen, die Protein enthielten, gepoolt und in ein Stück Dialyseschlauch überführt. Dieser wurde zur Dialyse des markierten Proteins auf die Oberfläche von 5 l Natrium-Phosphatpuffer gelegt und bei leichtem Rühren ü.N. in den Kühlraum bei 4°C gestellt. Die Methode der Dialyse dient dazu, kleine Moleküle, die mit dem markierten Protein von der Säule eluiert wurden, durch Diffusion zu entfernen. Im Anschluss an die Dialyse wurde das Protein aus dem Dialyseschlauch in ein durch Alufolie lichtgeschütztes Reaktionsgefäß überführt und seine Konzentration gemäß der Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (Kapitel 3.2.1) am UV-Spektrophotometer ermittelt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C.

### 3.3 Fluoreszenzbasierte Techniken

#### 3.3.1 Durchflusszytometrie

Der Begriff Durchflusszytometrie beschreibt ein Verfahren zur Messung der Eigenschaften von Zellen. Häufig wird die Durchflusszytometrie auch irreführend als FACS, *fluorescence activated cell sorting*, bezeichnet. Das Verfahren beruht auf der Interpretation emittierter optischer Signale seitens der Zelle, nachdem diese einen Laserstrahl passiert hat.

In einer Lösung befindliche Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und danach einzeln von einem Laserstrahl angeregt. Aufgrund der emittierten Fluoreszenzimpulse und des Streulichts, das abhängig ist von der Zellgröße, der Struktur der Zellmembran und der Granularität der Zelle sind Rückschlüsse auf unterschiedliche Eigenschaften der Zellen

möglich. Relevante Parameter bei der FACS-Analyse sind das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter, FCS*) und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter, SSC*). Das Vorwärtsstreulicht entsteht durch Beugung des Lichts und ist ein Maß für die Zellgröße, wohingegen das Seitwärtsstreulicht durch Brechung des Lichts hervorgerufen wird und als Maß für die Granularität dient.

Mit Hilfe des Verfahrens der Durchflusszytometrie erfolgte die Analyse von CD74- und/oder CXCR4-Rezeptoren auf der Oberfläche von HEK293-, HtTA1-, MonoMac6- und Jurkat T-Zellen. Zu diesem Zweck erfolgte die Markierung der Rezeptoren mit Primärantikörpern, die anschließend spezifisch durch FITC-konjugierte Sekundärantikörper detektiert werden konnten oder aber direkt über einen FITC-konjugierten Primärantikörper.

Im ersten Schritt wurden die zu untersuchenden Zellen mittels Accutase vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst und jeweils 200.000 Zellen in drei Reaktionsgefäße überführt. Nach Zusatz eines geringen Volumens an Medium wurden die Zellen zur Freilegung ihrer Oberflächenproteine für 30 min unter leichtem Schütteln im Thermomixer bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Zellpellet nach fünfminütiger Zentrifugation bei 200 *rcf* (*relative centrifugal force*) und 4°C und vorsichtigem Entfernen des Überstands in FACS-Puffer resuspendiert. Das Volumen des FACS-Puffers richtete sich nach der Art des Ansatzes und der Wahl der verwendeten Antikörper. Bei Durchführung der FACS-Analyse mit Primär- und Sekundärantikörpern waren folgende Parallelansätze nötig: 1. unbehandelte Zellen, 2. Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper behandelt wurden und 3. Zellen, die mit Primär- und Sekundärantikörper behandelt wurden, und die Arbeitsschritte waren wie folgt. Das Zellpellet der ersten beiden Ansätze wurde in jeweils 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, während die Zellen des dritten Ansatzes in 100 µl einer 1:200 mit FACS-Puffer verdünnten Lösung des Primärantikörpers anti-CD74 der Firma BD Biosciences resuspendiert wurden. Nach einstündiger Inkubation der drei Ansätze auf Eis erfolgten zwei bis drei Waschzyklen der Zellen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Jeder Waschzyklus bestand aus den folgenden drei Schritten: 1. Zugabe von 400 µl FACS-Puffer, 2. fünfminütige Zentrifugation bei 200 *rcf* und 4°C und 3. Abnahme des Überstands. Nach dem letzten Waschzyklus wurde das Zellpellet des ersten Ansatzes in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Diejenigen der beiden anderen Ansätze wurden in 100 µl einer 1:100 mit FACS-Puffer verdünnten Lösung des Sekundärantikörpers FITC-anti-Maus resuspendiert. Einer 30-minütigen Inkubation der Reaktionsgefäße im Dunkeln folgte ein Waschzyklus des zweiten und dritten Ansatzes. Dieser diente dazu, ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellpellets in jeweils 400 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die fertigen Proben wurden in FACS-Röhrchen überführt und am FACS Canto Flow Cytometer gemessen. Für den Fall, dass die Messung nicht innerhalb einer Stunde nach Ende der Probenvorbereitung durchgeführt werden konnte, wurden die Zellpellets statt in 400 µl FACS-Puffer in einem 1:1 Gemisch aus FACS-Puffer und Paraformaldehyd aufgenommen und fixiert. So konnten sie bis zu ihrer Messung bei 4°C aufbewahrt werden.

Bei Verwendung eines FITC-konjugierten Primärantikörpers für die FACS-Analyse verkürzt sich der Arbeitsaufwand enorm. Während die ersten beiden Ansätze denjenigen aus der Behandlung mit Primär- und Sekundärantikörpern entsprachen, wurde für den dritten Ansatz

direkt ein FITC-konjugierter anti-CD74-Antikörper oder ein FITC-konjugierter anti-CXCR4-Antikörper verwendet. Während der FACS-Analyse wurde für jede Probe sowohl ein Dot-Plot, als auch ein Histogramm erstellt. Der Dot-Plot zeigt das Vorwärtsstreulicht (FCS) gegen das Seitwärtsstreulicht (SSC) bzw. die Zellgröße gegen die Granularität graphisch aufgetragen. Daraus kann die Überlebensrate der Zellen sowie das eventuelle Vorhandensein verschiedener Populationen innerhalb der Probe abgelesen werden. Im Histogramm wird die Menge emittierter Fluoreszenzimpulse der Zellen dargestellt. Diese entstehen durch Emission von Strahlung nach Anregung der auf der Oberfläche gebundenen FITC-konjugierten Sekundärantikörper. Die Höhe des Peaks resultiert aus der Anzahl der Zellen mit einem bestimmten Maß an Emission. Die Lage auf der x-Achse symbolisiert die Menge an Fluoreszenzimpulsen, d.h. je weiter nach rechts verschoben, desto mehr Fluoreszenzimpulse wurden gemessen. Dies bedeutet wiederum, dass mehr CD74- bzw. CXCR4-Moleküle auf der Oberfläche vorhanden sind.

### 3.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie handelt es sich um eine spezielle und moderne Form der Lichtmikroskopie. Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht darauf, dass im zu untersuchenden Präparat befindliche fluoreszierende Stoffe, sogenannte Fluorochrome, durch Licht bestimmter Wellenlänge zur Emission angeregt werden. Die Anregungswellenlänge ist dabei aufgrund des Stoke-Shifts meist kurzwelliger als die Wellenlänge des emittierten Lichts.

Für die mikroskopischen Aufnahmen in digitaler Form wurde in der vorliegenden Arbeit u.a. das Fluoreszenzmikroskop IX50 der Firma Olympus verwendet. Die Aufnahmen der Zellen wurden mit dem 60x Objektiv unter Verwendung von Öl angefertigt. Als Lichtquelle dient bei diesem Mikroskop eine Quecksilberdampfampe. Durch Auswahl der optischen Filter WIGA, WG und NU wird nur die für die Anregung des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs nötige Wellenlänge isoliert und auf das Präparat geleitet, worauf dieses zu fluoreszieren beginnt. Bei Auswahl des Filters WIGA wurde das Objekt mit Licht des blauen Wellenlängenbereichs angeregt und emittierte Licht aus dem grünen Wellenlängenbereich. Dieser Filter diente in den Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays meistens zur Anregung der in der Membran des späten Endosoms lokalisierten GTPase Rab7, die durch Fusion mit dem fluoreszierenden Protein GFP markiert war. Alternativ wurde das in der Membran der frühen Endosomen lokalisierte Protein Rab5, das mittels Klonierung ebenfalls als Fusionsprotein mit GFP markiert wurde, durch Anregung sichtbar gemacht. Durch Auswahl des Filters WG konnte das mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff Alexa-Fluor 546 markierte huMIF, sowie mit demselben Fluorochrom markiertes Transferrin und alternativ DiI-AcLDL oder Alexa<sup>555</sup>-Choleratoxin B in den Zellen lokalisiert werden. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde gegebenenfalls die DNA mit Hoechst33342 markiert. Hoechst33342 läßt sich mit ultraviolettem Licht einer Wellenlänge von 350 nm anregen. Sein Emissionsmaximum liegt bei ca. 461 nm, d.h. im Bereich des blauen Lichts. Am Fluoreszenzmikroskop musste der Filter NU ausgewählt werden.

Von den Proben aus den verschiedenen Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays wurden jeweils von mehreren Zellen Aufnahmen zur Detektion der grünen, roten und blauen

Fluoreszenz, sowie ein Durchlichtbild angefertigt. Anschließend wurden die Bilder der verschiedenen Fluoreszenzen übereinandergelegt, um Aussagen über die Kolokalisation von Alexa<sup>546</sup>-MIF, Alexa<sup>546</sup>-Transferrin, Alexa<sup>555</sup>-Choleratoxin B oder DiI-acetyliertem LDL (rot) mit den frühen oder späten Endosomen (grün) machen zu können. Zusätzlich zur visuellen Analyse wurde die Cell<sup>F</sup> Software der Firma Olympus zur Bestimmung der Kolokalisation verwendet.

### 3.3.3 *Live imaging* und Konfokalmikroskopie

Die *live imaging*-Technologie ermöglicht Vorgänge in der lebenden Zelle „*live*“ zu verfolgen. Diese Technologie wurde dazu genutzt, die Endozytose von mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 546 markiertem huMIF in MEF-Zellen über einen Zeitraum von drei Stunden zu beobachten. Des Weiteren wurden verschiedenste Kolokalisationsstudien zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und den Proteinen Alexa<sup>488</sup>-Choleratoxin B, Alexa<sup>488</sup>-Transferrin oder Alexa<sup>488</sup>-AcLDL, zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und seinen beiden Rezeptoren CFP-CXCR4 und YFP-CD74minRTS, sowie die Kolokalisation von Alexa<sup>546</sup>-MIF, CFP-CXCR4 und YFP-CD74minRTS mit den Lysosomen mit Hilfe der *live imaging*-Technologie untersucht.

Außer den Experimenten zur Analyse der Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Rab7GFP in MEF-Zellen und denjenigen zur Analyse einer möglichen Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-Choleratoxin B in HEK293-Zellen, die am LSM510 durchgeführt wurden, wurden alle übrigen *live imaging*-Experimente am Konfokalmikroskop LSM710 durchgeführt. Die MEF-Zellen wurden zwei Tage vor Behandlung mit Alexa<sup>546</sup>-MIF und der Aufzeichnung der Bildabfolge am Konfokalmikroskop mittels der Methode der Nucleofektion nach Amaxa mit dem Plasmid pEGFP-C1-Rab7 transfiziert (Kapitel 3.4.7.1). Die Inkubationsdauer der transfizierten Zellen ist notwendig, um eine ausreichende Expression des Plasmids pRab7GFP und damit ein hinreichendes Maß an grüner Fluoreszenz von der Membran der späten Endosomen ausgehend zu erreichen. HEK293-Zellen mussten mindestens einen Tag vor dem Experiment auf sterilen Deckgläschen ausgesät werden.

Für das *live imaging* wurde das sterile Deckgläschen, auf dem die MEF-Zellen bzw. die HEK293-Zellen wuchsen, vorsichtig aus der Gewebekulturschale entnommen und in eine spezielle Apparatur eingespannt. Nach Zugabe von 1 ml Zellkulturmedium wurde die innere Zellkammer geschlossen und in einen speziellen Aufsatz für das Konfokalmikroskop - extra für Lebendaufnahmen von Zellen - eingebracht. Dieser Aufsatz in Form einer Kammer kann wie auch das Objektiv und die durch die Kammer geleitete Luft beheizt werden. Um für die lebenden Zellen optimale Bedingungen zu schaffen, wurde für Objektiv und Luft eine Temperatur von 37°C und für die gesamte Kammer eine Temperatur von 39°C möglichst konstant gehalten. Zur Simulation der natürlich vorkommenden Umweltbedingungen wurde zusätzlich ein Gehalt von 8% CO<sub>2</sub> für den Innenraum der Kammer ausgewählt. Bevor das Experiment gestartet werden konnte, mussten die beiden Lampen am Konfokalmikroskop auf Betriebstemperatur gebracht werden, die notwendigen Filter am Mikroskop für den Rot- und Grünkanal ausgewählt werden und diverse andere Einstellungen getätigt werden. U.a. wurden die Scangeschwindigkeit, die Scanzeit, die Pixelgröße, das Pinhole, der Detektionswellenlängenbereich für die Emissionsstrahlung des roten und grünen Kanals, die

Laserexcitation und viele weitere Einstellungen wie gewünscht ausgewählt. Besonders wichtig für die Aufnahme der Bilderserie ist die Einstellung „*Time Series Control*“. Hier konnte ausgewählt werden, über welchen Zeitraum und in welchem Zeitabstand die Bildaufnahmen gemacht werden sollten.

Bei dem verwendeten Konfokalmikroskop LSM510 handelt es sich um das Axiovert 100 M der Firma Zeiss. Die übrigen oben erwähnten Kolokalisationsstudien wurden an einem zweiten Konfokalmikroskop, dem LSM710, was u.a. über einen besseren Rotkanal verfügt, angefertigt. Hierbei handelt es sich um den Nachfolger des LSM510, ebenfalls der Firma Zeiss. Für die Mikroskopie wurden MEF- oder HEK293-Zellen entweder mit den Plasmiden pEYFP-CD74minRTS und pECFP-CXCR4 zwei Tage vorher transfiziert oder einen Tag vorher auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Das sterile Deckgläschen mit den angewachsenen MEF- oder HEK293-Zellen wurde in eine entsprechende Apparatur eingespannt, die Zellen mit vorgewärmtem Medium ohne Phenolrot versorgt und die Apparatur in die Lebendkammer bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf dem LSM710 montiert. Nach Auswahl aller erforderlichen Einstellungen (s.o.) konnte der jeweilige Versuch durch gleichzeitige Zugabe der Proteine Alexa<sup>488</sup>-Transferrin oder Alexa<sup>488</sup>-AcLDL und Alexa<sup>546</sup>-MIF, Zugabe von LysoSensorGreen oder LysoTrackerRed und Alexa<sup>546</sup>-MIF oder nur Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF ins Medium gestartet werden. Über die Funktionen „*Time Series*“, „*z-stack*“ und „*multi positions*“ kann zusätzlich ein Zeitintervall, nach dem die Bildaufnahme erfolgen soll, eingestellt werden z.B. alle 4 min (*Time Series*), eine oder mehrere Zellen schichtweise durchgescannt werden, so dass alle Ebenen einer Zelle gesichtet werden können (*z-stack*) oder auch mehrere Positionen auf einem Deckgläschen nacheinander immer wieder angefahren werden und die dortigen Zellen gescannt werden (*multi positions*).

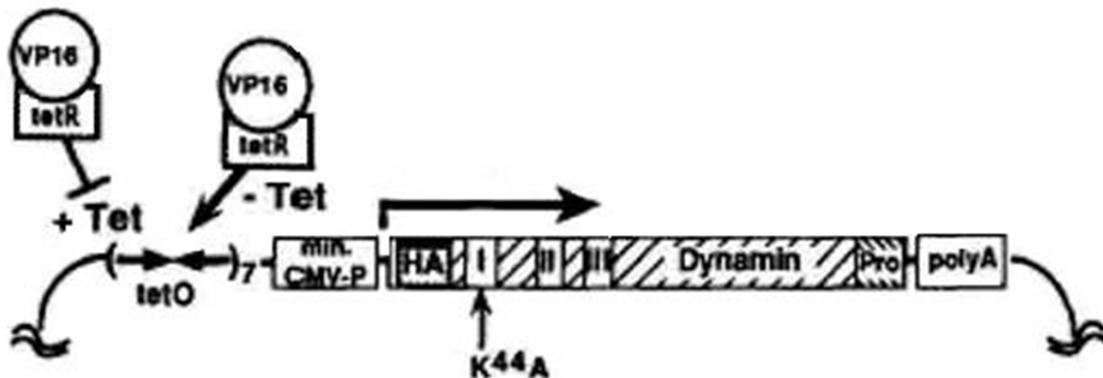
Der Unterschied zwischen einem „normalen“ Fluoreszenz- oder Lichtmikroskop und einem Konfokalmikroskop besteht darin, dass beim Konfokalmikroskop nur die Punkte der Schicht eines Objekts, die in der Fokalebene liegen, aufgenommen werden. Mit dem Konfokalmikroskop können virtuelle Schnitte durch ein Objekt erzeugt werden, die durch geeignete Software wieder zu einer räumlichen Darstellung zusammengesetzt werden können. Im Gegensatz zum „normalen“ Fluoreszenzmikroskop ist es daher möglich bei einer Aufnahme eine genaue Aussage darüber zu treffen, ob zwei Komponenten in einer oder mehreren Ebenen liegen. Dies ist für die Auswertung der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit besonders wichtig, um sicherzugehen, dass auf den Bildern vom Fluoreszenzmikroskop scheinbar kolokalisierte Komponenten tatsächlich kolokalisiert sind und nicht übereinander in verschiedenen Ebenen liegen.

### 3.4 Zellbiologische Techniken

#### 3.4.1 Zelllinien und ihre Kultivierung

In den Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays wurden MEF-wt-, HEK293- und HtTA1-Zellen verwendet. Bei den MEF-wt-Zellen handelt es sich um *mouse embryonic fibroblasts*. Die Abkürzung HEK bei den HEK293-Zellen steht für *human embryonic kidney*,

d.h. es handelt sich hierbei um Zellen aus der menschlichen Niere. HtTA1-Zellen sind HeLa-Zellen (*human cervical carcinoma cells*), die stabil mit dem Plasmid pUHD10-3 transfiziert sind<sup>308</sup>. Das Plasmid pUHD10-3 exprimiert den tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA), der durch Fusion des *tet* Repressors (*tetR*) mit der aktivierenden Domäne des Virion Proteins 16 (VP16) des Herpes Simplex Virus entstand. tTA wird konstitutiv in den HeLa Zellen exprimiert und stimuliert die Transkription eines hinter einem tTA-abhängigen Minimalpromotor liegenden Gens<sup>309</sup>. Diese Möglichkeit zur Kontrolle der Expression eines Gens wird in den Versuchen zur Überprüfung der Abhängigkeit der MIF-Endozytose von der Funktionalität des Dynamins ausgenutzt. Bei den dort verwendeten Dynamine-Plasmiden ist das Gen für das HA-getaggte Dynamine, wt oder dn, unter der Kontrolle eines CMV-Minimalpromotors. Stromaufwärts von diesem Minimalpromotor liegen die Tetrazyklin-Operator-Sequenzen (*tetO*), an die in Abwesenheit eines Tetrazyklins der tTA binden kann, so dass der Promotor aktiv ist und das Gen abgelesen werden kann<sup>80</sup>.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung des tetrazyklin-abhängigen Plasmids pUHD10-3.** Dieses Plasmid erlaubt eine induzierbare Expression des am N-Terminus HA-getaggten Dynamins. Durch Bindung des tetrazyklin-kontrollierten Transaktivators (bestehend aus dem Virion Protein 16 aus Herpes Simplex Virus (VP16) und dem Tetrazyklinrepressor (*tetR*), der konstitutiv in transfizierten HtTA1-Zellen exprimiert wird, wird die Expression des Dynamins reguliert. Ohne Tetrazyklin kann der Transaktivator an die Tetrazyklin-Operator-Sequenzen (*tetO*) stromaufwärts vom CMV-Promotor binden und die Transkription des Dynamins-Gens wird initiiert. In Anwesenheit von Tetrazyklin kann der Transaktivator nicht an die Tetrazyklin-Operator-Sequenzen binden, wodurch eine Transkription des Gens nicht stattfindet. Die drei GTP-Bindeelemente des Dynamins sind mit I-III dargestellt, die Punktmutation im ele1-Element des mutierten Dynamins ist durch K44A und der Pro/Arg reiche C-Terminus durch Pro gekennzeichnet. (Abbildung entnommen aus<sup>80</sup>).

Bei allen drei oben genannten Zelllinien handelt es sich um adhären wachsende Zellen. Für die FACS-Analysen wurden zusätzlich zu den HEK293- und HtTA1-Zellen, MonoMac6-Zellen und Jurkat T-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um humane Monozyten aus akuter myeloischer Leukämie, die große Mengen an CD74 und CXCR4 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und um humane T-Zellen. Beiden gemeinsam ist, dass sie zu den Suspensionszellen gehören. Für die Koimmunpräzipitationsversuche wurden HEK293- und MonoMac6-Zellen verwendet. Für die diversen Western-Blot-Analysen z.B. zur Bestimmung des Proteinlevels an Clathrin oder Caveolin-1 wurden zusätzlich die humanen Monozyten THP-1, sowohl als Suspensionszelle, als auch nach Differenzierung zu Makrophagen, die NK/T-Zellen YT2C2 und die humane Krebszelllinie MB-MDA231 verwendet. Die AKT-Aktivierungsassays fanden in Jurkat T-Zellen, HtTA1-Zellen und den primären humanen

Dermalfibroblasten (F277) statt. Der Akt-IP-Kinase Assay der Firma Cell Signaling wurde ebenfalls in Jurkat T-Zellen durchgeführt. Für die MTT-Assays zur Überprüfung der Zytotoxizität von CPZ wurden HtTA1-Zellen benutzt.

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden stets unter Reinluftwerkbänken der Sicherheitsstufe 2 mit sterilen Medien, Lösungen und Arbeitsmaterialien getätigt, um Kontaminationen der Zelllinien und Primärzellen zu verhindern. Zur Kultivierung der Zellen diente ein CO<sub>2</sub>-Inkubationsschrank mit einer konstanten Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%. Als Vollmedium wurde für die Zelllinien und die Primärzellen die in der folgenden Tabelle 2 angegebenen kommerziell erhältlichen Medien und Zusätze verwendet. Die Art der Ablösung, sowie die Beschaffenschaft der Zelle (adhärent oder schwimmend) kann der Tabelle 2 entnommen werden.

Bei einer Konfluenz von 80 bis 95% wurden die Zelllinien passagiert. Für die Experimente wurde darauf geachtet, dass bei den Zelllinien eine Passage von maximal 30, bei den Primärzellen von maximal 15 nicht überschritten wurde.

### **3.4.2 Subkultivierung adhärenter Zelllinien**

Zur Ablösung adhärenter Zellen vom Boden ihrer Gewebekulturflasche oder -schale wurden sie mit Trypsin/EDTA (HtTA1, MEF, F277, MB-MDA231) oder Ca-Mg-freiem Medium (HEK293) kurzzeitig inkubiert und bei 1250 rpm, 5 min pelletiert. Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellen in Medium resuspendiert und ein Teil von ihnen mit 20 ml frischem Medium in eine neue Gewebekulturflasche überführt. Von den HtTA1-Zellen wurden je nach Bedarf 1:2 bis 1:40 der Gesamtzellen, von den MEF-Zellen und MB-MDA231-Zellen je 1:2 bis 1:20 der Gesamtzellen weiterkultiviert. Bei den HEK293-Zellen richtete sich die Menge der weiterzukultivierenden Zellen nach den Tagen in Kultur bis zur Wiederverwendung, dabei nimmt man 1:10 pro Tag in Kultur, was bei drei Tagen z.B. 1:30 bedeutete. Bei den primären humanen Dermalfibroblasten (F277) ist darauf zu achten, dass sie nicht zu dünn ausgesät werden (1:2 bis 1:5).

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Zellen und ihre Medien

<i>Zelllinie</i>	<i>Medium</i>	<i>Zusätze</i>	<i>Art der Ablösung</i>	<i>Adhärent oder schwimmend?</i>
F277	D-MEM	10% FCS, 1% P/S, 1% Na-Pyruvat	Trypsin/EDTA	adhärent
HEK293	D-MEM	10% FCS, 1% P/S, 1% Na-Pyruvat	Ca-Mg-freies Medium	adhärent
HtTA1	D-MEM	10% FCS, 1% P/S, 1% Na-Pyruvat	Trypsin/EDTA	adhärent
Jurkat T	RPMI 1640	10% FCS, 1% P/S, 1% Na-Pyruvat	-	schwimmend
MB-MDA231	D-MEM	10% FCS, 1% P/S, 1% Na-Pyruvat	Trypsin/EDTA	adhärent
MEF	D-MEM	10% FCS, 1% P/S, 1% Na-Pyruvat	Trypsin/EDTA	adhärent
MonoMac 6	RPMI 1640	10% FCS, 1% P/S, 1% NEAA, 9 µg/ml Insulin (10 µg/ml), 1 mM Na-Pyruvat	-	schwimmend
THP-1	RPMI 1640	10% FCS, 1% P/S	-	schwimmend
YT2C2	RPMI 1640	10% FCS, 1% P/S	-	schwimmend

### 3.4.3 Subkultivierung von Suspensionszellen

Für die Weiterkultivierung aller Suspensionszellen werden diese pelletiert (1250 rpm, 5 min) und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Als nächstes empfiehlt sich eine Bestimmung der Zellzahl (Kapitel 3.4.5), so dass ca. 300 000 Zellen/ml (MM6, THP-1) in eine neue Gewebekulturflasche mit 20 ml Medium überführt werden können. Für die YT2C2-NK/T-Zellen hat sich eine Passagierung von 1:4 als gut herausgestellt, bei Jurkat T-Zellen eignet sich 1:2 bis 1:20.

### 3.4.4 Auftauen von Zellen

Zur Anzucht von kryokonservierten Zelllinien wurden die entsprechenden Kryoröhrchen aus der -152°C Gefriertruhe entnommen und schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um das für die Zellen toxisch wirkende DMSO im Einfriermedium möglichst effizient zu entfernen, wurden die Zellen mit 10 ml vorgewärmtem Medium in einem Greiner-PP-Röhrchen zusammengegeben und bei 1250 rpm für 5 min abzentrifugiert. Nach Entfernen des

Überstands wurde das Zellpellet in 500 µl Medium resuspendiert und zu 20 ml Medium in eine Gewebekulturflasche gegeben.

### 3.4.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden adhärente Zellen mit Trypsin/EDTA oder Ca-Mg-freiem Medium je nach Zelllinie vom Boden einer Gewebekulturflasche oder -schale abgelöst, die Zellsuspension mit einem entsprechenden Volumen an vorgewärmtem Medium versetzt und bei 1250 rpm für 5 min abzentrifugiert. Suspensionszellen konnten direkt abzentrifugiert werden. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in einem beliebigen Volumen an Medium resuspendiert und 10 µl der Zellsuspension in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer der Abmessung 0,05 cm x 0,05 cm x 0,100 cm (Höhe x Breite x Tiefe) gegeben. Bei einer 10 x Vergrößerung wurden am Mikroskop die vier äußeren Großquadrate ausgezählt, wobei Zellen auf dem linken und oberen Rand mitgezählt wurden, während solche auf dem unteren oder rechten Rand bei der Zählung vernachlässigt wurden.

Die Zellzahl pro ml ergibt sich aus der folgenden Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = x * \frac{1}{4} * 10^4 \quad x: \text{Anzahl gezählter Zellen}$$

### 3.4.6 Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung eukaryotischer Zellen sollten diese nicht ganz konfluent sein und eine Viabilität von 80-95% besitzen.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA oder Ca-Mg-freiem Medium je nach Zelllinie vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst, mit einem gleichen Volumen Medium versetzt und für 5 min bei 1250 rpm abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen in einem beliebigen Volumen resuspendiert und die Zellzahl wie üblich (Kap. 3.4.5) bestimmt. Die Zellen wurden in Einfriermedium aufgenommen und mit einer Zellzahl von 2 Millionen Zellen pro Mililiter in Kryoröhrchen über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in die -152°C Gefriertruhe überführt.

### 3.4.7 Transiente Transfektionen

Transfektionen dienen der Einbringung und Expression zellfremder DNA in kultivierbare Zelllinien oder Primärzellen. Die transiente Transfektion unterscheidet sich von der dauerhaften oder stabilen Transfektion in soweit, als dass transient transfizierte Zellen ihre aufgenommene DNA mit der Zeit durch Proliferation und Zellteilung wieder herausverdünnen und schließlich ganz verlieren. Der verwendeten Zelllinie oder des Primärzelltyps entsprechend wurden unterschiedliche Methoden für die transiente Transfektion ausgewählt.

### 3.4.7.1 *Transiente Transfektion von mouse embryonic fibroblasts (MEFs)*

Für die transiente Transfektion von MEF-WT-Zellen wurde die Nucleofector Technologie der Firma Amaxa genutzt. Hierbei handelt es sich um eine neue Transfektionstechnologie, die besonders an die Bedürfnisse von primären und schwierig zu transfizierenden Zelllinien angepasst ist. Durch individuell auf die entsprechende Zelllinie abgestimmte Lösungen und einzigartige Kombination der elektrischen Parameter über die Wahl des Transfektionsprogramms sollen optimale Bedingungen für die Nucleofection geschaffen werden. Die Nucleofection kann als Elektroporation verstanden werden, bei der durch Einsatz spezieller Lösungen für die Zelllinie der Transport der DNA in den Zellkern erleichtert wird.

Nach Ablösen der Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche durch Zugabe von Trypsin/EDTA, anschließender Zentrifugation und Bestimmung der Zellzahl pro Mililiter wurde das Volumen an Zellsuspension, das der gewünschten Zellzahl (meistens  $4 \cdot 10^6$ ) entspricht, erneut abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden 81,8  $\mu$ l MEF2 Nucleofector Solution mit 18,2  $\mu$ l Supplement MEF2, beide aus dem MEF2 Nucleofector Kit, in einem Reaktionsgefäß vereinigt und mit 5  $\mu$ g DNA des pRab7GFP-Plasmids versetzt. Zusätzlich wurde eine 10 cm Gewebekulturschale mit vorgewärmtem Zellkulturmedium gefüllt. Dabei richtete sich das Volumen nach der Anzahl der für den Versuch benötigten *wells*. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgenommen und das Zellpellet in dem Gemisch aus Transfektionspuffer und Plasmid-DNA resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in eine Küvette gegeben und diese in das Gerät Nucleofector I der Firma Amaxa gestellt. Nach Auswahl des Programms A-23 konnte die Nucleofection durch Drücken der Taste „X“ gestartet werden. Anschließend wurde die Küvette wieder aus dem Gerät entnommen, mit vorgewärmtem Medium mehrmals gespült und die transfizierten Zellen zusammen mit dem Medium in die vorbereitete 10 cm Gewebekulturschale überführt. Nach sorgfältigem Verteilen der Zellen im Medium wurden sie gleichmäßig auf die *wells* von Multiwell-Platten übertragen.

### 3.4.7.2 *Transiente Transfektion von HEK293-Zellen*

Zur transienten Transfektion der HEK293-Zellen wurden diese mit einer Zellzahl von  $10^6$  pro 10 cm-Schale 24 h vor Transfektion ausgesät und bei 37°C inkubiert. Für die Transfektion der HEK293-Zellen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

Die erste Variante bestand darin ein kommerziell erhältliches Transfektionsreagenz, FuGENE HD, zu verwenden. Dafür wurden folgende Komponenten in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert (pro eingesetztem  $\mu$ g Plasmid-DNA, 1  $\mu$ l FuGENE HD und 50  $\mu$ l OptiMEM I) und nach Mischen der Komponenten durch kurzes Vortexen (ca. 30 sec) 5 bis 10 min bei RT inkubiert, bevor das DNA-FuGENE-Gemisch nach Reduzieren des Zellmediums auf 5 ml tropfenweise zu den Zellen gegeben wurde. Bei Transfektionen für anschließende Koimmunpräzipitationen wurden pro eingesetztem  $\mu$ g Plasmid-DNA, 2  $\mu$ l FuGENE HD und 100  $\mu$ l OptiMEM I verwendet.

Bei der zweiten Variante wurde die Calcium-Phosphat-Methode verwendet. Hierfür wurden 500  $\mu$ l 0,25 M  $\text{CaCl}_2$  (450  $\mu$ l Medium, 50  $\mu$ l 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ ) mit 20  $\mu$ g zu transfizierender Plasmid-DNA in einem Reaktionsgefäß gemischt und für 10 bis 20 min bei RT inkubiert. In 2x HeBS wurde mit Hilfe einer Pipette mehrmals Luft sprudelnd eingeblasen, bevor 500  $\mu$ l

langsam zur DNA-Mischung in das Reaktionsgefäß gegeben wurden. Nach Mischen aller Komponenten wird die Lösung langsam am inneren Rand der Kulturplatte unter Drehen zu den Zellen gegeben und durch Schwenken verteilt. Das Medium wird nach einer Inkubation für 4 bis 6 h gewechselt und die Zellen anschließend für 48 h weiterkultiviert.

### **3.4.7.3 Transiente Transfektion von HtTA1-Zellen (HeLa)**

Zur transienten Transfektion der humanen HtTA1-Zellen wurden zwei unterschiedliche Transfektionsreagenzien verwendet.

Für die transiente Transfektion von HtTA1-Zellen in den Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Inhibitoren der GTPase Dynamamin (Kap. 3.4.8.5), bei denen die Abhängigkeit der MIF-Endozytose von der Funktionalität des Dynamamins mit Hilfe der beiden Dynamamin-Plasmide untersucht werden sollte, wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine<sup>TM</sup> LTX Reagent der Firma Invitrogen oder das Transfektionsreagenz FuGENE HD der Firma Roche verwendet. Lipofectamine LTX besitzt eine lipidhaltige Seite und eine Seite, an der sich eine Aminogruppe befindet. Über die Aminogruppe wird die DNA gebunden und kann nach Einschluss in einem Lipidvesikel über die Lipiddoppelschicht in die Zelle gelangen. Für den Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassay wurden zwei verschiedene Ansätze, einer mit wt-Dynamamin (pUHD10-3 HA-tagged tet-off Dynamamin-1 wt) und der andere mit dn-Dynamamin (pUHD10-3 HA-tagged tet-off Dynamamin-1 K44A), jeweils in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Im Einzelnen bestanden die Ansätze aus den folgenden Komponenten (6 µg pUHD10-3 HA-tagged tet-off Dynamamin-1 wt-Plasmid (wt-Dynamamin) bzw. pUHD10-3 HA-tagged tet-off Dynamamin-1 K44A-Plasmid (dn-Dynamamin), 1 µg pBABEpuro Plasmid, 2 µg pRab7GFP Plasmid, 12 µl Lipofectamine LTX und 500 µl OptiMEM I).

Nach Zusammengeben der Komponenten wurden die Reaktionsgefäße kurz gevortext, für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert und das Gemisch im Anschluss daran zu Zellen einer 10 cm Gewebekulturschale mit 10 ml Zellkulturmedium gegeben. Die zu transfizierenden Zellen waren am Tag der Transfektion zu 50 bis 80% konfluent und hatten eine Viabilität von mindestens 90%, welche durch mikroskopische Inspektion beurteilt wurde.

Alternativ zum Lipofectamine LTX wurde wie bereits oben beschrieben das Transfektionsreagenz FuGENE HD der Firma Roche zur transienten Transfektion von HtTA1-Zellen verwendet. Für die Transfektion der Zellen einer 10 cm Gewebekulturschale musste ihr Zellkulturmedium von 10 ml auf 5 ml reduziert werden. Die folgenden Komponenten wurden anschließend in Reaktionsgefäßen vereinigt (6 µg pUHD10-3 HA-tagged tet-off Dynamamin-1 wt-Plasmid (wt-Dynamamin) bzw. pUHD10-3 HA-tagged tet-off Dynamamin-1 K44A-Plasmid (dn-Dynamamin), 1 µg pBABEpuro Plasmid, 2 µg pRab7GFP Plasmid, 25 µl FuGENE HD und 500 µl OptiMEM I).

Die Ansätze wurden danach für 30 sec gevortext, für 5 bis 10 min bei RT inkubiert und zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und nach Mediumwechsel durch Zugabe von Puromycin (5 µg/ml) bei 37 °C über Nacht selektioniert, bevor sie für den weiteren Versuch auf sterilen Deckgläschen ausgesät wurden.

Das Transfektionsreagenz FuGENE HD wurde auch für die Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>- MIF – ektopische CD74-Überexpression (Kap. 3.4.13), bei denen der Einfluss von CD74 auf die MIF-Endozytose durch Überexpression von CD74 untersucht werden sollte, verwendet. Hierbei wurden nach Reduzierung des Zellkulturmediums der Zellen auf den 10 cm Gewebekulturschalen (s.o.) die folgenden zwei Reaktionsansätze in Reaktionsgefäßen zusammenpipettiert.

Ansatz 1: CD74-Überexpression

- 6 µg pcDNACD74-V5-His
- 1 µg pBABEpuro Plasmid
- 2 µg pRab7GFP Plasmid
- 25 µl FuGENE HD
- 500 µl OptiMEM I

Ansatz 2: Kontrolle

- 1 µg pBABEpuro Plasmid
- 2 µg pRab7GFP Plasmid
- 10 µl FuGENE HD
- 200 µl OptiMEM I

Nach Vortexen der Ansätze für 30 sec und Inkubation für 5 bis 10 min bei RT wurden sie zu den Zellen gegeben.

### **3.4.8 Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF**

Bei allen Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF wird die Endozytose des fluoreszenzmarkierten humanen MIF verfolgt und gegebenenfalls dessen Kolokalisierung mit einem endolysosomalen Kompartiment wie den frühen bzw. späten Endosomen überprüft. Des Weiteren werden verschiedene Zelllinien für die Untersuchung verwendet.

#### **3.4.8.1 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF ohne Markierung von Endosomen - Oberflächenfärbung bei 4°C**

Bei den Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF ohne Markierung von Endosomen geht es darum, festzustellen, ob fluoreszenzmarkiertes huMIF bei 37°C überhaupt in Zellen internalisiert werden kann. Auch dient der Versuchsansatz dazu, zu ermitteln, wie lange es dauert bis Alexa<sup>546</sup>-MIF in Zellen endozytiert wird und ob MIF auch in physiologischen Konzentrationen von 200 ng/ml internalisieren kann. Die bevorzugte Zelllinie für diese Versuche sind MEF-Zellen. Vorab sollte jedoch ausgeschlossen werden, dass der Endozytosemechanismus für die MIF-Internalisierung bereits bei 4°C stattfinden kann.

#### *KEINE ENDOZYTLOSE VON ALEXA<sup>546</sup>-MIF BEI 4°C*

Zur Bestätigung dessen, dass keine Endozytose von Alexa<sup>546</sup>-MIF bei 4°C stattfinden kann, wurden HEK293-Zellen ( $1,7 \times 10^5$ ) einen Tag vor ihrer Transfektion in die *wells* einer 6-*well*-Platte ausgesät. Die Hälfte der Zellen wurde transient mit dem Plasmid pEYFP-C1-CD74minRTS (1 µg) transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die HEK293-Zellen und HEK293-YFP-CD74minRTS-Transfektanten abgelöst und auf sterile Deckgläschen in die *wells* einer neuen 6-*well*-Platte ausgesät. Am Folgetag wurde die Temperatur zunächst für 10 min von 37°C auf 4°C geändert, dann erfolgten Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF (5 µg/ml), Inkubation für 1 h bei 4°C, ein Waschschrift mit PBS, sowie die Fixierung der Zellen mit 3,6 % Paraformaldehyd für mindestens 20 min bei 4°C, gefolgt von einem weiteren Waschschrift und der Montage der Deckgläschen auf beschrifteten Objektträgern. Zur Analyse wurden Bildaufnahmen an einem LSM510 Konfokalmikroskop angefertigt.

#### *ENDOZYTLOSE VON ALEXA<sup>546</sup>-MIF BEI 37°C IN MEF-ZELLEN*

Zur Analyse der Endozytosefähigkeit von Alexa<sup>546</sup>-MIF wurden zwei Millionen MEF-Zellen in 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert bei 1250 rpm für 5 min, in Medium resuspendiert und in die *wells* von 6-*well*-Platten auf sterile Deckgläschen ausgesät. Die MEF-Zellen in den unterschiedlichen *wells* wurden nach Reduzierung ihres Mediums für verschiedene

Zeitdauern mit Alexa<sup>546</sup>-MIF (200 ng/ml) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit eiskaltem PBS (pH 7,2) und zweimal mit eiskaltem Glycinpuffer (pH 2,8) gewaschen, um anschließend mit 3,6 % Paraformaldehyd für 30 min im Wasserbad bei 37°C fixiert und auf Objektträgern für die mikroskopische Analyse montiert zu werden.

#### **3.4.8.2 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der frühen Endosomen (Rab5) - ohne Endozytoseinhibitoren**

Im Unterschied zu den in Kapitel 3.4.8.1 beschriebenen Studien wurden die Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der frühen Endosomen (Rab5) – ohne Endozytoseinhibitoren mit Zellen durchgeführt, die einen Tag nach ihrer Aussaat mit dem Plasmid pEGFP-Rab5 zur Markierung der frühen Endosomen transient transfiziert wurden (siehe Kapitel 3.4.7.2).

#### *KOLOKALISATION VON ALEXA<sup>546</sup>-MIF MIT RAB5 IN HEK293-ZELLEN*

Außer der Tatsache, dass hier HEK293-Zellen verwendet wurden, die einen Tag nach ihrer Aussaat mit 1 Million Zellen pro 10-cm-Gewebekulturschale mit dem Plasmid pEGFP-Rab5 transient transfiziert wurden, erfolgte der restliche Versuchsablauf wie bereits unter Kapitel 3.4.8.1 für MEF-Zellen beschrieben.

#### **3.4.8.3 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - ohne Endozytoseinhibitoren**

Im Unterschied zu den in Kapitel 3.4.8.2 beschriebenen Studien wurden die Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) – ohne Endozytoseinhibitoren mit Zellen durchgeführt, die statt mit dem Marker für die frühen Endosomen (Rab5) mit demjenigen zur Markierung der späten Endosomen durch Fusionierung der GTPase Rab7 mit dem grün fluoreszierenden Protein GFP transient transfiziert wurden (siehe Kapitel 3.4.7.1 und 3.4.7.2). Um die bisherigen Ergebnisse zu untermauern, wurden die folgenden Studien sowohl in MEF-Zellen, als auch in HEK293-Zellen durchgeführt. Die Studien in HEK293-Zellen wurden zusätzlich in Form eines *temperature shift*-Experiments durchgeführt.

#### *KOLOKALISATION VON ALEXA<sup>546</sup>-MIF MIT RAB7 IN MEF-ZELLEN*

Zu Beginn des Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays stand die Transfektion der MEF-wt-Zellen mit dem Plasmid pEGFP-C1-Rab7 (Kap. 3.4.7.1) und ihr Aussähen auf 6-*well*-Platten, in deren *wells* jeweils ein steriles Deckgläschen gelegt worden war. Zwei Tage nach der Transfektion und Inkubation bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubationsschrank wurden die Zellen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF behandelt. Dazu wurde zunächst das Volumen des Zellkulturmediums in den *wells* halbiert und dann der Versuch mit der ersten Zugabe von

Alexa<sup>546</sup>-MIF gestartet. Als sinnvolle Endozytosedauren wurden die folgenden sechs Zeitpunkte ausgewählt: 30, 45, 60, 90, 120 und 180 min. Nach Ende der Inkubation wurden die Platten auf Eis gesetzt und nach Absaugen des Mediums erst mit 2 ml eiskaltem Glycinpuffer (pH 2,8) und nach jeweils kurzer Einwirkzeit noch zweimal mit eiskaltem PBS (pH 7,2) gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen durch Zugabe von jeweils einem 1 ml eines Gemischs aus Paraformaldehyd (pFA) und Hoechst33342 (nicht bei allen Zellen erfolgte eine Anfärbung des Zellkerns) und die Inkubation der Platten für mindestens 20 min im Wasserbad bei 37°C. Dem pFA/Hoechst33342 Gemisch wurde Hoechst33342 im Verhältnis von ungefähr 1:1000 zugesetzt.

Nach Fixierung der Zellen wurde das pFA/Hoechst-Gemisch aus den *wells* abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen dann mit jeweils einem Tropfen Fluoromount-G auf entsprechend beschrifteten Objektträgern montiert. Zur Trocknung wurden die Objektträger für mindestens 24 h in lichtgeschützten Objektträgermappen aufbewahrt, bevor die mikroskopische Analyse durchgeführt wurde.

#### *KOLOKALISATION VON ALEXA<sup>546</sup>-MIF MIT RAB7 IN HEK293-ZELLEN*

Zu Beginn des Versuchs wurden 1 Millionen HEK293-Zellen auf 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät und ihnen erlaubt für 24 h bei 37°C anzuwachsen. Am Folgetag erfolgte die transiente Transfektion der HEK293-Zellen mit dem Plasmid pEGFP-C1-Rab7. Nach weiteren 24 h bei 37°C wurden die Zellen abgelöst, bei 1250 rpm für 5 min zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und auf sterile Deckgläschen in die *wells* von 6-*well*-Platten verteilt. Der Behandlung mit Alexa<sup>546</sup>-MIF für unterschiedliche Zeitdauern am nächsten Tag folgten die bereits beschriebenen Waschschriffe mit eiskaltem Glycinpuffer und PBS, sowie die Fixierung mittels Zugabe von Paraformaldehyd für 30 min bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und mit Fluoromount-G auf Objektträgern montiert. Zur Trocknung mussten die Objektträger mindestens über Nacht in Objektträgermappen gelagert werden, bevor sie einer mikroskopischen Analyse unterzogen werden konnten.

#### *KOLOKALISATION VON ALEXA<sup>546</sup>-MIF MIT RAB7 ALS TEMPERATURE SHIFT-EXPERIMENT*

HEK293-Zellen ( $2 \times 10^6$ ) wurden einen Tag vor ihrer transienten Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-C1-Rab7 auf 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Nach 24 h bei 37°C wurden die Zellen abgelöst, bei 1250 rpm für 5 min zentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und auf sterile Deckgläschen erneut ausgesät. Am Folgetag wurden die Zellen für 10 min bei 4°C inkubiert, mit Alexa<sup>546</sup>-MIF (1 µg/ml) versetzt und bis zum Erreichen eines Gleichgewichts zwischen an die Rezeptoren gebundenem MIF und freiem MIF für weitere 60 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch frisches kaltes Medium ersetzt und die Inkubationstemperatur von 4°C zu 37°C verändert, um den Zellen die Möglichkeit zur Endozytose von MIF innerhalb von 10 bis 120 min zu geben. Danach folgten die bereits beschriebenen Waschschriffe mit eiskaltem Glycinpuffer und PBS, sowie die Fixierung mittels Zugabe von Paraformaldehyd für 30 min bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und mit Fluoromount-G auf Objektträgern montiert. Zur

Trocknung mussten die Objektträger mindestens über Nacht in Objektträgermappen gelagert werden, bevor sie einer mikroskopischen Analyse unterzogen werden konnten.

#### **3.4.8.4 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Endozytoseinhibitoren des Clathrin-vermittelten Endozytosewegs**

Zur weiteren Bestätigung vorhandener Daten und zur weitergehenden Erforschung des Endozytoseweges des Zytokins MIF wurden im Folgenden die in Säugetierzellen existierenden möglichen Internalisierungswege durch Anwendung von für jeweils einen dieser Wege spezifischen Endozytoseinhibitoren schrittweise untersucht. Das nun folgende Kapitel handelt von den entsprechenden Studien zur Blockierung des Clathrin-abhängigen Endozytoseweges durch Monodansylcadaverin (MDC) und Chlorpromazine (CPZ).

##### *INHIBITORISCHER EFFEKT VON MDC UND CPZ AUF DIE MIF-ENDOZYTOSE IN MEFs*

2 x 10<sup>6</sup> MEF-Zellen wurden einer transienten Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-Rab7 unterzogen, auf 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät und für 48 h bei 37°C kultiviert. Nach Ablösen, Zentrifugieren bei 1250 rpm für 5 min und Resuspendieren der transfizierten MEF-Zellen in Medium wurden diese auf sterile Deckgläschen in die wells von 6-well-Platten verteilt. Die Anzucht erfolgte für 24 h bei 37°C. Anschließend wurden die MEF-Zellen entweder mit einem der beiden Inhibitoren MDC (50 µM) oder CPZ (50 µM), oder für die Kontrolle ohne Zugabe von Inhibitor für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF (200 ng/ml) für Zeitdauern zwischen 0 und 3 h bei 37°C. Alle übrigen Arbeitsschritte gleichen denjenigen der Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays ohne Inhibitoren (Kapitel 3.4.8.3).

##### *INHIBITORISCHER EFFEKT VON MDC AUF DIE MIF-ENDOZYTOSE IN HEK293-ZELLEN*

Die Internalisierungsassays zur Überprüfung der Beteiligung des Clathrin-abhängigen Endozytoseweges an der MIF-Endozytose in HEK293-Zellen gleichen ihrem Ablauf nach denjenigen ohne Inhibitoren (siehe Kapitel 3.4.8.3). Im Gegensatz zu den Studien ohne Inhibitoren wurde bei diesen vor Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF der Endozytoseinhibitor MDC mit einer Endkonzentration von 50 µM für 30 min bei 37°C zu den HEK293-Zellen gegeben. Kontrollzellen wurden für die gleiche Zeit mit inkubiert. Alle übrigen Schritte erfolgten wie bereits im Kapitel 3.4.8.3 beschrieben.

#### **3.4.8.5 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Inhibitoren der GTPase Dynamamin**

Über diesen Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassay sollte herausgefunden werden, ob funktionsfähiges Dynamamin für die Endozytose von huMIF in Zellen notwendig ist.

*INHIBIERUNG VON DYNAMIN DURCH EIN DOMINANT-NEGATIVES KONSTRUKT*

Dazu wurden HtTA1-Zellen in vier 10-cm Gewebekulturschalen ausgesät und ihr Zellkulturmedium mit 1 µg Doxyzyklin pro ml Medium versetzt. Die Transfektion der Zellen in den Gewebekulturschalen mit einem der beiden Dynamin-Plasmide und den Plasmiden pBABEpuro und pRab7GFP erfolgte 24 h nach Anzucht der Zellen. Dabei wurden jeweils zwei Gewebekulturschalen für die Transfektion mit dem pUHG16wtdynamin Plasmid und die anderen beiden für diejenige mit dem pUHG16K44Adynamin Plasmid benutzt. Nach weiteren 24 h wurde das vorhandene Medium auf den Gewebekulturschalen durch 10 ml neues D-MEM-Medium ersetzt. Zur Selektion der Zellen wurden jeweils 1 µg/ml Puromycin zugesetzt. Die Selektion wurde für eine Dauer von 24 h vollzogen. Im Anschluss daran wurden sowohl die HtTA1-Zellen mit dem Wt-Dynamin-Plasmid, als auch die anderen jeweils mit Trypsin/EDTA von den Gewebekulturschalen abgelöst und die Zellsuspension in getrennte Greiner-PP-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1250 rpm für 5 min wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet jeweils in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zusammen mit 35 ml zusätzlichem Medium jeweils in eine 10-cm Gewebekulturschale überführt. Nach ausreichendem Mischen wurden jeweils 3 ml der Zellsuspension der HtTA1-Zellen mit Wt-Dynamin-Plasmid auf die *wells* zweier mit Deckgläschen bestückter 6-*well*-Platten verteilt. Genauso wurde mit den HtTA1-Zellen mit dn-Dynamin-Plasmid verfahren. Jeweils eine der beiden 6-*well*-Platten einer „Zelllinie“ wurde mit „HtTA1, Wt/dn-Dynamin, ohne Doxyzyklin“ und die andere mit „HtTA1 Wt/dn-Dynamin, mit Doxyzyklin“ beschriftet. Abschließend wurde in die *wells* der Platten mit der Beschriftung „mit Doxyzyklin“ jeweils Doxyzyklin einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt. Die Zugabe von Doxyzyklin diente dazu, die Expression des transfizierten Dynamin-Plasmids in den HtTA1-Zellen abzuschalten, so dass nur noch das zelluläre endogene Dynamin in den Zellen wirksam war. In den Zellen ohne Doxyzyklin-Zusatz wurde das Dynamin des Plasmids exprimiert und war somit zusätzlich zum zellulären vorhanden. Zur ausreichenden Expression des entsprechenden Plasmids wurden die transfizierten Zellen für 48 h im CO<sub>2</sub>-Inkubationsschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Behandlung der Zellen in den 6-*well*-Platten mit Alexa<sup>546</sup>-MIF. Die Zugaben von Alexa<sup>546</sup>-MIF zu den entsprechenden *wells* der Platten wurden 120, 60, 45, 30, 20 und 10 min vor Ende der anschließenden Inkubation der Platten bei 37°C getätigt. Um eine weitere Endozytose von MIF in die Zellen über die Einwirkzeiten hinaus zu verhindern, wurden die Platten auf Eis gesetzt und das Zellkulturmedium abgesaugt. Danach folgten die Schritte üblichen Waschschritte mit glycinhaltigem Waschpuffer und mit PBS, die Fixierung der Zellen und das Anfärben der Zellkerne mit Hoechst33342 und ihr Montieren auf Objektträgern.

Nach der mindestens 24-stündigen Trocknungszeit der Objektträger und Aufbewahrung in lichtgeschützten Objektträgermappen konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

*INHIBIERUNG VON DYNAMIN DURCH DYNASORE IN HEK293-ZELLEN*

Zur weiteren Bestätigung und Untermauerung der in den Studien mit dem dominant-negativen Dynamin-Konstrukt erzielten Resultate wurden im Folgenden Experimente

durchgeführt, bei denen die GTPase Dynamin durch Zugabe des zellpermeablen Inhibitors Dynasore in ihrer Funktionalität beeinträchtigt wurde.. Im Gegensatz zu den Studien ohne Inhibitoren (siehe Kapitel 3.4.8.3) erfolgte vor Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF die Zugabe von Dynasore mit einer Endkonzentration von 80  $\mu\text{M}$  für 30 min bei 37°C. Kontrollzellen wurden für die gleiche Zeit mit inkubiert. Alle übrigen Schritte erfolgten wie bereits im Kapitel 3.4.8.3 beschrieben.

#### **3.4.8.6 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Endozytoseinhibitoren der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege über Caveolae/lipid rafts**

Um die Beteiligung der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege über Caveolae und lipid rafts an der Internalisierung von MIF zu erforschen, wurden Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays durchgeführt, bei denen diese Wege durch Zugabe von den entsprechenden Inhibitoren Nystatin und Filipin blockiert werden sollten.

##### *AUFNAHME VON ALEXA<sup>546</sup>-MIF NACH BEHANDLUNG MIT NYSTATIN ODER FILIPIN*

Auch bei diesem Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassay stimmte das Prozedere mit demjenigen in den Assays ohne Inhibitoren (Kapitel 3.4.8.3) überein. Der einzige Unterschied bestand hierbei darin, dass jeweils einer der beiden Inhibitoren Nystatin und Filipin jeweils 1 h vor Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF zu den Zellen gegeben wurde. Nystatin wurde mit einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$ , Filipin mit einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt<sup>310</sup>.

#### **3.4.8.7 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei Markierung der Lysosomen**

Um den endosomalen Transportweg des Zytokins MIF nach seiner Endozytose auch über seine Kolokalisation mit den späten Endosomen hinaus weiterzuverfolgen und aufzuklären, ob MIF in Lysosomen degradiert wird, sollte eine eventuelle Kolokalisation mit den Lysosomen in äquivalenten Studien zu denjenigen mit Rab7 in MEF-Zellen untersucht werden.

##### *KOLOKALISATION VON ALEXA<sup>546</sup>-MIF MIT DEN LYSOSOMEN IN MEF-ZELLEN*

Für diese Internalisierungsassays wurden MEF-Zellen ( $10^5$ ) 24 h vor dem *live imaging* Experiment am Konfokalmikroskop LSM710 auf sterilen runden Deckgläschen in 6-cm-Gewebekulturschalen ausgesät und die Gewebekulturschalen bei 37°C inkubiert. Für die Konfokalmikroskopie wurden die MEF-Zellen mit Vollmedium, das mit LysoSensorGreen DND-189 in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  versetzt war, für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und durch eine entsprechende Menge an Vollmedium ohne LysoSensor-Zusatz ersetzt. Nach Montieren eines mit MEF-Zellen bewachsenen Deckgläschen in die Lebedkammer auf dem Konfokalmikroskop wurde das Zellmedium erneut gewechselt und durch solches, das mit Alexa<sup>546</sup>-MIF einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  angereichert war, ersetzt. Ein Gesamtvolumen von mindestens 1 ml wurde für

die Mikroskopie benötigt. Fluoreszenzaufnahmen wurden durchgehend für 5 bis 120 min nach Zugabe des MIF-haltigen Mediums gemacht.

### **3.4.9 Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit DiI-AcLDL**

Alle Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays mit DiI-AcLDL dienten dazu, die Ergebnisse aus den Experimenten mit Alexa<sup>546</sup>-MIF besser bewerten zu können. Für LDL ist der Endozytosemechanismus bereits aufgeklärt, so dass der Vergleich zwischen den Daten aus den Internalisierungsassays mit MIF und LDL, dazu diente, mögliche Parallelen zwischen beiden Endozytosewegen aufzudecken, um somit mehr über den Mechanismus der Internalisierung von MIF in Zellen zu erfahren.

#### ***3.4.9.1 Internalisierungsassays mit DiI-AcLDL bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - ohne Endozytoseinhibitoren***

Die Internalisierungsassays bei vorheriger Markierung der späten Endosomen mittels transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit dem Plasmid pEGFP-C1-Rab7 wurden äquivalent zu denjenigen zur Überprüfung der Kolo-kalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Rab7GFP durchgeführt (Kapitel 3.4.8.3). Statt der Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF wurde DiI-AcLDL (200 µg/ml) für die verschiedenen Zeitdauern zu den Zellen gegeben. Alle übrigen Arbeitsschritte stimmten mit denjenigen in den entsprechenden Experimenten mit Alexa<sup>546</sup>-MIF überein.

#### ***3.4.9.2 Internalisierungsassays mit DiI-AcLDL bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Endozytoseinhibitoren des Clathrin-vermittelten Endozytosewegs***

Durch Verwendung der Endozytoseinhibitoren des Clathrin-vermittelten Endozytosewegs zur Blockierung der Internalisierung des LDLs sollte die inhibitorische Effizienz der beiden Inhibitoren MDC und Dynasore herausgefunden werden. LDL bot sich hierbei an, da es bekanntermaßen genau über diesen Endozytoseweg in Zellen endozytiert wird.

#### ***INHIBITORISCHER EFFEKT VON MDC AUF DIE LDL-ENDOZYTOSE IN HEK293-ZELLEN***

Zur Analyse der Funktionalität des Inhibitors Monodansylcadaverin (MDC) wurden in HEK293-Zellen Kolo-kalisationsstudien zwischen Rab7 und LDL durchgeführt. Dabei wurde getestet, wie effektiv die Inhibierung der Internalisierung nach Zugabe von MDC im Vergleich zu Kontrollzellen war. Hierzu wurde visuell die LDL/Rab7-Kolo-kalisationsrate ermittelt. Der Versuchsablauf stimmte mit demjenigen zur Analyse der Kolo-kalisation von Alexa<sup>546</sup>-MIF mit Rab7GFP in HEK293-Zellen unter gleichen Bedingungen überein (Kapitel 3.4.8.4).

### **3.4.9.3 Internalisierungsassays mit DiI-AcLDL bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - mit Inhibitoren der GTPase Dynamin**

Der Clathrin-abhängige Endozytoseweg bedarf zur Abschnürung der Clathrin-umhüllten Vesikel von der Plasmamembran einer funktionellen GTPase Dynamin. Um zu überprüfen, welchen Einfluss eine Inhibierung dieser GTPase auf den Endozytosevorgang des Proteins LDL hat, wurde der Dynamininhibitor Dynasore verwendet.

#### *INHIBITORISCHER EFFEKT VON DYNASORE AUF DIE LDL-ENDOZYTOSE*

In Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays wurde die Kolokalisation von DiI-AcLDL und den späten Endosomen (Rab7GFP) in Abhängigkeit einer funktionellen GTPase Dynamin durch Vergleich der Kolokalisationsrate in unbehandelten vs. mit Dynasore behandelten HEK293-Zellen analysiert. Der Versuchsablauf hierfür stimmte mit demjenigen zur Untersuchung der MIF/Rab7-Kolokalisationsrate unter gleichen Bedingungen in HEK293-Zellen überein (Kapitel 3.4.8.5).

### **3.4.10 Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Transferrin**

Proteine, Toxine und weitere Substanzen, die nach ihrer Internalisierung über den Clathrin-abhängigen Endozytoseweg nicht in den Degradationsweg zum Transport zu späten Endosomen und Lysosomen einsortiert werden, sondern recycelt werden oder solche, die über einen der Caveolin-abhängigen Endozytosewege in Zellen internalisieren, passieren zu keiner Zeit die späten Endosomen und sollten daher auch nicht mit ihnen kolokalisieren. Dies sollte im Folgenden exemplarisch an zwei Beispielen überprüft werden.

#### **3.4.10.1 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-Transferrin bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) - ohne Endozytoseinhibitoren**

Zur Bestätigung der Annahme, dass Substanzen, die nach ihrer Endozytose über frühe und Recycling-Endosomen wieder zur Plasmamembran transportiert werden, niemals späte Endosomen erreichen und daher auch nicht mit ihnen kolokalisieren, wurden Internalisierungsversuche mit dem für diesen Weg repräsentativen Protein Transferrin in HEK293-Zellen durchgeführt. Nach transienter Transfektion der HEK293-Zellen mit dem späten endosomalen Marker Rab7GFP wurden die Zellen für unterschiedliche Zeitdauern mit Alexa<sup>546</sup>-Transferrin (50 µg/ml) inkubiert, gewaschen, fixiert und mittels Mikroskopie analysiert. Der genaue Versuchsablauf entsprach demjenigen zur Untersuchung der MIF-Endozytose in unbehandelten transient mit Rab7GFP transfizierten HEK293-Zellen (Kapitel 3.4.8.3).

#### **3.4.11 Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT**

Entsprechend den Studien zur Untersuchung der Internalisierung des fluoreszenzmarkierten Alexa<sup>546</sup>-MIF (siehe Kap. 3.4.8) wurde in den Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT die Endozytose von D-DT analysiert und die

Lokalisation gegebenenfalls mit den bekannten endosomalen Markern Rab5, Rab7 oder LysoSensor abgeglichen.

#### **3.4.11.1 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT bei Markierung der frühen Endosomen (Rab5) ohne Endozytoseinhibitoren**

Im Unterschied zu den in Kapitel 3.4.8.2 beschriebenen Studien wurden diese Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT durchgeführt. Alle weiteren Parameter waren identisch zu den entsprechenden Versuchen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF.

##### *KOLOKALISATION VON ALEXA<sup>546</sup>-D-DT MIT RAB5 IN HEK293-ZELLEN*

Der Versuchsablauf entsprach demjenigen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF (siehe Kap. 3.4.8.2).

#### **3.4.11.2 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT bei Markierung der späten Endosomen (Rab7) ohne Endozytoseinhibitoren**

Im Unterschied zu den in Kapitel 3.4.8.3 beschriebenen Studien wurden diese Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT durchgeführt. Alle weiteren Parameter waren identisch zu den entsprechenden Versuchen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF.

##### *KOLOKALISATION VON ALEXA<sup>546</sup>-D-DT MIT RAB7 IN HEK293-ZELLEN*

Der Versuchsablauf entsprach demjenigen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF (siehe Kap. 3.4.8.3).

#### **3.4.11.3 Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT bei Markierung der Lysosomen**

Im Unterschied zu den in Kapitel 3.4.8.7 beschriebenen Studien wurden diese Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT durchgeführt. Alle weiteren Parameter waren identisch zu den entsprechenden Versuchen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF.

##### *KOLOKALISATION VON ALEXA<sup>546</sup>-D-DT MIT DEN LYSOSOMEN IN HEK293-ZELLEN*

Der Versuchsablauf entsprach demjenigen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF in MEF-Zellen (siehe Kap. 3.4.8.7). Statt einer Konzentration von 1 µg/ml wurden 2 µg/ml Alexa<sup>546</sup>-D-DT eingesetzt.

#### **3.4.12 Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF – Einfluss des Mikrotubuli-Systems und Bedeutung der Endosomenansäuerung**

Diese Internalisierungsassays dienten dazu, eine Abhängigkeit der MIF-Endozytose von der Ansäuerung der Endosomen und der Intaktheit des Mikrotubuli-Systems zu untersuchen. Dazu wurden die beiden Inhibitoren Bafilomycin (Inhibitor der vakuolären Protonenpumpe v-

ATPasen) und Nocodazol (Mikrotubuligift) zur Beeinträchtigung der jeweiligen Funktion verwendet.

#### ***3.4.12.1 Bedeutung des Mikrotubuli-Systems und der Endosomenansäuerung für die MIF-Endozytose in MEF-Zellen***

Nach transienter Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-Rab7 (Kapitel 3.4.7.1) und Aussähen auf sterile Deckgläschen in 6-well-Platten sollte die Endozytose von Alexa<sup>546</sup>-MIF bei unbehandelten MEF-Zellen und bei solchen, die mit einem der Inhibitoren Bafilomycin oder Nocodazol behandelt wurden, analysiert werden. Die Zugabe von Bafilomycin oder Nocodazol erfolgte jeweils 30 min vor Zugabe des Alexa<sup>546</sup>-MIF. Bafilomycin wurde in einer Endkonzentration von 200 nM, Nocodazol in einer Endkonzentration von 20 µM zu den Zellen gegeben<sup>311</sup>. Die Kontrollzellen wurden unbehandelt belassen. Inkubationen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF erfolgten für 60, 90 und 120 min.

Die sich an die Behandlung der Zellen anschließenden Arbeitsschritte: „Waschen mit glycinhaltigem Waschpuffer und zweimal mit PBS“, „Fixieren der Zellen“ und „Montieren der Zellen auf Objektträgern“ wurden wie beim Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassay bei MEFs ohne Inhibitoren (Kapitel 3.4.8.3) durchgeführt.

#### **3.4.13 Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF – ektopische CD74-Überexpression**

Bei den im Folgenden beschriebenen Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF wurde die Internalisierung des Zytokins MIF in solchen Zelllinien, die endogen kein CD74 exprimieren, untersucht und der Einfluss einer ektopischen CD74-Überexpression auf die MIF-Endozytose in diesen Zellen analysiert.

##### ***3.4.13.1 Einfluss der ektopischen CD74-Überexpression auf die MIF-Endozytose in HEK293-Zellen***

Zur Analyse der Abhängigkeit der MIF-Endozytose vom Vorhandensein seines Rezeptors CD74 wurden CD74-negative HEK293-Zellen ( $2 \times 10^6$ ) 24 h vor ihrer transienten Transfektion entweder mit den Plasmiden pcDNA3.1/V5-His-TOPO-CD74, pBABEpuro und pEGFP-C1-Rab7 (ektopische CD74-Überexpression) oder nur mit pBABEpuro und pEGFP-C1-Rab7 (Kontrolle) auf 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät und bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von Puromycin (5 µg/ml) in frisches Medium für 24 h bei 37°C selektiert. Nach Transfer und Aussaat der Zellen auf Deckgläschen in die wells von 6-well-Platten erfolgte die Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF für verschiedene Zeitdauern. Anschließend wurden die Zellen wie üblich gewaschen, fixiert, montiert und am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX-50 analysiert.

### **3.4.13.2 Einfluss der ektoptischen CD74-Überexpression auf die MIF-Endozytose in HtTA1-Zellen**

Die Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays von Alexa<sup>546</sup>-MIF in den CD74-negativen HtTA1-Zellen entsprachen denjenigen in HEK293-Zellen (Kapitel 3.4.13.1) und dienten dazu den Einfluss von CD74 auf die MIF-Internalisierung in einer zweiten CD74-negativen Zelllinie zu analysieren und somit die Ergebnisse aus den Studien mit HEK293-Zellen zu untermauern.

### **3.4.14 Immunfluoreszenz-basierte Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF - Bedeutung von CXCR4 ohne und nach ektoptischer CD74-Überexpression**

In den weiteren Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF sollte nun die Bedeutung des endogen in diesen CD74-negativen Zelllinien exprimierten CXCR4 exemplarisch für HEK293 Zellen aufgeklärt werden. Einerseits wurde die Endozytose von MIF in endogen CXCR4-exprimierenden Zellen analysiert und andererseits die Auswirkung einer zusätzlichen ektoptischen Überexpression von CD74 in diesen Zellen untersucht. Die Bedeutung von CXCR4 und die Abhängigkeit der MIF-Endozytose von diesem MIF-Rezeptor und von CD74 wurden durch Zugabe des spezifischen CXCR4-Inhibitors AMD3100 studiert.

#### **3.4.14.1 Kolokalisation von Alexa<sup>546</sup>-MIF mit Rab7GFP in HEK293- und HEK293-CD74-Transfektanten ohne/mit AMD3100**

Zur Analyse der Abhängigkeit der MIF-Internalisierung von CXCR4 wurde der spezifische Inhibitor AMD3100 zur Blockierung von CXCR4 verwendet.

HEK293-Zellen wurden 24 h vor ihrer Kotransfektion mit den Plasmiden pCD74minRTS und pEGFP-C1-Rab7 (HEK-CD74-Transfektanten) oder nur mit dem pEGFP-C1-Rab7 Plasmid (Kontrolle) in 10-cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C wurden sie abgelöst, zentrifugiert, in Vollmedium resuspendiert und auf sterile Deckgläschen in 6-well-Platten erneut ausgesät. Weitere 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> später wurden die Zellen entweder unbehandelt oder nach Zugabe von AMD3100 (10 µg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF (1 µg/ml) und Inkubation der Zellen für verschiedene Zeitdauern bei 37°C. Die Waschschriffe, das Fixieren und Montieren der Deckgläschen wurde, wie bereits beschrieben, durchgeführt.

### **3.4.15 Protein-Protein-Kolokalisationsstudien**

Um den Endozytoseweg des Zytokins MIF weiter aufzuklären und die bisherigen Ergebnisse zu untermauern, wurden Kolokalisationsstudien mit MIF und verschiedenen anderen Proteinen, für die der Endozytoseweg bekannt ist, durchgeführt. Kolokalisationen zwischen MIF und anderen Proteinen deuten auf eine Übereinstimmung der Endozytosewege hin und geben Aufschluss über den Endozytoseweg von MIF.

### **3.4.15.1 Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-Transferrin**

Zur Analysierung der Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-Transferrin wurden HEK293-Zellen ( $2 \times 10^5$ ) auf sterilen Deckgläschen in 3-cm-Gewebekulturschalen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Temperaturabsenkung zur Verhinderung einer vorzeitigen Endozytose wurden die Schalen auf 4°C abgekühlt (10 min). Anschließend wurden Alexa<sup>546</sup>-MIF (1 µg/ml) und Alexa<sup>488</sup>-Transferrin (25 µg/ml) gleichzeitig zu den Zellen gegeben und diese für 30 min bei 4°C inkubiert, so dass eine Bindung der Proteine an die Zelloberfläche gewährleistet war. Das Medium wurde durch kaltes Medium ersetzt und es erfolgte eine Temperaturänderung von 4°C zu 37°C. Für 2 bis 30 min konnte nun eine Internalisierung der Proteine stattfinden. Danach wurden die HEK293-Zellen mit Glycinpuffer (pH 2,8) und PBS (pH 7,2) gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert und schließlich auf Objektträgern montiert. Zur mikroskopischen Analyse wurden Fluoreszenzaufnahmen am Konfokalmikroskop LSM710 getätigt.

### **3.4.15.2 Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL**

Für die Analyse einer möglichen Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL wurden Studien mit demselben Versuchsablauf wie zur Analysierung der Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-Transferrin verwendet. Nach Erreichen einer Temperatur von 4°C nach 10 min wurden Alexa<sup>546</sup>-MIF (1 µg/ml) und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL (5 µg/ml) gleichzeitig zu den HEK293-Zellen gegeben. Die Inkubation bei 37°C wurde für 2 bis 180 min durchgeführt. Alle übrigen Arbeitsschritte erfolgten wie unter Kapitel 3.4.15.1 bereits beschrieben.

### **3.4.15.3 Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-Choleratoxin B**

Eine mögliche Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-Choleratoxin B wurde in live imaging Experimenten mit HEK293-Zellen ( $5 \times 10^5$ ) studiert. Dazu wurden die Zellen auf mit Poly-L-lysin-beschichteten sterilen Deckgläschen ausgesät und für zwei Tage angezogen. Fürs *live imaging* wurde ein mit Zellen bewachsenes Deckgläschen in eine beheizte Kammer (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) oberhalb eines LSM510 Konfokalmikroskops montiert. Die Bildaufnahmen erfolgten unmittelbar nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF (1 µg/ml) und Alexa<sup>488</sup>-Choleratoxin B (10 µg/ml) ins Medium.

### **3.4.15.4 Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL**

Für die Analyse einer möglichen Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL wurden Studien mit demselben Versuchsablauf wie zur Analysierung der Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL verwendet. Nach Erreichen einer Temperatur von 4°C nach 10 min wurden Alexa<sup>546</sup>-D-DT (1 µg/ml) und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL (5 µg/ml) gleichzeitig zu den HEK293-Zellen gegeben. Die Inkubation bei 37°C wurde für 10 bis 180 min durchgeführt. Alle übrigen Arbeitsschritte erfolgten wie unter Kapitel 3.4.15.1 bereits beschrieben.

### **3.4.16 Signaling-Experimente mit *epidermal growth factor* (EGF)**

Für den hier verwendeten Wachstumsfaktor EGF ist bereits eine Initiierung des PI3K/AKT-Signaltransduktionswegs in Folge der Endozytose des EGF-Rezeptors nach Ligandenbindung an der Plasmamembran beschrieben<sup>312,313</sup>.

Daher sollten die im Folgenden erläuterten *Signaling*-Experimente in für den EGF-Rezeptor positiven HeLa-Zellen (HtTA1) zur Etablierung des Versuchsablaufs und als Positivkontrolle für durch *endosomal signaling* induzierte AKT-Phosphorylierung dienen.

#### **3.4.16.1 Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs initiiert durch EGF in HtTA1-Zellen**

Für die EGF-induzierten AKT-Signaltransduktionsversuche wurden HtTA1-Zellen ( $10^5$ /well) in 24-well-Platten mit D-MEM-Medium mit 10% FCS ausgesät und für 24 h bei 37°C kultiviert. Vor Zugabe des EGF wurden die Zellen für weitere 24 h in serum-reduziertem D-MEM-Medium (0,5% FCS) inkubiert. Da sich nach Austesten verschiedener EGF-Konzentrationen und laut Literatur<sup>314</sup> eine EGF-Konzentration von 100 ng/ml als optimal zur AKT-Aktivierung in HeLa-Zellen geeignet herausstellte, wurde diese Konzentration für die *Signaling*-Experimente mit EGF und dem Endozytoseinhibitor CPZ verwendet. HtTA1-Zellen wurden entweder mit 5, 8, 10 oder 50 µM CPZ für 30 min bei 37°C vorbehandelt oder blieben unbehandelt, bevor sie durch Zugabe von huEGF (100 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert wurden. Kontrollzellen bekamen stattdessen ein gleiches Volumen an Puffer. Die Zellen wurden nach Aktivierung der Signaltransduktionskaskade bei 13000 g für 5 min pelletiert, lysiert und mit Hilfe eines anti-phospho-AKT Antikörpers im Western-Blot analysiert. Durch Bandendensitometrie mittels der Aida Image Analyzer Software wurde das Verhältnis von phospho-AKT zu Aktin bestimmt.

### **3.4.17 Signaling-Experimente mit *macrophage migration inhibitory factor* (MIF)**

Da mittlerweile bekannt ist, dass Zytokin-induzierte Signaltransduktionskaskaden nicht auf eine Aktivierung ihres Rezeptors durch Ligandenbindung auf der Plasmamembran beschränkt sind, sondern auch in Folge der Endozytose des ligandengebundenen Rezeptors initiiert werden können, sollte untersucht werden, ob das oben beschriebene *endosomal signaling* auch für durch MIF-induzierte Aktivierung des PI3K/AKT-Signaltransduktionswegs möglich war.

Dazu wurden entsprechende *Signaling*-Experimente mit MIF in HeLa-, Jurkat T-Zellen und primären humanen Dermalfibroblasten durchgeführt.

#### **3.4.17.1 Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs initiiert durch MIF in HtTA1-Zellen**

Für die *Signaling*-Experimente wurden HtTA1-Zellen ( $10^5$ ) pro well einer 24-well-Platte in je 1 ml Vollmedium ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium der wells abgesaugt und durch die entsprechende Menge an serumreduziertem D-MEM-Medium

(0,5% FCS) ersetzt. Die Zellen wurden dann für weitere 24 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden sie entweder mit 50 µM MDC, 5, 10, 25 oder 50 µM CPZ, 80 µM Dynasore, AMD3100 (1 µg/ml) oder mit anti-CXCR4 Antikörper (10 µg/ml, MAB171) der Firma R&D Systems für 30 min bei 37°C vorbehandelt oder blieben unbehandelt, bevor sie durch Zugabe von huMIF (50 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert wurden. Kontrollzellen erhielten ein gleiches Volumen an Puffer. Nach Aktivierung der Signaltransduktionskaskade wurden die Zellen bei 13000 g für 5 min pelletiert, lysiert und mit Hilfe eines anti-phospho-AKT Antikörpers im Western-Blot analysiert. Durch Bandendensitometrie mittels der Aida Image Analyzer Software wurde das Verhältnis von phospho-AKT zu Aktin bestimmt.

#### ***3.4.17.2 Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs initiiert durch MIF in Jurkat T-Zellen***

Die *Signaling*-Experimente in Jurkat T-Zellen glichen im Wesentlichen denjenigen in HtTA1-Zellen (Kapitel 3.4.17.1). Auch hierbei wurden Jurkat T-Zellen ( $10^5$ ) pro *well* einer 24-*well*-Platte in je 1 ml Vollmedium ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium der *wells* abgesaugt und durch die entsprechende Menge an serumreduziertem RPMI1640-Medium (0,5% FCS) ersetzt. Die Zellen wurden dann für weitere 24 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden sie entweder mit 50 µM MDC, 50 µM CPZ oder 80 µM Dynasore für 30 min bei 37°C vorbehandelt oder blieben unbehandelt, bevor sie durch Zugabe von huMIF (50 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert wurden. Alle übrigen Schritte stimmten mit denjenigen für HtTA1-Zellen überein (Kapitel 3.4.17.1). Zusätzlich zur Detektion der Phosphorylierung an Ser473 wurde die Phosphorylierung an Thr308 im Western-Blot untersucht.

#### ***3.4.17.3 Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs initiiert durch MIF in humanen Dermalfibroblasten***

Die *Signaling*-Experimente in humanen Dermalfibroblasten glichen im Wesentlichen denjenigen in HtTA1-Zellen (Kapitel 3.4.17.1). Nach Aussähen der Zellen in die *wells* einer 24-*well*-Platte und Wechsel auf serum-reduziertes D-MEM-Medium wurden sie für weitere 24 h bei 37°C kultiviert und danach entweder mit 50 µM MDC, 25 oder 50 µM CPZ oder 80 µM Dynasore für 30 min bei 37°C vorbehandelt oder blieben unbehandelt, bevor sie durch Zugabe von huMIF (50 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert wurden. Alle übrigen Schritte stimmten mit denjenigen für HtTA1-Zellen überein (Kapitel 3.4.17.1).

#### ***3.4.17.4 Nichtradioaktiver IP-Kinase-Assay***

Um nachzuweisen, dass die Proteinkinase B durch die Stimulation mit MIF auch in ihrer Kinaseeigenschaft aktiviert und nicht nur phosphoryliert wurde, wurde in Jurkat T-Zellen zusätzlich zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades an Ser473 und Thr308 ein kommerziell bei der Firma Cell Signaling erhältlicher IP-Kinase-Assay („Akt Kinase Assay Kit“) zum Nachweis der AKT-Aktivierung verwendet. Hierzu wurden bis zur Lyse der Zellen alle Arbeitsschritte wie im Kapitel 3.4.17.2 bereits beschrieben durchgeführt. Anders als beim

AKT-Aktivierungsassay erfolgte die Zelllyse mit dem dem Kit beiliegenden „Cell Lysis Buffer“. Zur Immunpräzipitation der Proteinkinase B (AKT) aus dem Zelllysate wurde dieses mit an *beads* immobilisiertem monoklonalen Phospho-AKT(Ser473)-Antikörpern („*immobilized Phospho-Akt (Ser473)(D9E) Rabbit mAb (Bead Conjugate)*“) versetzt und ü.N. im Überkopfschüttler bei 4°C rotiert. Im anschließenden *in vitro*-Kinase Assay wurden die *beads* nach einigen Waschschritten mit ATP und dem Substrat GSK3-Fusionsprotein versetzt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt, die Proben bei 95°C für 5 min denaturiert und auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Wie üblich erfolgte die Western-Blot-Analyse und Immundetektion mit dem Ziel des Nachweises von Phospho-GSK-3 auf der Blotmembran. Alle für diesen Assay benötigten Reagenzien waren im Kit enthalten.

### 3.4.18 Herstellung von Zelllysaten

Die Herstellung von Zelllysaten erfolgte entweder im Anschluss an eine Koimmunpräzipitation (Kapitel 3.2.5) oder nach Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs durch huEGF oder huMIF (Kapitel 3.4.16 und 3.4.17) und diente der Analyse der Proben in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot und Immundetektion.

Bei den Koimmunpräzipitationen wurden für den Input 50 µl Zellüberstand mit 20 µl NuPage LDS *sample buffer* (4x) und 10 µl DTT versetzt. Die beiden anderen Proben, Kontrolle und *Pulldown*, wurden im Anschluss an den letzten Waschschriff nach der Antikörperinkubation mit je 40 µl 2x NuPage LDS *sample buffer* (bestehend aus 10 µl DTT (1 M), 20 µl NuPage LDS *sample buffer* (4x) und 10 µl ddH<sub>2</sub>O) lysiert.

Zur Vorbereitung der Proben aus den *Signaling*-Experimenten für die SDS-PAGE wurden die Zellen in den entsprechenden *wells* einer 24-*well*-Platte durch Zugabe von 100 µl des Zelllysierungspuffers auf Eis lysiert. Alle Zelllysate wurden in beschriftete Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gesetzt. Nach 5-minütiger Denaturierung der Proben bei 95°C wurden die Reaktionsgefäße kurz auf Eis gelagert und dann 1 min bei 16400 rpm und 4°C abzentrifugiert. Eine 7,5-minütige Ultraschallbehandlung der Proben am BioRuptor der Firma Diagenode und ein erneutes Zentrifugieren für 5 min bei 16400 rpm und 4°C folgten. Abschließend wurden die Zelllysate bis zu ihrer Auftragung auf ein Gel bei -20°C aufbewahrt.

### 3.4.19 MTT-Assay

Um vermeintlich toxische Substanzen auf ihrer Zytotoxizität hin zu untersuchen, wird häufig ein MTT-Assay durchgeführt, der darauf beruht, dass der gelbe wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zum blau-violetten, wasserunlöslichen Formazan reduziert wird. Anhand des Grads an Verstoffwechslung des Tetrazoliumsalzes zu Formazan kann die Lebendrate von Zellen nach Behandlung mit einer Substanz verglichen und berechnet werden. Als Kontrolle dienen Zellen ohne Behandlung (Lebendrate = 100%).

Am ersten Tag wurden HtTA1-Zellen ( $2 \times 10^4$ /well einer 96-well-Platte) ausgesät und bei 37°C kultiviert. Für den Zytotoxizitätsassay am zweiten Tag wurde MTT frisch eingewogen, in PBS gelöst und sterilfiltriert (5 mg/ml), sowie verschiedene Konzentrationen an CPZ (0, 5, 8, 10, 25, 50, 75 und 100 µM) angesetzt. Nach Zugabe der unterschiedlichen CPZ-Konzentrationen (11 µl) zu den Zellen und 40 minütiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und durch 100 µl D-MEM/well ersetzt. Bei zwei wells wurden die Zellen durch Zugabe von 1% Triton-X-100 lysiert (= Hintergrund-OD von der Platte). Das neue Medium wurde anschließend mit MTT (25 µl/well) versetzt und die Zellen wurden für 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt, zu jedem well wurden 0,4 N HCl in Isopropanol (100 µl) gegeben, 10 min bei RT durch Klopfen gemischt, jedes well mit ddH<sub>2</sub>O (100 µl) versetzt und durch Auf- und Abpipettieren Zellen und Lösungsmittel gemischt. Abschließend konnte die OD<sub>570nm</sub> am Victor Reader ausgelesen werden.

### 3.5 Molekularbiologische Methoden

#### 3.5.1 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E.coli*

Die Effizienz einer Hitzeschock-Transformation hängt entscheidend von der Qualität der eingesetzten Plasmid-DNA und der Kompetenz der Bakterienzellen ab.

Unter einer Transformation wird allgemein das Einbringen freier DNA in Wirtszellen verstanden. Zur Selektion transformierter von nicht-transformierten Zellen dient eine auf der eingebrachten Plasmid-DNA kodierte Antibiotikum-Resistenz. Bei der Hitzeschock-Transformation wird die Zellmembran der Bakterien durch kurzzeitigen Hitzeschock porös gemacht. Durch diese Poren kann die Plasmid-DNA in die Bakterien gelangen.

Zu Beginn einer Transformation wurden Aliquots kompetenter *E.coli* XL10 Bakterienzellen langsam auf Eis aufgetaut. Die Plasmid-DNA wurde zu den Bakterien gegeben, kurz gemischt und die Reaktionsgefäße wurden dann für eine Inkubationsdauer von 30 min auf Eis belassen. In dieser Zeit kann sich die DNA an die Bakterienzellmembran anlagern. Nach den 30 min erfolgte die eigentliche Transformation bei 42°C für 45 sec, an die sich sofort eine zweiminütige Inkubation auf Eis anschloss. Nach Zugabe von 350 µl LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 220 rpm und 37°C geschüttelt. Diese einstündige Inkubation dient sowohl der Vermehrung der Bakterienzellen, als auch der Ausbildung der Antibiotikumresistenz. Im Anschluss wurden die Bakterien nach Zentrifugation bei 6000 rpm für 5 min, Reduzierung des Überstands und Resuspendieren des Pellets auf Agar-Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37°C ü.N. inkubiert.

### 3.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen von *E.coli* wurde das *Plasmid Maxi Kit* der Firma Qiagen verwendet und gemäß der beiliegenden Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

### 3.5.3 Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA

Zur Bestimmung von Reinheit und Konzentration der Plasmid-DNA nach einer Maxi-Präparation wurde das Verhältnis  $OD_{260/280}$  photometrisch am Spektrophotometer Nanodrop ND-1000 ermittelt und die Konzentration in ng/μl ausgegeben. Bei reinster Plasmid-DNA liegt das Verhältnis  $OD_{260/280}$  zwischen 1,8 und 2.

### 3.5.4 Klonierung von Rab5wt in pEGFP-C1

#### 3.5.4.1 Amplifikation von Rab5wt-DNA mittels PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion, kurz PCR, handelt es sich um eine Methode zur Amplifizierung und gegebenenfalls Modifizierung von DNA. Zur Initiierung der Reaktion werden chemisch synthetisierte Oligonukleotide als sogenannte Primer benötigt. Diese flankieren die zu amplifizierende Region der DNA und sind jeweils zu einem der DNA-Einzelstränge komplementär. Bei der PCR erfolgen mehrere Zyklen der drei Reaktionsschritte – Denaturierung, Annealing, Elongation –, die schließlich zur exponentiellen Anreicherung des zwischen den Primerregionen liegenden DNA-Abschnitts führen. Im ersten Schritt der PCR, der Denaturierung, wird durch Hitze die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs in seine beiden Einzelstränge bewirkt. In der anschließenden Annealing-Phase können sich die Primer an ihre komplementären DNA-Bereiche anlagern und somit den Startpunkt für die DNA-Polymerase kennzeichnen. Während der Elongationsphase werden die entstandenen Einzelstränge durch Anlagerung entsprechender dNTPs von der DNA-Polymerase wieder zu DNA-Doppelsträngen vervollständigt.

Die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion wurde in diesem Fall angewandt, um eine ausreichende Menge an DNA des Rab5-Gens für die Klonierung in den pEGFP-C1-Vektor zu bekommen. Als DNA-Polymerase wurde hierbei eine Go Taq Flexi Polymerase, sowie die vom Hersteller Promega mitgelieferten Reagenzien verwendet.

Die für die PCR notwendigen Komponenten wurden nach folgendem Schema zusammenpipettiert.

Bezeichnung	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
5 x Go Taq Flexi Puffer	5 x	1 x
Rab5-Primer reverse		
Rab5-Primer forward		
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM

dNTPs	10 mM	400 $\mu$ M
pCMVRab5wt (2 $\mu$ g/ml)	2 mg/ml	8 ng/ml
Go Taq Polymerase	5 u/ $\mu$ l	0,1 u/ $\mu$ l
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>		

Die Polymerase-Ketten-Reaktion fand in einem programmierbaren Thermocycler mit folgenden Parametern statt:

<u>Zyklus</u>	<u>Temperatur [°C]</u>	<u>Dauer [min]</u>	<u>Zyklusanzahl</u>
Initiale Denaturierung	94		1
Denaturierung	94	0,5	35
Annealing	62	0,75	35
Elongation	72	1	35
<u>Finale Elongation</u>	<u>72</u>	<u>5</u>	<u>1</u>

#### **3.5.4.2 Aufreinigen von Plasmid-DNA**

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurde das QIAquick PCR-Purification Kit gemäß Herstellerangaben verwendet.

#### **3.5.4.3 Bestimmung der Konzentration der Plasmid-DNA**

Zur Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der Plasmid-DNA (siehe Kap. 3.5.3).

#### **3.5.4.4 Restriktionsverdau von Insert und Vektor**

Die *in vitro*-Spaltung von DNA mittels bakterieller Enzyme – Endonukleasen - wird als Restriktion bezeichnet. Endonukleasen spalten Phosphodiesterbindungen innerhalb spezifischer, meist palindromischer DNA-Sequenzen.

Die Verwendung der Restriktionsenzyme erfolgte gemäß Herstellerangaben, wobei je 2  $\mu$ g DNA mit 0,2 Units Enzym für 2 h verdaut wurden.

Die für die Restriktionsansätze nötigen Komponenten wurden wie folgt zusammenpipettiert.

#### Restriktionsverdau von wtRab5:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Konzentration der Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
10 x Puffer 0 <sup>+</sup>	10 x	1 x
Sal I	10 u/ $\mu$ l	0,2 u/ $\mu$ l

Bgl II	10 u/μl	0,2 u/μl
wtRab5	13,4 ng/μl	11,5 ng/μl
ddH <sub>2</sub> O		

#### Restriktionsverdau von pEGFP-C1:

<u>Bezeichnung</u>	<u>Konzentration der Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
10 x Puffer 0 <sup>+</sup>	10 x	1 x
Sal I	10 u/μl	0,2 u/μl
Bgl II	10 u/μl	0,2 u/μl
EcoR I	10 u/μl	0,2 u/μl
pEGFP-C1	1,24 μg/ml	0,025 μg/ml
ddH <sub>2</sub> O		

Nach Inkubation für 2 h bei 37°C wurde der Vektor durch Zugabe von 1 μl CIAP und anschließende Inkubation für 1 h bei 37°C dephosphoryliert, um Religation von geschnittenem Vektor zu vermeiden.

#### **3.5.4.5 Ligation von Insert und Vektor**

Die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente, Insert und Vektor, durch eine enzymatisch katalysierte Reaktion zur Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe bezeichnet man als Ligation.

Bei der hier verwendeten Ligase handelt es sich um die Ligase des T4-Phagen (T4-Ligase) der Firma Fermentas. Das Verhältnis von Vektor zu Insert entsprach 1:1.

Für den Ligationsansatz wurden die folgenden Komponenten zusammenpipettiert.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Konzentration der Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
T4 Ligase-Puffer	10 x	1 x
pEGFP-C1	10 ng/μl	1 ng/μl
wtRab5	4 ng/μl	1 ng/μl
ddH <sub>2</sub> O		
T4-Ligase	5 u/μl	0,25 u/μl

Die T4-Ligase wurde erst nach vorheriger Inaktivierung der CIAP durch Inkubation für 5 min bei 65°C zum Ligationsansatz hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation des

Ansatzes über Nacht bei 4°C. Der Verdau mit EcoR I für 1 h und die nachfolgende Inaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65°C erfolgten am Folgetag.

#### **3.5.4.6 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E.coli***

Die Methode der Hitzeschock-Transformation kompetenter *E.coli* wurde bereits in Kapitel 3.5.1 näher beschrieben.

#### **3.5.4.7 Identifizierung geeigneter Klone**

Zur Überprüfung der enthaltenen Plasmid-DNA der auf den Agar-Selektionsplatten angewachsenen Kolonien transformierter *E. coli*s wurden jeweils Schüttelkulturen à 5 ml LB-Medium mit 5 µl Kanamycin mit je einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben isoliert. Im Anschluss wurde ein Restriktionsverdau zur Überprüfung der Richtigkeit der Plasmid-DNA durchgeführt (siehe Kap. 3.5.4.4).

#### **3.5.4.8 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Ermittlung des Molekulargewichts der verdauten Plasmid-DNA wurde diese mit Lämmli-Puffer versehen und zusammen mit einem Größenstandard (1 kb DNA-Marker von Fermentas) auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente durch die horizontale Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung gemäß der Größe der DNA-Fragmente. Eine anschließende Färbung der DNA durch 20-minütige Inkubation des Agarosegels in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) ermöglicht das Sichtbarmachen der DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator. Das Bandenmuster im Agarosegel wurde mit dem erwarteten Bandenmuster für das Plasmid verglichen und daraufhin entschieden, ob der Ursprungsklon richtig war oder nicht.

#### **3.5.4.9 Sequenzierung**

Die Sequenzierung der klonierten Gensequenz dient dazu festzustellen, ob das generierte Konstrukt fehlerfrei vorliegt. Dazu wurden 15 µl der Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 50 ng/µl zur Analyse an die Firma Eurofins MWG Operon versandt. Die Primer pEGFP-C1-forward und CMV-forward wurden als Sequenzierungsprimer eingesetzt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit der Software LALIGN ([http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/LALIGN\\_form\\_parser](http://www.ch.embnet.org/cgi-bin/LALIGN_form_parser)). Die Sequenz des pEGFP-C1-Rab5-Konstruktes befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

## 4 Ergebnisse

Über den Mechanismus der Endozytose des Zytokins MIF in Zielzellen ist trotz seiner Entdeckung vor 45 Jahren<sup>120,121</sup> und trotz des kürzlich erlangten Wissens über die vorhandenen MIF-Rezeptoren CD74<sup>118</sup>, CXCR2 und CXCR4<sup>112</sup> nur wenig bekannt. Erste Untersuchungen zur MIF-Endozytose wurden im Zusammenhang mit Experimenten zur Interaktion von intrazellulärem, zytosolischen MIF mit der COP9-Signalosomkomponente JAB1/CSN5 durchgeführt. Darin konnte zwar gezeigt werden, dass exogen zu Makrophagen zugegebenes MIF nach seiner Aufnahme und zytosolischer Translokation aus dem endo-/lysosomalen Weg mit JAB1/CSN5 interagiert<sup>315,316</sup>, allerdings blieb die Frage nach dem genauen Endozytosemechanismus, über den die Aufnahme erfolgt, sowie nach dem endosomal-zytosolischen Translokationsprozess weiterhin weitgehend ungeklärt. Aufgrund dieser Anfangsstudien wurde angenommen, dass die MIF-Endozytose über einen Rezeptor-unabhängigen Mechanismus verlief. Spätere Studien ließen jedoch vermuten, dass die zelluläre Aufnahme von MIF bei physiologischen MIF-Konzentrationen schnell ablief, was eher auf einen kanonischen rezeptorvermittelten Endozytoseweg hindeutete<sup>238,317</sup>. Trotz dieser Vermutung blieb unaufgeklärt, um welchen der in Säugetierzellen möglichen Endozytosewege es sich bei der MIF-Internalisierung handeln könnte. Auch welcher exakte Mechanismus der MIF-Endozytose zugrunde liegt, ist nicht bekannt. Erste Erkenntnisse bezüglich mechanistischer Aspekte den MIF-Endozytoseweg betreffend wurden erstmals kürzlich erlangt, als Xie *et al.* und Son *et al.* Hinweise darauf fanden, dass  $\beta$ -Arrestin-1 und CD74 in die Endozytose von MIF involviert seien und sich eine Komplexbildung mit Thioredoxin (TRX) förderlich auf den Endozytoseprozess auswirkte<sup>318,319</sup>.

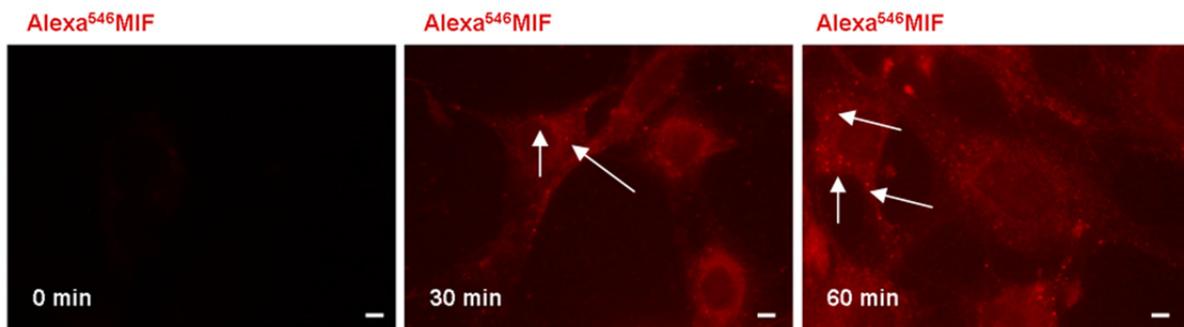
Der erste Schritt zur Aufklärung des Endozytosemechanismus bestand darin, exogenes MIF in Zellen nachzuweisen.

### 4.1 MIF wird über einen Endozytosemechanismus in Zellen internalisiert

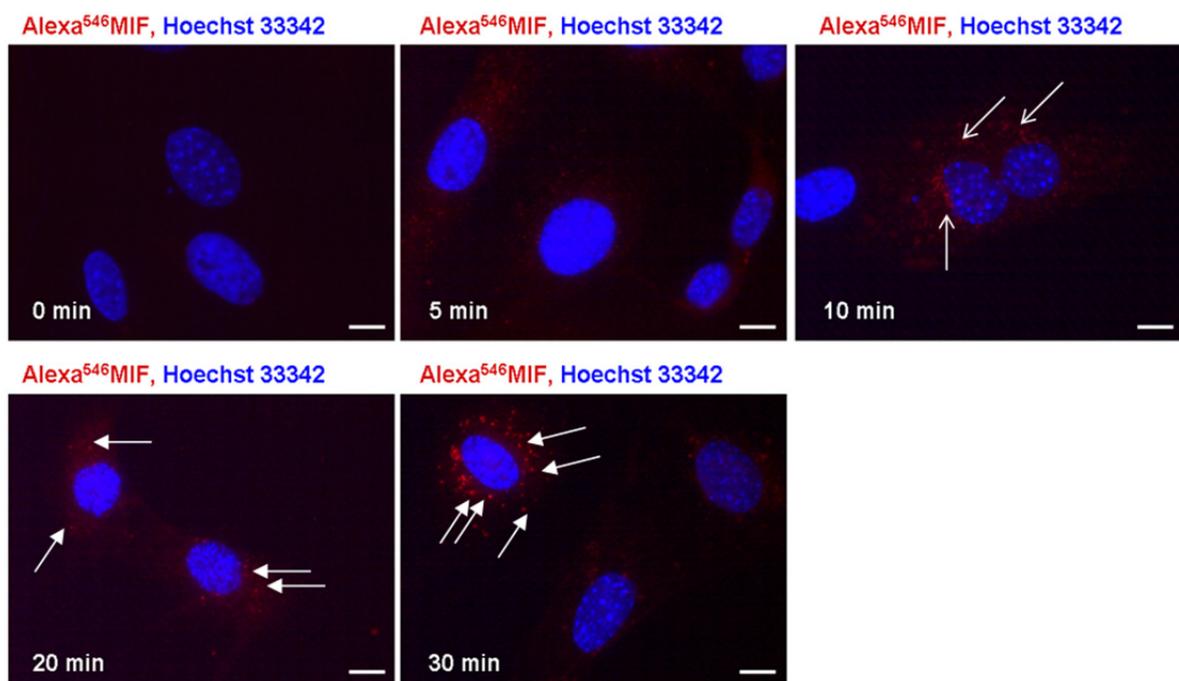
Im Gegensatz zu anderen Zytokinen wird MIF quasi-konstitutiv in vielen Quell- und Zielzellen exprimiert. Um daher exogenes von schon in den Zellen vorhandenem MIF eindeutig unterscheiden zu können, wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor 546 markiertes humanes MIF in Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays verwendet. Dass die Fluoreszenzfärbung des rekombinanten MIF mit einem Alexa-Fluor Farbstoff mit keinerlei Verlust seiner Bioaktivität einherging, wurde vorab bereits nachgewiesen<sup>118,315</sup>. Die Endozytose und besonders die genauen Transportwege innerhalb von Zellen sollten zunächst in *mouse embryonic fibroblasts* (MEF-Zellen) analysiert werden, da diese bereits dafür bekannt sind, mehrere Signaltransduktionswege wie beispielsweise den PI3K/AKT-Signalweg über MIF aktivieren zu können<sup>239</sup>. Als erstes Indiz für eine Internalisierung des Zytokins MIF über einen Endozytosemechanismus wurde zunächst untersucht, ob Alexa<sup>546</sup>-MIF (200 ng/ml) nach Inkubationsdauern von 30 und 60 min bei 37°C in MEF-Zellen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 20A). Da aus diesen Studien deutlich hervorging, dass Alexa<sup>546</sup>-MIF sich nach bereits einer Inkubationszeit von 30 min innerhalb der Zellen in vesikulären Strukturen befindet, stellte sich als nächstes die Frage, ob der Vorgang der Endozytose auch schon nach kürzeren Zeiten stattfand. Daher wurde die Zeitkinetik für kurze

Inkubationsdauern von 5 bis 30 min näher untersucht. Um sicherzustellen, dass das in den Zellen detektierte Alexa<sup>546</sup>-MIF sich tatsächlich innerhalb der MEF-Zellen befand und die Färbung nicht aus unspezifischer Bindung an die Zelloberfläche resultierte, erfolgten nach allen Inkubationen gründliche Waschschrte (ein azider Waschschrte und zwei Waschschrte mit PBS), bevor die Zellen fixiert und montiert wurden. In den Studien mit Inkubationsdauern zwischen 5 und 30 min bei 37°C zeigte sich, dass für Alexa<sup>546</sup>-MIF-positive Strukturen erstmals bereits nach 10 min erkennbar waren und sich nach 30 min auch deutlich als vesikuläre Strukturen abzeichneten (Abbildung 20B). Zur besseren Orientierung innerhalb der Zelle wurden die Zellkerne durch den Farbstoff Hoechst33342, der an DNA bindet, zusätzlich angefärbt. Die Daten verdeutlichen, die schnelle und effiziente Endozytose des Zytokins MIF in Fibroblasten, auch wenn es in niedrigen, physiologischen, Konzentrationen zugegeben wurde, und bestätigte gleichzeitig die Resultate aus früheren Studien in Makrophagen, HeLa und NIH/3T3-Zellen, die die MIF-Endozytose dort nachwiesen<sup>238,315-317</sup>.

A



B

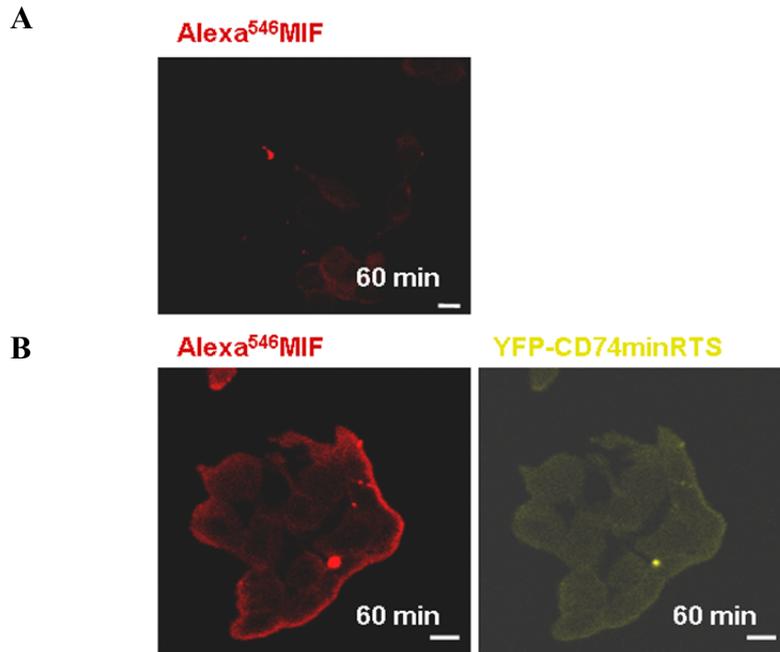


**Abbildung 20: MIF wird endozytiert und akkumuliert in punktierten Strukturen in MEF-Zellen. (A)** MEF-Zellen wurden mit Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) für 0, 30 oder 60 min inkubiert. Danach wurden sie auf Eis

gesetzt, einmal mit eiskaltem Glycinpuffer (pH 2.8), zweimal mit eiskaltem PBS (pH 7.2) gewaschen und dann mittels Zugabe von 3,6% Paraformaldehyd fixiert und auf Objektträgern mit Fluoromount-G montiert. Die Bildaufnahmen erfolgten nach Inkubation der Zellen mit Alexa<sup>546</sup>MIF für die jeweils angegebenen Zeitdauern. **(B)** Der Versuchsablauf war weitestgehend so wie in A beschrieben. Zusätzlich zu den Zeitpunkten in A wurde eine Zeitkinetik mit Inkubationsdauern von Alexa<sup>546</sup>MIF zwischen 0 und 120 min durchgeführt und die Zellkerne mit Hoechst33342 angefärbt. Endozytiertes MIF wird durch die Pfeile verdeutlicht. *Scale bars*: 10 µm.

#### 4.1.1 Der Endozytosemechanismus von MIF ist temperaturabhängig

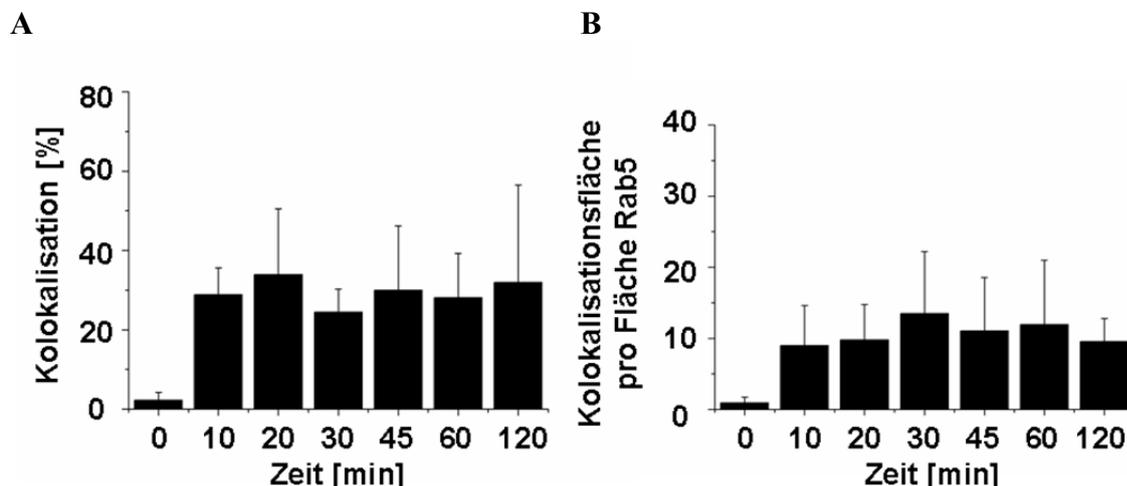
Die Effizienz von Endozytosemechanismen ist entscheidend von der für die Studien gewählten Inkubationstemperatur abhängig. Aufgründessen und da die in Abbildung 20 gezeigten Ergebnisse alle aus bei 37°C inkubierten MEF-Zellen resultierten, sollte vor näherer Betrachtung der MIF-Endozytose und Aufschlüsselung, wobei es sich bei den vesikulären Strukturen tatsächlich handelte, zunächst in einem Kontrollexperiment ausgeschlossen werden, dass Endozytose von MIF bereits bei 4°C stattfindet. Hierzu wurde in HEK293-Zellen und solchen HEK293-Zellen, die transient mit dem Plasmid pEYFP-C1-CD74minRTS transfiziert wurden, eine mögliche Endozytose von Alexa<sup>546</sup>-MIF bei 4°C untersucht, indem die Zellen zunächst für 10 min auf Eis gestellt wurden (Temperaturänderung von 37°C auf 4°C). Anschließend erfolgten Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF (5 µg/ml), Inkubation für 1 h bei 4°C, um einen Gleichgewichtszustand zwischen der Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung zu erreichen, ein Waschschriff, sowie Fixierung der Zellen und Montage der Deckgläschen auf beschrifteten Objektträgern. Die anschließende mikroskopische Analyse der Zellen bestätigte, dass bei 4°C keine MIF-Endozytose stattfand. Des Weiteren geht aus Abbildung 21 hervor, dass sich Alexa<sup>546</sup>-MIF in HEK293-Zellen nur schwach an die Zelloberfläche anlagern kann. Diese Fähigkeit der äußeren Anhaftung konnte durch transiente Transfektion von CD74minRTS nachweislich verbessert werden, was durch eine Erhöhung der roten Farbe (repräsentiert gebundenes Alexa<sup>546</sup>-MIF) auf der Zelloberfläche veranschaulicht wird. Dieses Ergebnis kann auch dadurch begründet werden, dass Wildtyp-HEK293-Zellen kein CD74 exprimieren, sondern nur moderate Mengen an CXCR4 auf ihrer Zelloberfläche besitzen. Eine Internalisierung von MIF ins Zellinnere konnte jedoch in diesen beiden Ansätzen bei 4°C trotz einer Inkubationszeit von 1 h nie erreicht werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Bei 4°C findet keine MIF-Endozytose in HEK293- und HEK293-YFP-CD74minRTS-Transfektanten statt.** HEK293-Zellen ( $1,7 \times 10^5$ ) wurden 24 h vor Transfektion in die *wells* einer 6-well-Platte ausgesät. Bei der Hälfte der *wells* erfolgte eine transiente Transfektion der HEK293-Zellen mit dem Plasmid pEYFP-C1-CD74minRTS (1 µg). Nach weiteren 24 h wurden die HEK293-Zellen und HEK293-YFP-CD74minRTS-Transfektanten abgelöst und auf sterile Deckgläschen in die *wells* einer neuen 6-well-Platte ausgesät. Am Folgetag wurde die Temperatur zunächst für 10 min von 37°C auf 4°C geändert, dann erfolgten Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF (5 µg/ml), Inkubation für 1 h bei 4°C, ein Waschschriff mit PBS, sowie die Fixierung der Zellen mit 3,6 % Paraformaldehyd für mindestens 20 min bei 4°C, gefolgt von einem weiteren Waschschriff und der Montage der Deckgläschen auf beschrifteten Objektträgern. Zur Analyse wurden Bildaufnahmen an einem LSM510 Konfokalmikroskop angefertigt. **(A)** WT-HEK293-Zellen, **(B)** HEK293-YFP-CD74minRTS-Transfektanten. Rot: Alexa<sup>546</sup>-MIF; Gelb: YFP-CD74minRTS. *Scale bars*: 10 µm.

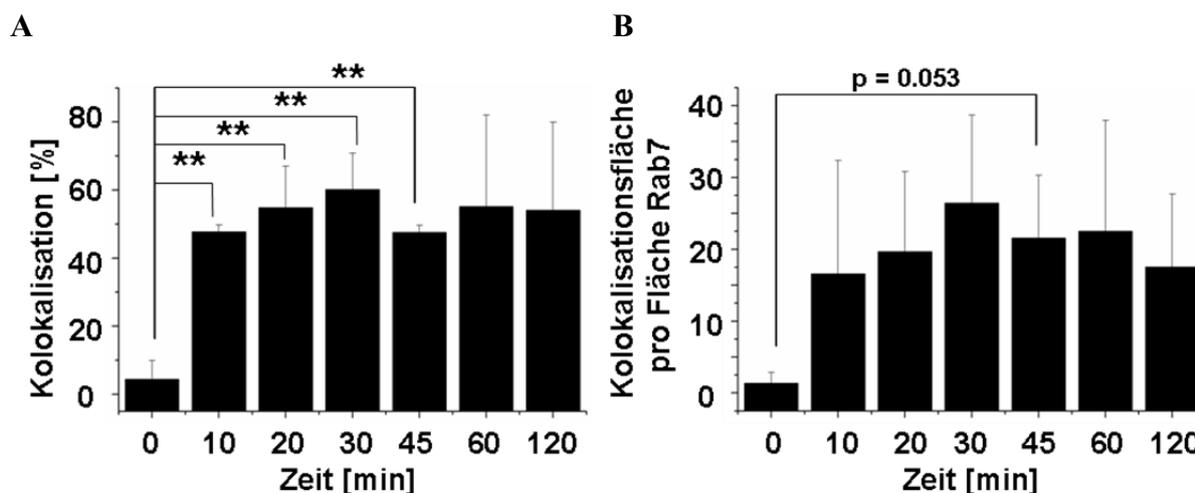
Aufgrund des erwiesenen Ausschluss einer funktionierenden Endozytose von Alexa<sup>546</sup>-MIF bei 4°C (Abbildung 21) sollte im Folgenden der Frage nach der Art des endolysosomalen Kompartiments, in dem Alexa<sup>546</sup>-MIF nach Endozytose in MEF-Zellen akkumuliert, weiter nachgegangen werden. Hierzu wurden Studien durchgeführt, in denen HEK293-Zellen transient mit einem pEGFP-C1-Rab5-Plasmid (Marker für die frühen Endosomen, Klonierung von Rab5GFP siehe Kapitel 4.2.1) oder einem pEGFP-C1-Rab7-Plasmid (Marker für die späten Endosomen) transfiziert wurden. Die Zellen wurden für 1 h bei 4°C vorinkubiert. In dieser Zeit konnte sich ein Gleichgewicht zwischen an seine Zelloberflächenrezeptoren gebundenem Alexa<sup>546</sup>-MIF (1 µg/ml) und freiem Alexa<sup>546</sup>-MIF einstellen. Nach erfolgter Temperaturänderung von 4°C zu 37°C (*temperature shift*) wurde eine Internalisierung des Alexa<sup>546</sup>-MIF für Zeitdauern zwischen 0 und 120 min ermöglicht. Der Vorgang wurde durch verschiedene Waschschriffe, gefolgt von der Fixierung der Zellen und ihrer Montage auf Objektträgern, beendet. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Analyse der ausgewerteten Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen für die Kollokalisierung zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und dem frühen endosomalen Marker Rab5. In Abhängigkeit von der Fokusebene wird eine Kollokalisierung zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Rab5GFP entweder durch eine Gelbfärbung oder durch rote Alexa<sup>546</sup>-MIF-Färbung innerhalb von grünen für Rab5-positiven vesikulären Kompartimenten veranschaulicht. Die quantitative Analyse der Bildaufnahmen erfolgte sowohl visuell durch Auszählen für eine Kollokalisierung zwischen Rab5 und Alexa<sup>546</sup>-MIF

positiver Zellen (Abbildung 22A), als auch durch Verwendung der Cell<sup>F</sup>-Software zur Quantifizierung der für beide Fluoreszenzen-positiven Zellflächen (Abbildung 22B). Kolokalisationsereignisse zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Rab5GFP zeigten sich erstmals 10 min nach Temperaturänderung und blieben dann in etwa konstant vorhanden (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Nach Änderung der Inkubationstemperatur von 4°C auf 37°C wird MIF internalisiert und kolokalisiert mit den frühen Endosomen in HEK293-Zellen.** HEK293-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab5GFP (Marker der frühen Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion der Zellen wurden sie für 10 min bei 4°C und nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>MIF (1 µg/ml) für weitere 60 min bei 4°C inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und durch die gleiche Menge kaltes Medium ersetzt. Anschließend wurde die Änderung der Inkubationstemperatur von 4°C auf 37°C für die verschiedenen Zeitdauern durchgeführt. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem Glycinpuffer (pH 2.8) und zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 3,6% Paraformaldehyd fixiert und die Deckgläschen für die anschließende mikroskopische Analyse mittels Fluoromount-G auf Objektträgern montiert. **(A)** Das Balkendiagramm zeigt die Quantifizierung der Kolokalisationsereignisse, wobei mindestens 100 Zellen pro Zeitpunkt mit unabhängigen xy-Koordinaten nach rot/grün Kolokalisation (gelbe Färbung) bzw. grünen Ringen mit roter Füllung abhängig von der Fokusebene analysiert wurden. Alle Zellen mit wenigstens einem Kolokalisationsereignis wurden als positive gezählt. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt die Kolokalisationsfläche bezogen auf die vorhandene Rab5GFP-Fläche quantifiziert mittels Cell F Software der Firma Olympus. Die Balken verdeutlichen die Kolokalisation zwischen Rab5GFP und Alexa<sup>546</sup>MIF. Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 23 sind die entsprechenden Ergebnisse für die Kolokalisation von Alexa<sup>546</sup>-MIF mit dem späten endosomalen Marker Rab7GFP dargestellt. Auch hierbei erfolgte die quantitative Analyse der Fluoreszenzaufnahmen sowohl visuell (Abbildung 23A), als auch über die Cell<sup>F</sup>-Software (Abbildung 23B). Eine eindeutige Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Rab7GFP zeigte sich auch hierbei erstmals 10 min nach Temperaturshift, erreichte sein Maximum nach 30 min und blieb dann im Wesentlichen konstant.



**Abbildung 23: Nach Änderung der Inkubationstemperatur von 4°C auf 37°C wird MIF internalisiert und kolokalisiert mit den späten Endosomen in HEK293-Zellen.** HEK293-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion der Zellen wurden sie für 10 min bei 4°C und nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>MIF (1 µg/ml) für weitere 60 min bei 4°C inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch die gleiche Menge kaltes Medium ersetzt. Anschließend wurde die Änderung der Inkubationstemperatur von 4°C auf 37°C für die verschiedenen Zeitdauern durchgeführt. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem Glycinpuffer (pH 2.8) und zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 3,6% Paraformaldehyd fixiert und die Deckgläschen für die anschließende mikroskopische Analyse mittels Fluoromount-G auf Objektträgern montiert. **(A)** Das Balkendiagramm zeigt die Quantifizierung der Kolokalisationsereignisse, wobei mindestens 100 Zellen pro Zeitpunkt mit unabhängigen xy-Koordinaten nach rot/grün Kolokalisation (gelbe Färbung) bzw. grünen Ringen mit roter Füllung abhängig von der Fokusebene analysiert wurden. Alle Zellen mit wenigstens einem Kolokalisationsereignis wurden als positive gezählt. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt die Kolokalisationsfläche bezogen auf die vorhandene Rab7GFP-Fläche quantifiziert mittels Cell<sup>F</sup>-Software der Firma Olympus. Die Balken verdeutlichen die Kolokalisation zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>-MIF. Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten. \*\* P < 0,01.

## 4.2 Kolokalisation von MIF mit dem endolysosomalen Kompartiment

Die Ergebnisse aus Abbildung 20 ließen vermuten, dass MIF in MEF-Zellen endozytiert wird und dass die vesikulären Strukturen, in denen sich Alexa<sup>546</sup>-MIF akkumulierte, eine Form eines endolysosomalen Kompartiments, frühe oder späte endosomale Vesikel, repräsentierten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden bereits verschiedene Internalisierungsstudien mit Alexa<sup>546</sup>-MIF in mit einem pEGFP-C1-Rab5- oder pEGFP-C1-Rab7-Plasmid transfizierten HEK293-Zellen in *temperature shift*-Experimenten durchgeführt, die zeigten, dass bei 4°C an die Zelloberfläche gebundenes exogen verabreichtes Alexa<sup>546</sup>-MIF nach Anhebung der Temperatur auf 37°C endozytieren konnte und sowohl mit frühen, als auch mit späten Endosomen kolokalisierte. Im Folgenden sollten weitere Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF durchgeführt werden, bei denen ebenfalls entweder die frühen Endosomen durch Markierung mittels des entsprechenden Markers Rab5GFP oder die späten Endosomen durch Markierung mittels des späten endosomalen Markers Rab7GFP angefärbt wurden.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten sollten die transfizierten HEK293-Zellen diesmal, anliegend an den wirklichen Hergang innerhalb eines Organismus, dauerhaft dem exogen hinzugegebenen Alexa<sup>546</sup>-MIF (200 ng/ml) bei 37°C ausgesetzt sein. Um dem

physiologischen Geschehen in der Zelle zusätzlich näher zu kommen, wurde für diese Studien eine MIF-Konzentration von 200 ng/ml statt der bisherigen MIF-Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Anschließend sollte weiterhin aufgeschlüsselt werden, ob Alexa<sup>546</sup>-MIF auch in die Lysosomen gelangt. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher Lysosomenmarker namens LysoSensor Green der Firma Invitrogen verwendet.

#### 4.2.1 Klonierung von Rab5wt in pEGFP-C1

Zur Analyse und Aufklärung des Endozytosemechanismus des Zytokins MIF sollte schrittweise der Transportweg von MIF nach seiner Internalisierung in die Zellen nachvollzogen werden. Da zu Beginn der Studien nur ein Konstrukt zur Markierung der späten Endosomen über die GTPase Rab7 als Fusionsprotein gekoppelt an ein GFP-Protein vorlag, es aber durchaus auch interessant war, sich frühere Stadien der Endozytose anzusehen, war es das Ziel ein Konstrukt zu generieren, durch das die kleine GTPase Rab5 ebenfalls als Fusionsprotein gekoppelt an GFP exprimiert werden konnte. Rab5 wurde als geeigneter Marker ausgewählt, da sie kompartimentspezifisch in frühen Endosomen lokalisiert ist. Nach erfolgreicher Amplifikation der Rab5wt-DNA mittels PCR, Aufreinigung der Fragmente und Restriktionsverdau von Insert und Vektor erfolgte die Ligation der Rab5wt-DNA mit dem pEGFP-C1-Vektor in der Weise, dass sich Rab5 c-terminal vom GFP-Protein befindet (Abbildung 24).

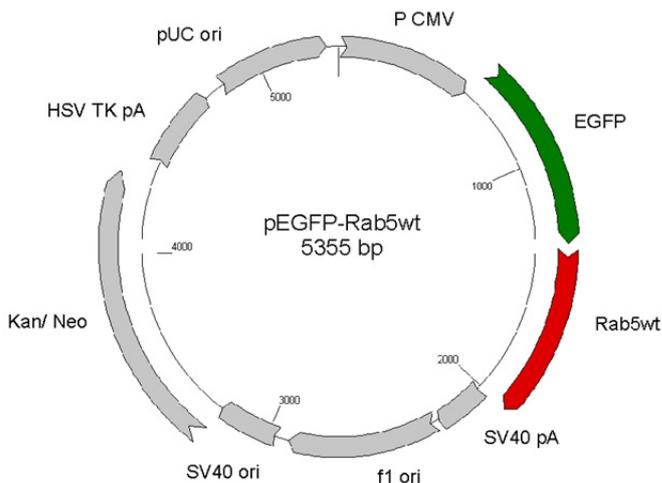


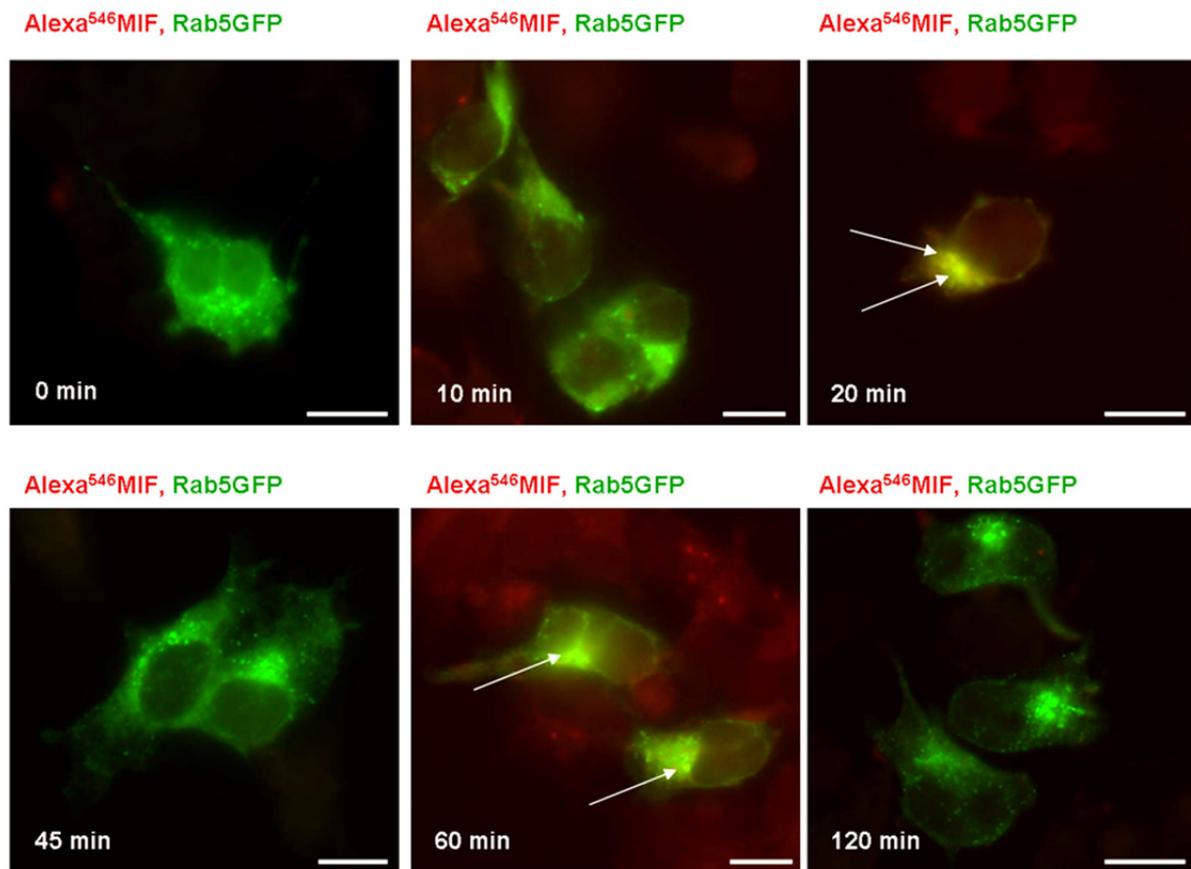
Abbildung 24: Plasmidkarte von pEGFP-C1-Rab5wt.

Nach Ende der Klonierung wurde die hineinklonierte Sequenz sequenziert, um sie auf Mutationen hin zu überprüfen. Hierbei diente die Gensequenz der Originalplasmide als Vergleichssequenz. Trotz einer großen Anzahl an Mutationen auf DNA-Ebene war das Rab5GFP-Konstrukt für die Kolokalisationsstudien brauchbar, da sich diese nicht auf die Proteinsequenz auswirkten.

#### 4.2.2 Kolokalisation mit den frühen Endosomen

Für die Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-MIF, bei denen HEK293-Zellen mit dem frühen endosomalen Marker Rab5GFP transient transfiziert wurden, konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Studien mit Temperaturänderung eine Kolokalisation zwischen Rab5GFP und Alexa<sup>546</sup>-MIF gefunden werden. Diese verdeutlichte sich durch eine Gelbfärbung innerhalb der HEK293-Zellen, die aus einer Überlagerung der endosomalen Grünfärbung und des roten Alexa<sup>546</sup>-MIF resultierte. Die Kolokalisation zwischen Rab5GFP und Alexa<sup>546</sup>-MIF zeigte sich bereits nach einer 10 bis 20-minütigen Inkubation mit Alexa<sup>546</sup>-MIF (Abbildung 25).

Durch die Ergebnisse aus den Internalisierungsversuchen konnten die Erkenntnisse von Kleemann *et al.* bekräftigt werden, dass MIF über einen endozytotischen Mechanismus in Zellen aufgenommen wird<sup>315,316</sup>.



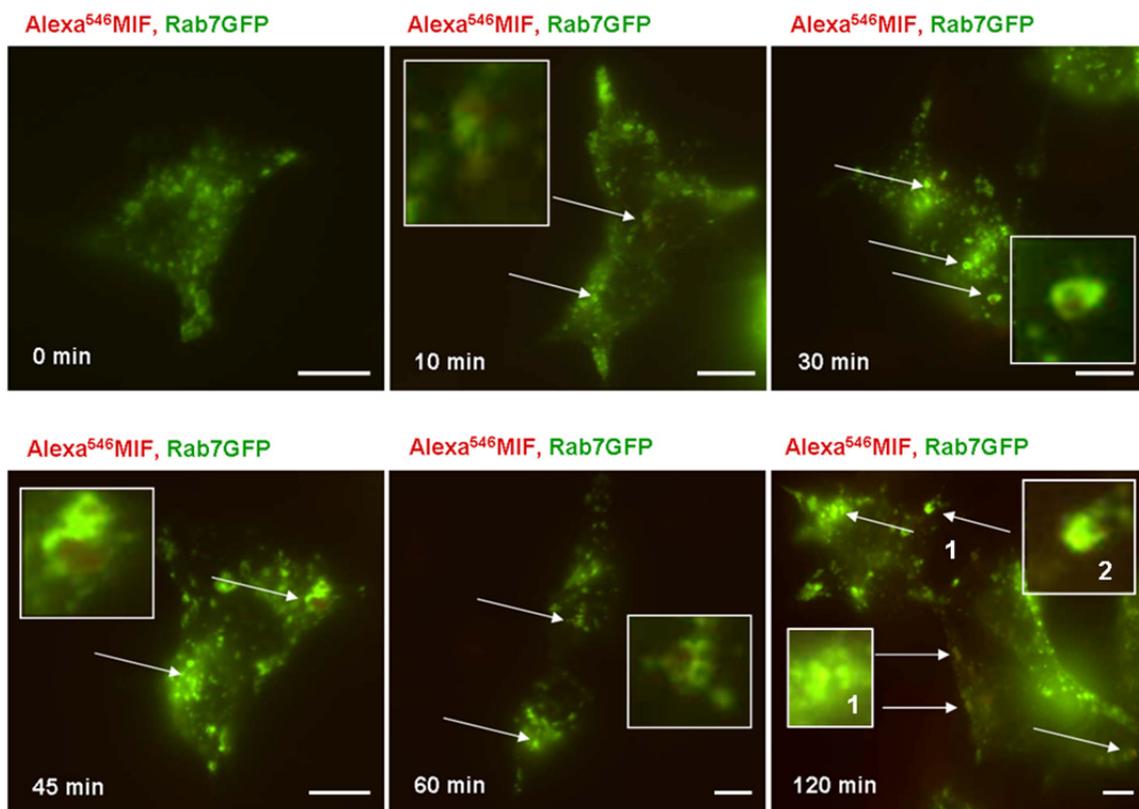
**Abbildung 25: Auch ohne Temperaturänderung internalisiert MIF in HEK293-Zellen und kolokalisiert mit den frühen Endosomen.** HEK293-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab5GFP (Marker der frühen Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die verschiedenen oben angegebenen Zeitdauern mit Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) inkubiert, einmal mit eiskaltem Glycinpuffer pH 2,8, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 3,6% Paraformaldehyd fixiert, bevor sie auf Objektträgern montiert wurden. Die obigen Fluoreszenzbilder zeigen repräsentative Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten (n = 2). Die Pfeile verdeutlichen die Kolokalisation zwischen Rab5GFP und Alexa<sup>546</sup>MIF. Scale bars: 10 µm.

Um die erzielten Erkenntnisse bezüglich der MIF-Internalisierung bei dauerhafter Inkubation der Zellen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF bei 37°C über die Kolokalisierungsdaten mit Rab5 hinaus weiter

zu untermauern, sollten im Folgenden die gleichen Internalisierungsassays bei Markierung der späten Endosomen durchgeführt werden.

### 4.2.3 Kolokalisation mit den späten Endosomen

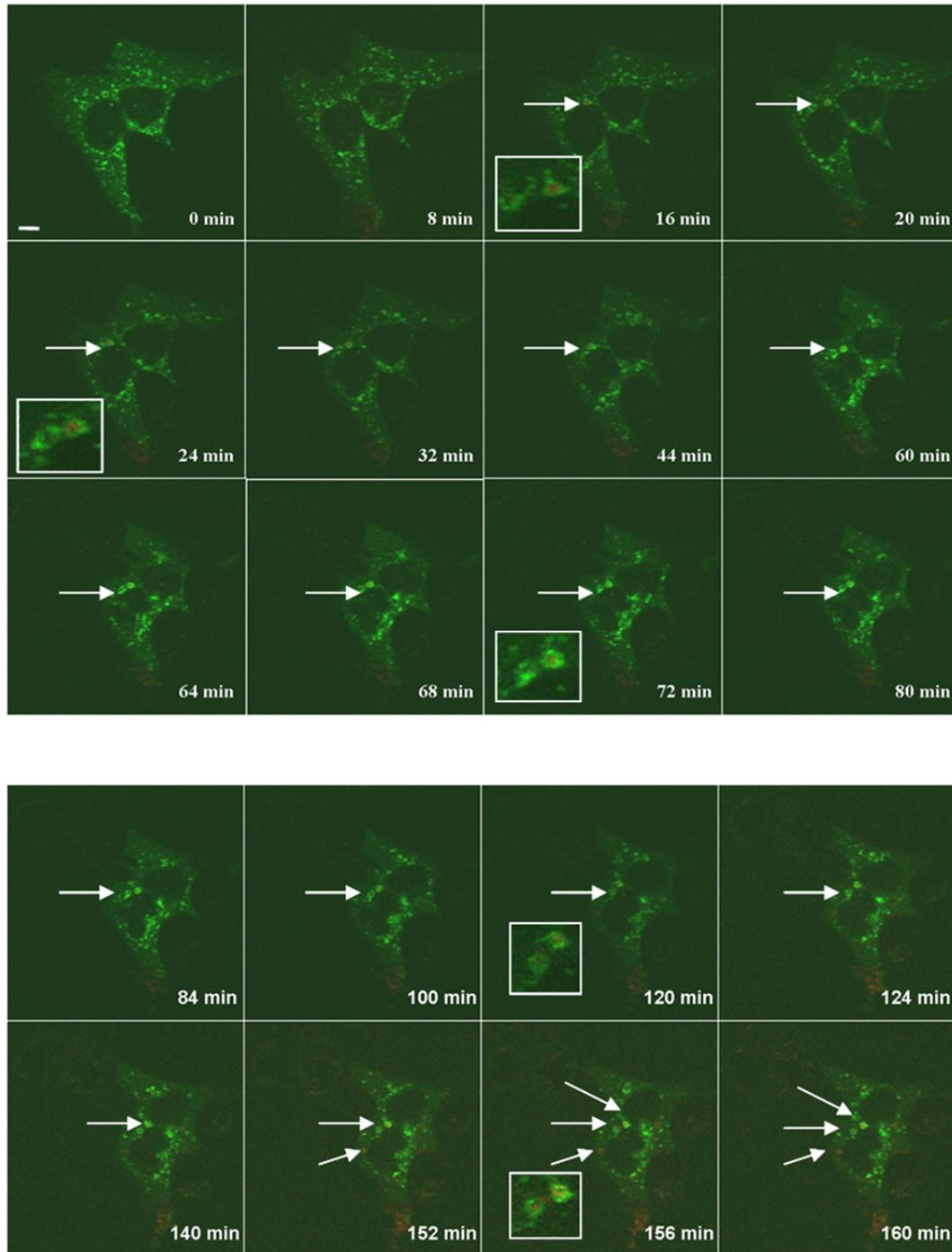
Zur Analyse einer möglichen Kolokalisation zwischen dem späten endosomalen Marker Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>-MIF wurden HEK293-Zellen mit diesem Marker transient transfiziert und nach 2 Tagen einer Inkubation mit exogen hinzugegebenem Alexa<sup>546</sup>-MIF (200 ng/ml) für verschiedene Zeitdauern zwischen 0 und 120 min ausgesetzt. In Abbildung 26 sind repräsentative Zellen dargestellt, in denen eine Kolokalisation zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>-MIF erstmalig nach 10-minütiger Inkubation der HEK293-Zellen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF auftritt und mit voranschreitender Zeit immer eindrucksvoller wird.



**Abbildung 26: Auch ohne Temperaturänderung internalisiert MIF in HEK293-Zellen und kolokalisiert mit den späten Endosomen.** HEK293-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die verschiedenen oben angegebenen Zeitdauern mit Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) inkubiert, einmal mit eiskaltem Glycinpuffer pH 2,8, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 3,6% Paraformaldehyd fixiert, bevor sie auf Objektträgern montiert wurden. Die obigen Fluoreszenzbilder zeigen repräsentative Zellen aus zehn unabhängigen Experimenten (n = 10). Die Pfeile verdeutlichen die Kolokalisation zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>MIF. Scale bars: 10 µm.

Zur Bestätigung der erlangten Resultate und zur Simulation der physiologischen Situation einer Zytokinbindung an seine Membranrezeptoren auf einer Zielzelle wurden zusätzliche Studien verfolgt, bei denen in *live imaging*-Experimenten transient mit einem pEGFP-C1-Rab7-Plasmid transfizierte MEF-Zellen exogen zugesetztem Alexa<sup>546</sup>-MIF ausgesetzt wurden

und dessen Endozytose durchgängig bei physiologischen Bedingungen von 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für bis zu 160 min nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF verfolgt wurden. Zur Dokumentation der Abläufe während der MIF-Endozytose wurde alle 4 min nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF eine Bildaufnahme gemacht (Abbildung 27). Die Analyse der Fluoreszenzaufnahmen ergab, dass eine Kollokalisierung zwischen MIF und den für Rab7-positiven Endosomen - veranschaulicht durch rote vom Alexa<sup>546</sup>-MIF ausgehende Fluoreszenzfärbung umgeben von grünen Vesikeln - bereits 16 min nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF erfolgte. Trotz Weitertransports des Alexa<sup>546</sup>-MIF und Reifung der vesikulären Strukturen konnte diese Kollokalisierung über einen Zeitverlauf bis zu 160 min beobachtet werden. Zeitgleich bildeten sich weitere für MIF- und Rab7-positive Vesikel in der beobachteten Zelle (Abbildung 27).



**Abbildung 27: MIF kolokalisiert mit späten Endosomen in MEF-Zellen in *live imaging*-Experimenten.** MEF-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert und 2 d vor dem *live imaging* Experiment auf Deckgläschen ausgesät. Die entsprechenden Deckgläschen mit den angewachsenen MEF-Zellen wurden am Tag des Experiments in eine Apparatur eingespannt, mit Medium versorgt und auf dem Konfokalmikroskop montiert. Die Bildaufnahmen erfolgten unmittelbar nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>MIF (1 µg/ml) in Abständen von jeweils 4 min. Die weißen Pfeile verdeutlichen die Kolokalisation zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>MIF. *Scale bars*: 10 µm.

Aus den bisherigen Studien zeigte sich, dass das Zytokin MIF auch nach der Markierung mittels des Alexa Fluor 546-Farbstoffs bioaktiv und zur Endozytose fähig war (Abbildung 20). Des Weiteren konnte ein Transport von MIF mit dem endolysosomalen Kompartiment durch Kolokalisationsstudien mit Markern für die frühen (Rab5) und späten (Rab7)

Endosomen in HEK293-Zellen und MEF-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 25 bis Abbildung 27).

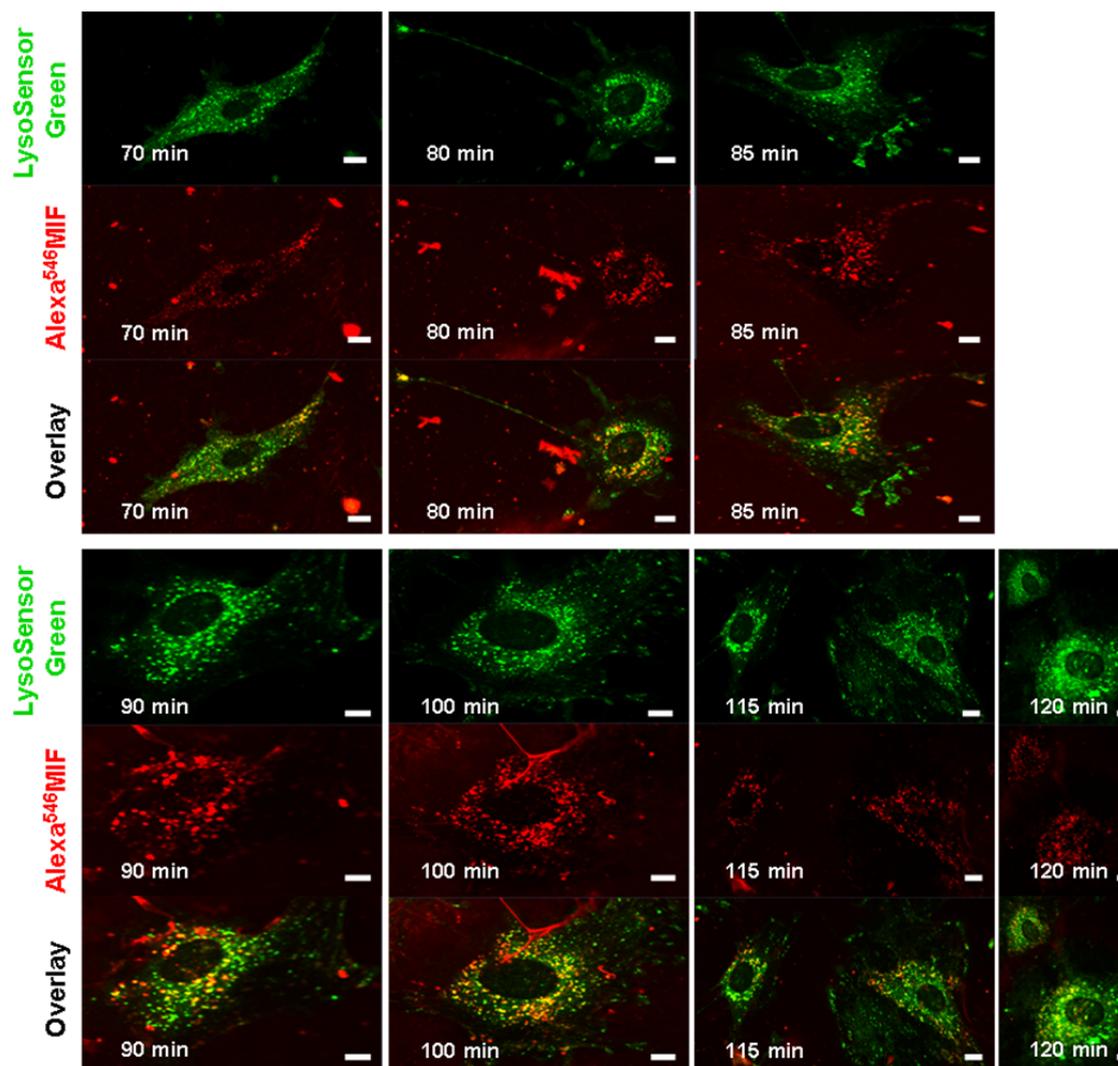
Ein direkter Nachweis dafür, dass internalisiertes Alexa<sup>546</sup>-MIF auch zu den Lysosomen transportiert wird, wird im Folgenden beschrieben.

#### 4.2.4 Kolokalisation mit den Lysosomen

Um den Transport des internalisierten MIF über den Status der späten Endosomen hinaus weiter untersuchen zu können und die Lysosomen von MEF-Zellen anzufärben, wurden im Folgenden Kolokalisationsstudien zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und dem kommerziell erhältlichen Marker der Lysosomen LysoSensor<sup>TM</sup>Green angefertigt.

Bei den LysoSensor-Farbstoffen handelt es sich um azidotrope Reagenzien, die aufgrund ihrer Protonierung in sauren Organellen akkumulieren. Aufgrund ihrer Protonierung wird das *Quenching* des Fluoreszenzfarbstoffs verhindert und somit seine Fluoreszenzintensität gesteigert, was einen Vorteil während der Mikroskopie ausmacht.

Für die *live imaging*-Experimente zur Analyse der Kolokalisation zwischen Lysosomen und MIF wurden MEF-Zellen mit LysoSensor<sup>TM</sup>Green (1  $\mu$ M) enthaltendem Medium für 15 min bei 37°C vorbehandelt. Danach wurde das Medium gewechselt und durch frisches ohne LysoSensor-Zusatz ersetzt. Nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF (1  $\mu$ g/ml) wurden die MEF-Zellen auf Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und LysoSensor<sup>TM</sup>Green hin am konfokalen Lasermikroskop LSM710 analysiert. Abbildung 28 veranschaulicht, dass Alexa<sup>546</sup>-MIF nach einer Inkubationsdauer von 70 min bis 120 min mit dem lysosomalen Marker kolokalisiert. Dies wird deutlich durch die Gelbfärbung in den Zellen. Für frühere Zeitdauern konnte keine Kolokalisation beobachtet werden.



**Abbildung 28: MIF kolokalisiert mit den Lysosomen in MEF-Zellen.** MEF-Zellen ( $10^5$ ) wurden 24 h vor dem *live imaging*-Experiment auf runden Deckgläschen ausgesät und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Für die Konfokalmikroskopie wurden die MEF-Zellen mit Vollmedium, das mit LysoSensor<sup>TM</sup>Green DND-189 in einer Konzentration von  $1\ \mu\text{M}$  versetzt war, für 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  vorinkubiert. Das Medium wurde durch frisches Medium ohne LysoSensor-Zusatz ersetzt und eines der Deckgläschen mit den angewachsenen MEF-Zellen am Tag des Experiments in eine Apparatur eingespannt, mit Medium, das mit Alexa<sup>546</sup>-MIF einer Konzentration von  $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$  angereichert war, versorgt und auf dem Konfokalmikroskop LSM710 montiert. Die Bildaufnahmen erfolgten unmittelbar für 70 bis 120 min nach Zugabe. Gelbfärbung verdeutlicht Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und LysoSensor<sup>TM</sup>Green. *Scale bars:* 10  $\mu\text{m}$ .

Der endolysosomale Transportweg des Zytokins MIF nach seiner Endozytose wurde durch die vorausgehenden Studien aufgeklärt und kann wie folgt zusammengefasst werden: MIF wird an die Zelloberfläche, an seine Rezeptoren (siehe spätere Kapitel), gebunden und kann nach seiner Internalisierung bei vorherrschender physiologischer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  nach bestimmten Inkubationsdauern in frühen, späten und schließlich in Lysosomen detektiert werden.

### 4.3 MIF-Internalisierung ist Clathrin-abhängig

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse, die bestätigten, dass MIF internalisiert wurde, bestand die weitere Aufgabe darin, den genauen Endozytosemechanismus aufzuklären und zu

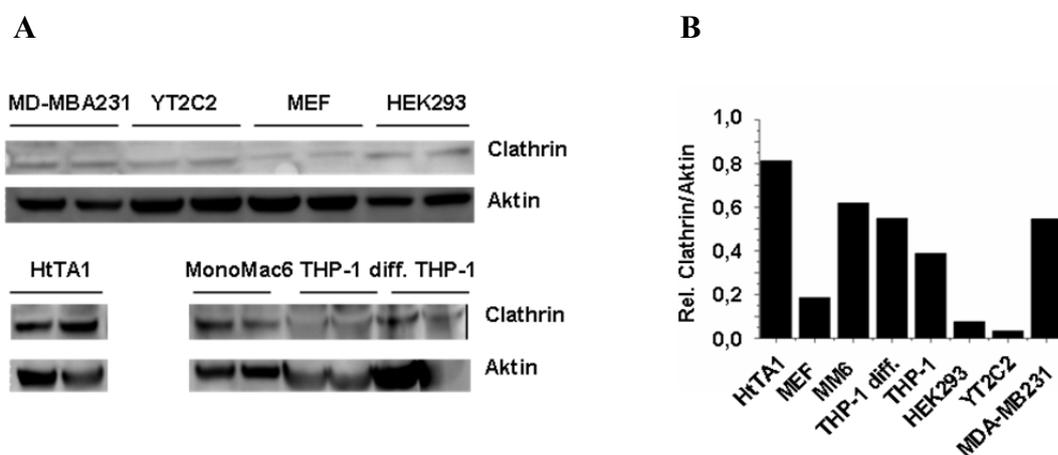
untersuchen, ob es sich bei dem Internalisierungsweg, über den MIF in Zellen gelangt, um einen Clathrin-abhängigen, Rezeptor-vermittelten, einen der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege oder evtl. sogar um eine Kombination aus beiden Endozytosewegen handelt.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden zahlreiche Studien mit für den jeweiligen Endozytoseweg spezifischen Inhibitoren durchgeführt und Strategien zur Blockierung des Clathrin-vermittelten Endozytosewegs oder der beiden Clathrin-unabhängigen Caveolin-abhängigen Wege angewandt.

Zu Beginn sollte der Clathrin-abhängige Endozytoseweg als möglicher Aufnahmeweg für das Zytokin MIF in die Zelle untersucht werden.

### 4.3.1 Clathrin-Proteinlevel bei verschiedenen Zelllinien

Hierzu wurden zunächst mittels einer Western Blot Analyse die Proteinexpressionslevel des Clathrins in den bisher für die Versuche verwendeten Zelllinien ermittelt und mit denjenigen von Monozyten/Makrophagen, der Krebszelllinie MDA-MB231 und YT2C2 verglichen (Abbildung 29). Für den zuletzt genannten Zelltyp ist bekannt, dass er für die Expression von Caveolin negativ ist. Aus Abbildung 29 wird ersichtlich, dass alle getesteten Zelllinien Clathrin in ausreichendem Maße exprimieren. Für alle weiteren Experimente zur Analyse des Clathrin-vermittelten Endozytosewegs als möglichen Aufnahmeweg für MIF wurden MEFs, HEK293- und HtTA1-Zellen auserwählt, weil sie außer ihrer Fähigkeit Clathrin zu exprimieren, sich als adhärente Zellen gut zur Mikroskopie eignen.

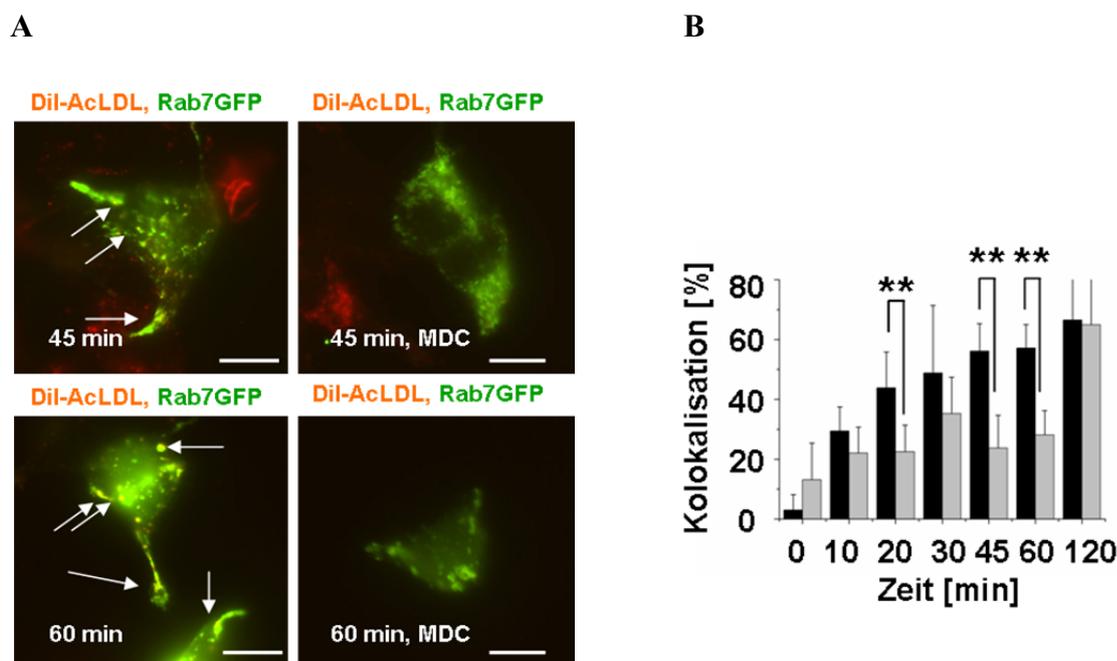


**Abbildung 29: Die Clathrin-Proteinlevel verschiedener Zelllinien unterscheiden sich.** Die Clathrin-Proteinlevel verschiedener Zelllinien wurden durch Western-Blot Analyse unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen die leichte Kette von Clathrin aus Maus [CON.1] ermittelt. Aktin diente hierbei als Ladekontrolle. (A) Western-Blot. (B) Balkendiagramm zu A.

Ob die MIF-Endozytose einem Clathrin-abhängigen endozytotischen Transportweg folgt, sollte zunächst durch Zugabe des pharmakologischen Inhibitors Monodansylcadaverin (MDC) untersucht werden. MDC kann das membrangebundene Enzym Transglutaminase Typ I spezifisch inhibieren, indem es mit den Substraten des Enzyms um das aktive Zentrum konkurriert und dadurch Protein-Protein-*crosslinking*-Reaktionen beeinträchtigt und letztlich somit die Bildung der Clathrin-ummantelten Vesikel inhibiert.

### 4.3.2 Wirksamkeit des Clathrininhibitors MDC bei der Endozytose von LDL

Um die Effizienz des Inhibitors MDC einschätzen zu können und ein Gefühl dafür zu bekommen, wie stark der inhibitorische Effekt auf den Endozytosevorgang sein kann, wurden als erstes Internalisierungsassays durchgeführt, bei denen transient mit pEGFP-C1-Rab7 transfizierte HEK293-Zellen anstatt mit Alexa<sup>546</sup>-MIF mit DiI-acetyliertem LDL inkubiert wurden. LDL wurde an dieser Stelle als „Test-Protein“ verwendet, da es bekanntermaßen über den Clathrin-abhängigen Endozytoseweg in Zellen aufgenommen wird. Anhand Abbildung 30, in der die quantitative visuelle Auswertung der Kolo-kalisation zwischen DiI-AcLDL und Rab7GFP ohne und nach Zugabe von MDC vergleichend dargestellt ist, konnte eine signifikante Inhibierung der LDL-Endozytose durch die Wirkung von MDC für die angezeigten Zeitdauern erzielt werden (bis zu 55% Inhibition mit MDC). Die Inkubation mit DiI-AcLDL erfolgte in der Art, dass das LDL nach seiner Zugabe bei RT dauerhaft für die im Graphen genannten Zeitdauern bei 37°C auf den Zellen verblieb. Als positive Zellen gingen all diejenigen HEK293-Zellen in die Analyse ein, die mindestens eine Kolo-kalisation zwischen dem roten DiI-AcLDL und den grün-gefärbten späten Endosomen zeigten.



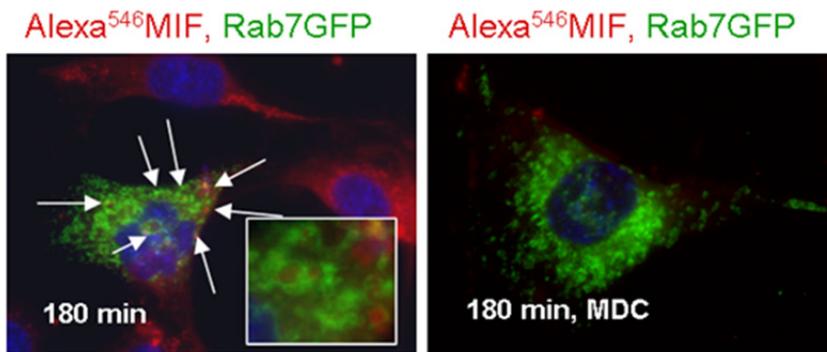
**Abbildung 30: Die Endozytose von LDL ist in HEK293-Zellen Clathrin-abhängig.** (A) HEK293-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit MDC (50 µM) vorbehandelt oder blieben unbehandelt. Die anschließende Inkubation mit DiI-AcLDL (200 µg/ml) wurde für verschiedene Zeitdauern zwischen 0 und 2 h bei 37°C durchgeführt. Die Waschschritte und die Methode der Fixierung der Zellen, sowie das Montieren auf Objektträgern waren identisch mit denjenigen für die bisherigen Experimente. *Scale bars*: 10 µm. (B) Balkendiagramm zu A. Die Quantifizierung aller Fluoreszenzaufnahmen zeigt signifikante Unterschiede zwischen der Kolo-kalisationsrate in Prozent von mit MDC vorbehandelten HEK293-Zellen und den unbehandelten Kontrollzellen für verschiedene Zeitpunkte. Die Ergebnisse resultieren aus den Mittelwerten ± SD unbehandelter Kontrollzellen (n = 7) und mit MDC vorbehandelten Zellen (n = 4). \*\* P < 0,01.

Da die Versuchsbedingungen nun erprobt und die Effizienz der inhibitorischen Wirkung von MDC mit bis zu 55% Inhibition im Vergleich zu den Kontrollzellen erwiesen war, bestand die nächste Aufgabe darin, sich die MIF-Endozytose nach MDC-Zugabe anzusehen und mit derjenigen Kolokalisationsrate in unbehandelten Zellen zu vergleichen.

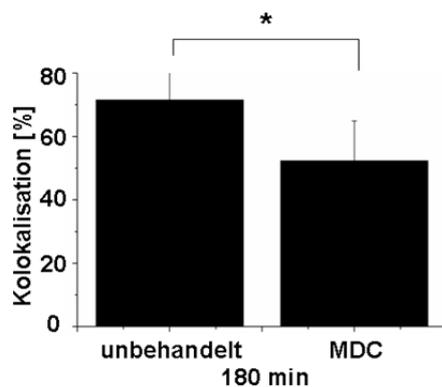
#### **4.3.3 Wirksamkeit der Clathrininhibitoren Monodansylcadaverin (MDC) und Chlorpromazine (CPZ) auf die Endozytose von MIF**

Sowohl transient mit pEGFP-C1-Rab7 transfizierte MEF-Zellen, als auch HEK293-Zellen wurden vor ihrer Inkubation mit Alexa<sup>546</sup>-MIF mit dem Inhibitor MDC vorbehandelt. Die Kolokalisationsrate zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>-MIF in Prozent wurde bei den MEF-Zellen nach einer Inkubationszeit von 180 min bei 37°C evaluiert und die quantitative Auswertung resultierte in dem in Abbildung 31B dargestellten Graphen. Repräsentative MEF-Zellen für die Kontrollzellen und für diejenigen nach MDC-Behandlung sind in Abbildung 31A veranschaulicht. Die MDC-Behandlung hatte eine merkliche Reduktion in der Anzahl an Zellen mit Kolokalisation zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>-MIF zur Folge, was auf eine Blockierung der MIF-Endozytose zurückzuführen ist. Bei Vergleich der typischen unbehandelten Kontrollzelle, in der MIF vielerorts zusammen mit für Rab7-positiven Endosomen lokalisiert ist (grün-fluoreszierender Ring mit rot-fluoreszierender Füllung), mit der typischen MDC-behandelten Zelle, die keine bis wenig Kolokalisation aufweist, wird die Effizienz der Blockade durch MDC erneut deutlich (Abbildung 31A). Die visuelle quantitative Analyse von mehreren hundert Zellen ergab einen inhibitorischen Effekt von ungefähr 30% (Abbildung 31B) im Vergleich zur mit MDC erzielten Inhibition von bis zu 55% bei der LDL-Endozytose. Auch bei den HEK293-Zellen wurde durch die MDC-Behandlung eine markante Reduktion von maximal bis zu 70% der MIF-Endozytoserate nach 60 bis 120 min Internalisierungsdauer festgestellt (Abbildung 32).

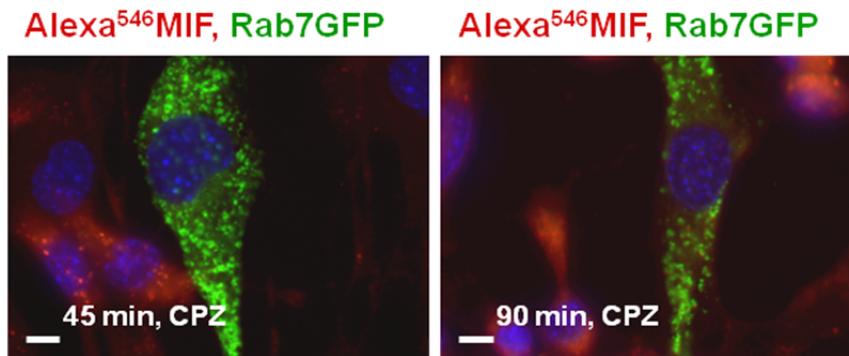
A



B



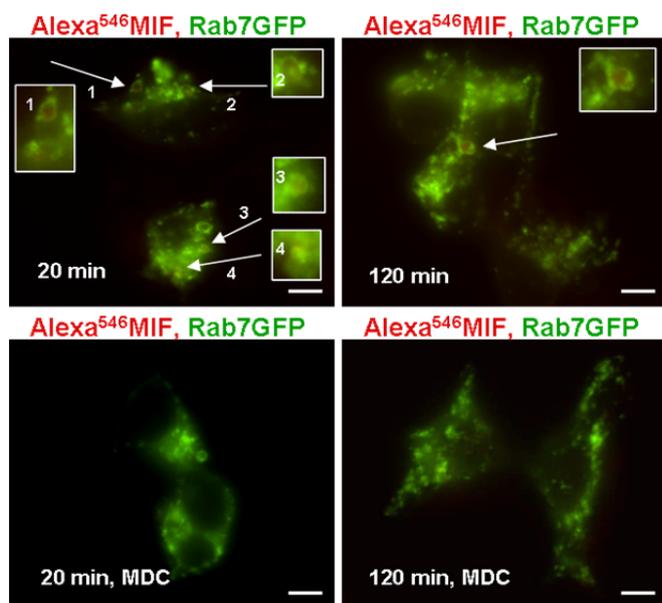
C



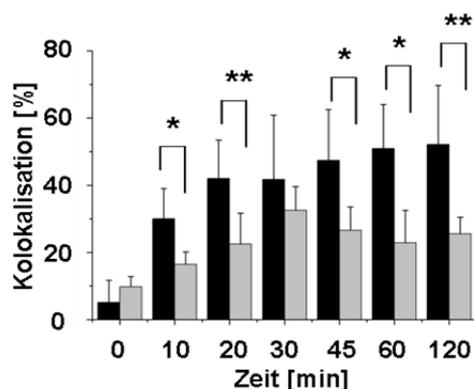
**Abbildung 31: Die Endozytose des Zytokins MIF ist in MEF-Zellen Clathrin-abhängig.** (A) MEF-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit MDC (50  $\mu$ M) oder CPZ (50  $\mu$ M) vorbehandelt oder unbehandelt belassen und 30 min bei 37°C inkubiert vor Zugabe von Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) für 45 min, 90 min oder 3 h und erneuter Inkubation bei 37°C. Anschließend wurden sie einmal mit eiskaltem Glycinpuffer (pH 2,8), zweimal mit eiskaltem PBS (pH 7,2) gewaschen und durch Zugabe von 3,6% Paraformaldehyd fixiert und auf Objektträgern zur späteren mikroskopischen Analyse montiert. Die Bilder zeigen repräsentative Zellen für die verschiedenen Versuchsansätze: unbehandelt (A, links) verglichen zu Zellen, die mit MDC vorbehandelt waren (A, rechts) bzw. solchen, die mit CPZ vorbehandelt waren (C). Die mikroskopische Analyse wurde mittels eines IX50 Fluoreszenzmikroskops der Firma Olympus durchgeführt. Weiße Pfeile verdeutlichen die Kokolkalisation zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>MIF. Scale bars: 10  $\mu$ m. (B) Das Balkendiagramm resultiert aus der Quantifizierung aller Bilder aus A. Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte  $\pm$  SD von unbehandelten Zellen (n = 6) und mit MDC vorbehandelten Zellen (n = 6). \* P<0,05. (C) Bilder repräsentativer Zellen nach Vorbehandlung mit CPZ. Die mikroskopische Analyse wurde mittels eines IX50 Fluoreszenzmikroskops der Firma Olympus durchgeführt. Scale bars: 10  $\mu$ m.

Insgesamt deuten die Studien zur Blockierung der MIF-Endozytose durch MDC darauf hin, dass MIF wie auch LDL Clathrin-abhängig endozytiert wird. Ähnliche Ergebnisse nach Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Chlorpromazin (CPZ), der direkt mit der Bildung der Clathrinummantelung der Vesikel interferiert, untermauern die These der Clathrin-abhängigen Internalisierung von MIF. Repräsentative MEF-Zellen nach Vorbehandlung mit CPZ zeigt Abbildung 31C.

A



B



**Abbildung 32: Die Endozytose des Zytokins MIF ist auch in HEK293-Zellen Clathrin-abhängig.** (A) HEK293-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit MDC (50  $\mu$ M) vorbehandelt oder blieben unbehandelt. Die anschließende Inkubation mit Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) wurde für verschiedene Zeitdauern zwischen 0 und 2 h bei 37°C durchgeführt. Die Waschschritte und die Methode der Fixierung der Zellen, sowie das Montieren auf Objektträgern waren identisch mit denjenigen für MEF-Zellen (siehe Abbildung 31). (B) Balkendiagramm zu A. Die Quantifizierung aller Fluoreszenzaufnahmen zeigt signifikante Unterschiede zwischen der Kokalisationsrate in Prozent von mit MDC vorbehandelten HEK293-Zellen und den unbehandelten Kontrollzellen für verschiedene Zeitpunkte. Die Ergebnisse resultieren aus den Mittelwerten  $\pm$  SD unbehandelter Kontrollzellen (n = 10) und mit MDC vorbehandelten Zellen (n = 3). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

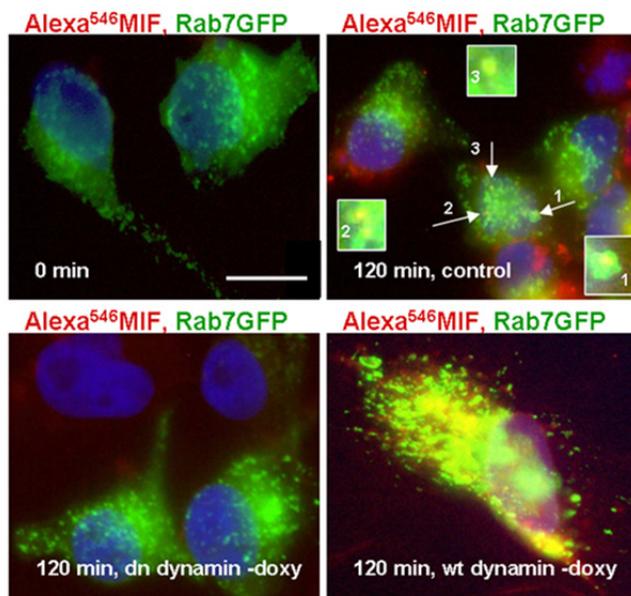
#### **4.4 Bedeutung der Funktionalität der GTPase Dynamin für die MIF-Endozytose**

Clathrin-beschichtete Vesikel bedürfen für ihre Abschnürung von der Plasmamembran einer funktionsfähigen GTPase Dynamin<sup>320-322</sup>. Aus diesem Grunde bestand das besondere Interesse der nachfolgenden Studien darin, die Bedeutung der Funktionsfähigkeit der GTPase Dynamin für den Vorgang der MIF-Endozytose zu untersuchen.

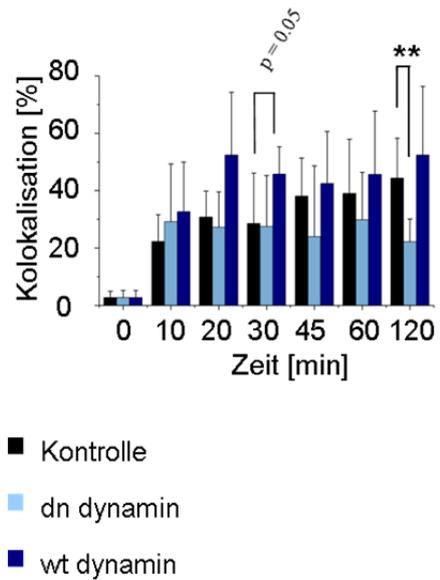
##### **4.4.1 Wirkung eines ektopisch überexprimierten dominant-negativen Dynamins**

Hierzu wurden zunächst Experimente in mit einem Tet-off System modifizierten HeLa-Zellen (HtTA1) durchgeführt, wobei in Abhängigkeit vom transfizierten Dynamin-Plasmid die Expression eines dominant-negativen (dn) oder eines Wildtyp (wt)-Dynaminkonstrukts durch An- bzw. Abwesenheit eines Tetrazyklins reguliert werden konnte. Die Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Rab7 wurde über eine Zeitkinetik in solchen Zellen, die dn-Dynamin ektopisch überexprimierten und denjenigen HtTA1-Zellen, die wt-Dynamin ektopisch überexprimierten, analysiert und mit der Kolokalisationsrate in Kontrollzellen verglichen. 120 min nach MIF-Zugabe war die MIF/Rab7-Kolokalisation in Zellen, die zusätzliches wt-Dynamin exprimierten, entscheidend erhöht gegenüber denjenigen Zellen, die nur endogenes Dynamin exprimierten. Eine Dynamin-Inaktivierung durch die Expression eines dn-Dynamin-Konstruktes hingegen hatte eine Abnahme der Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Rab7 zur Folge (Abbildung 33A). Die Quantifizierung aller Fluoreszenzaufnahmen bestätigte eine signifikante Reduktion der MIF/Rab7-Kolokalisation durch die dn-Dynamin-Expression nach 120 min, wohingegen ein Anstieg der Kolokalisationsrate in Folge zusätzlichen wt-Dynamins am offensichtlichsten nach 30 min war. Dieser Anstieg war jedoch formal nicht signifikant (Abbildung 30B,  $p < 0,01$  bzw.  $p = 0,05$ ).

A



B

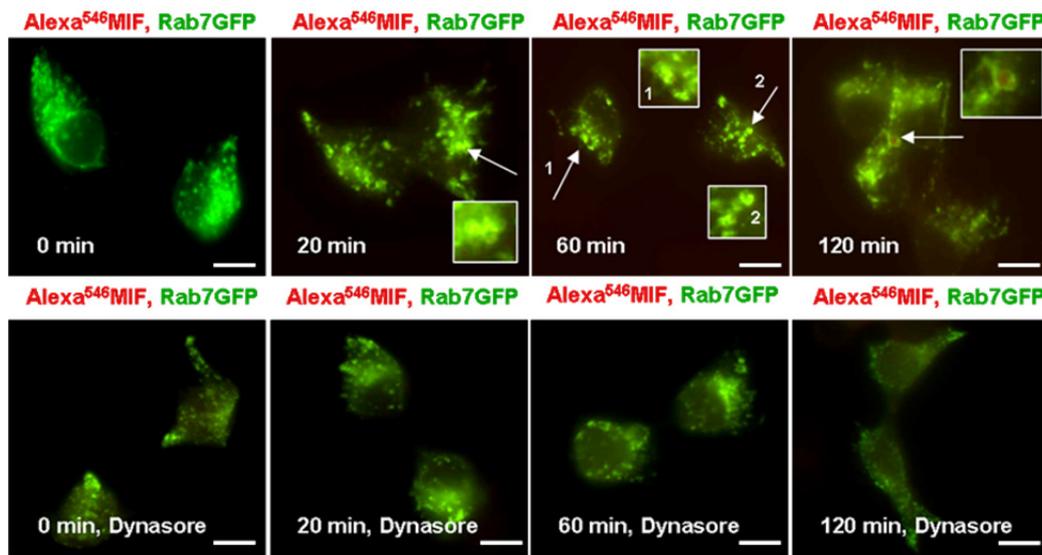


**Abbildung 33: Eine funktionsfähige GTPase Dynamin ist für die MIF-Endozytose unerlässlich und die Endozytose kann durch ektopische Überexpression von dominant-negativem Dynamin inhibiert werden.** (A) HtTA1-Zellen wurden mit den folgenden Plasmiden transfiziert: pBABEpuro, pEGFP-C1-Rab7 und entweder pUHG16wt-dynamin, oder pUHG16K44A-dynamin. Nach Inkubation für 24 h bei 37°C erfolgte eine Selektion der transfizierten Zellen durch Zugabe von Puromycin (5 µg/ml) bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen, die die Selektion überlebt hatten, auf Deckgläschen ausgesät und die Expression entweder von Wildtyp-Dynamin, oder K44A- (dominant-negativem) Dynamin angeschaltet oder durch Zugabe von Doxzyzyklin (1 µg/ml) abgeschaltet (Kontrolle). Nach 2-tägiger Inkubation bei 37°C wurden die HtTA1-Zellen für verschiedene Zeitdauern mit Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) behandelt, einmal mit eiskaltem Glycinpuffer (pH 2,8) und zweimal mit eiskaltem PBS (pH 7,2) gewaschen, dann mit 3,6% Paraformaldehyd fixiert und auf Objektträgern zur mikroskopischen Analyse montiert. Das Bild oben links zeigt repräsentative HtTA1-Zellen zum Zeitpunkt 0. Die übrigen 3 Bilder zeigen repräsentative Kontrollzellen (oben, rechts), solche Zellen, die dominant-negatives (dn) Dynamin exprimieren (unten, links) und solche Zellen, die zusätzliches Wildtyp-Dynamin exprimieren (unten, rechts). Alle Bildaufnahmen wurden von Zellen gemacht, die 2 h mit Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) inkubiert waren. Gelbfärbung und Pfeile verdeutlichen die Kolokalisation zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>MIF. Scale bar für alle Bilder: 10 µm. (B) Balkendiagramm zu A. Die Ergebnisse resultieren aus den Mittelwerten ± SD von Kontrollzellen (schwarze Balken, n = 4), Zellen, die dn-Dynamin exprimieren (hellblaue Balken, n = 4) und Zellen, die zusätzliches Wildtyp-Dynamin exprimieren (blaue Balken, n = 4). \*\* P < 0,01.

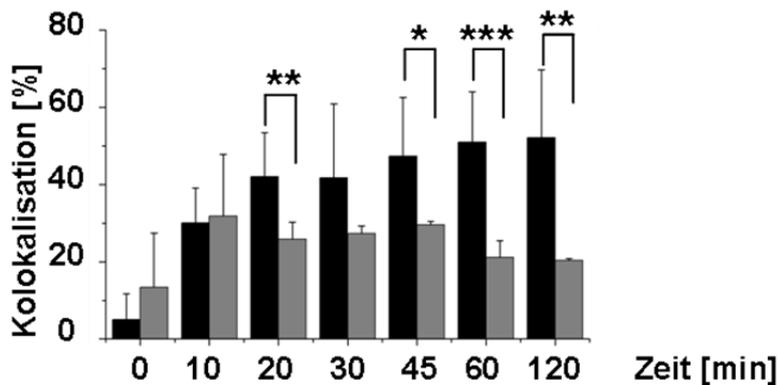
#### 4.4.2 Einfluss des Dynamininhibitors Dynasore auf die Endozytose von LDL und MIF

Um die Bedeutsamkeit der GTPase Dynamin für die Internalisierung von MIF im Folgenden weiter zu bestätigen, wurde die Funktion des Dynamins durch Zugabe des zellpermeablen Inhibitors Dynasore in HEK293-Zellen beeinträchtigt und die Endozytose von MIF analysiert. Tatsächlich bewirkte die Zugabe von Dynasore eine markante und signifikante Inhibierung der MIF/Rab7-Kolokalisation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen für 20, 45, 60 und 120 min nach MIF-Zugabe. Das Ausmaß der Dynasore-vermittelten Beeinträchtigung der MIF-Internalisierung bezifferte sich auf 36-62% Inhibition (Abbildung 34A, B).

A



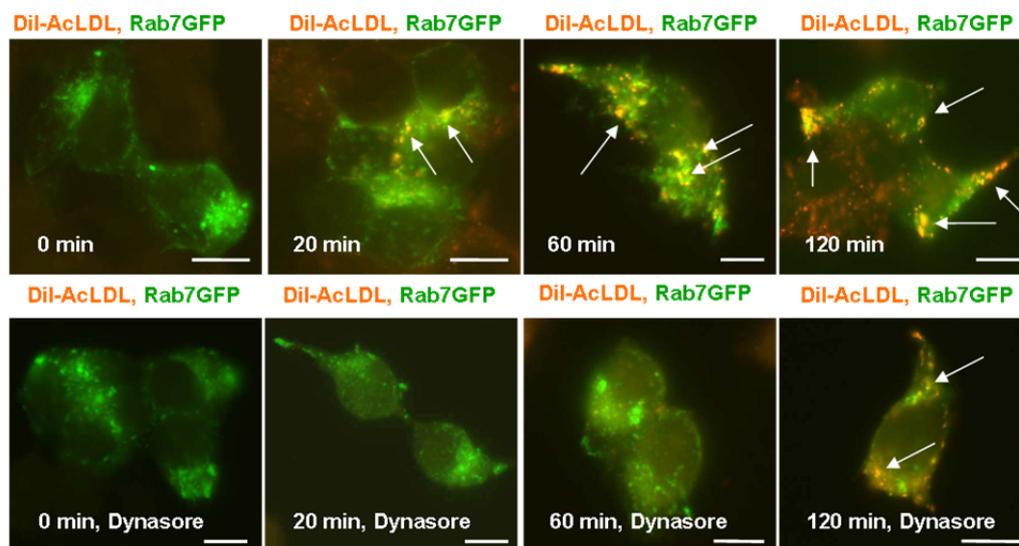
B



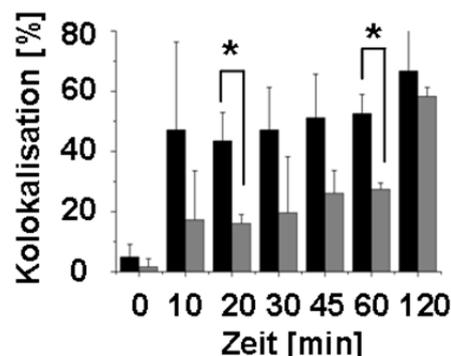
**Abbildung 34: Eine funktionsfähige GTPase Dynamin ist für die MIF-Endozytose unerlässlich und die Endozytose kann durch Zugabe des Dynamininhibitors Dynasore beeinträchtigt werden.** HEK293-Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert, mit Dynasore (80  $\mu$ M) vorbehandelt oder blieben unbehandelt und wurden dann für 0 bis 2 h mit Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) (A) inkubiert. Die anschließenden Waschschritte und die Methode der Fixierung der Zellen wurden bereits in vorherigen Abbildungen beschrieben. Die Bilder sind repräsentativ für unbehandelte HEK293-Zellen (obere Bildserie) verglichen mit denjenigen, die mit Dynasore vorbehandelt waren (untere Bildserie) für Zeitdauern von 0, 20, 60 und 120 min der Inkubation mit Alexa<sup>546</sup>MIF. Gelbfärbung oder grüne Ringe (Rab7GFP) mit roter Füllung (Alexa<sup>546</sup>MIF), angezeigt durch weiße Pfeile, verdeutlichen die Kolokalisation zwischen späten Endosomen und Alexa<sup>546</sup>MIF. Scale bars: 10  $\mu$ m. (B) Balkendiagramm zu A. Die Ergebnisse resultieren aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten und sind Mittelwerte  $\pm$  SD von unbehandelten Zellen (schwarze Balken, n = 7) und Zellen, die mit Dynasore vorbehandelt waren (graue Balken, n = 3). \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.

Zur Kontrolle wurden zusätzlich adäquate Experimente zur Blockierung der LDL-Endozytose durch Dynasore durchgeführt, da die Internalisierung von LDL in jeden Fall abhängig ist von der GTPase Dynamin.

A



B



**Abbildung 35: Eine funktionsfähige GTPase Dynamin ist auch für die LDL-Endozytose unerlässlich und die Endozytose kann durch Zugabe des Dynamininhibitors Dynasore beeinträchtigt werden.** HEK293-Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert, mit Dynasore (80  $\mu$ M) vorbehandelt oder blieben unbehandelt und wurden dann für 0 bis 2 h mit DiI-AcLDL (200  $\mu$ g/ml) (A) inkubiert. Die anschließenden Waschschritte und die Methode der Fixierung der Zellen wurden bereits in vorherigen Abbildungen beschrieben. Die Bilder sind repräsentativ für unbehandelte HEK293-Zellen (obere Bildserie) verglichen mit denjenigen, die mit Dynasore vorbehandelt waren (untere Bildserie) für Zeitdauern von 0, 20, 60 und 120 min der Inkubation mit Alexa<sup>546</sup>MIF. Orange- bis Gelbfärbung, angezeigt durch weiße Pfeile, verdeutlichen die Kokolkalisation zwischen späten Endosomen und DiI-AcLDL. Scale bars: 10  $\mu$ m. (B) Die Ergebnisse resultieren aus drei bis zehn unabhängigen Experimenten und sind Mittelwerte  $\pm$  SD von unbehandelten Zellen (schwarze Balken, n = 10) und Zellen, die mit Dynasore vorbehandelt waren (graue Balken, n = 3). \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001.

Nach Zugabe des Dynamininhibitors wurde auch für die LDL/Rab7-Kokolkalisation ein deutlicher Rückgang gegenüber den Kontrollzellen festgestellt (Abbildung 35A). Die quantitative Analyse ergab eine markante Reduktion der Kokolkalisationsrate nach Dynasore-Behandlung, die für die beiden Zeitdauern von 20 und 60 min nach LDL-Zugabe auch signifikant waren (Abbildung 35B). Insgesamt gesehen konnte Dynasore die MIF- und LDL-Endozytose in ungefähr gleichem Ausmaße inhibieren. Aufgründdessen und wegen der inhibitorischen Wirkung auf die MIF-Internalisierung nach Expression des dominant-negativen Dynamins bestanden genügend Evidenzen dafür, dass die Endozytose des Zytokins MIF von funktionalem Dynamin abhängig war. Des Weiteren wird hierdurch auch der

Clathrin-abhängige Endozytoseweg als Aufnahmeweg für MIF bestätigt, denn Dynamin ist entscheidend in den Clathrin-vermittelten Endozytoseweg involviert.

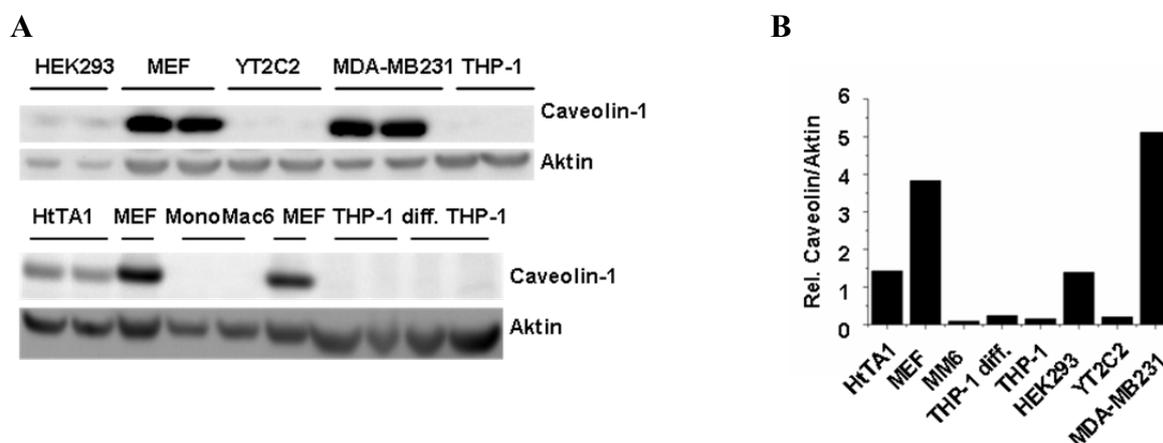
#### 4.5 Rolle der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege über Caveolae und lipid rafts/microdomains für die MIF-Endozytose

Eine funktionierende GTPase Dynamin ist nicht ausschließlich für den Clathrin-abhängigen Endozytoseweg notwendig, um die gebildeten Vesikel von der Plasmamembran abzuschneiden und ihren Inhalt in den Endozytoseweg einzuschleusen, sondern wurde außerdem auch als notwendige GTPase für die Vesikelabschnürung in den beiden Clathrin-unabhängigen Caveolin-abhängigen schon häufig nachgewiesen<sup>40,59,60</sup>. Der Endozytosemechanismus der Makropinozytose hingegen scheint der einzige der Endozytosewege zu sein, der Dynamin-unabhängig verläuft.

Um eine Beteiligung dieser Clathrin-unabhängigen Endozytosewege an der Aufnahme von MIF nun ausschließen zu können, wurden im Folgenden Internalisierungsstudien mit den für diese Wege spezifischen Inhibitoren Nystatin und Filipin durchgeführt und die MIF-Endozytose unter diesen Bedingungen analysiert. Bei Nystatin handelt es sich um ein Polyen-Makrolakton aus *Streptomyces noursei*, das häufig als Antimykotikum zur Behandlung von Pilzinfektionen eingesetzt wird. Aufgrund seiner Eigenschaft, sich an Ergosterol in der Zellmembran anzulagern und somit die Integrität der Zellmembran zu beeinträchtigen, kann es auch als Inhibitor der Endozytose über Caveolae und *lipid rafts/microdomains* eingesetzt werden<sup>310</sup>. Das zu den Polyenmakrolid Antibiotika gehörende Filipin bindet spezifisch an Cholesterol und wird daher häufig als Färbung für Cholesterol in der Immunhistochemie verwendet. In der Zellbiologie ist es als Inhibitor des Endozytosewegs über Caveolae und *lipid rafts/microdomains* durchaus gebräuchlich<sup>310,323,324</sup>.

##### 4.5.1 Caveolin-1-Proteinlevel bei verschiedenen Zelllinien

Analog zur Bestimmung des Clathrinproteingehalts in verschiedenen Zelllinien (Abbildung 29) wurde in diesen Zellen der Caveolin-1-Proteinlevel mittels Western-Blot Analyse ermittelt (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Die Caveolin-1-Proteinlevel verschiedener Zelllinien unterscheiden sich.** Die Caveolin-1-Proteinlevel verschiedener Zelllinien wurden durch Western-Blot Analyse unter Verwendung eines polyklonalen

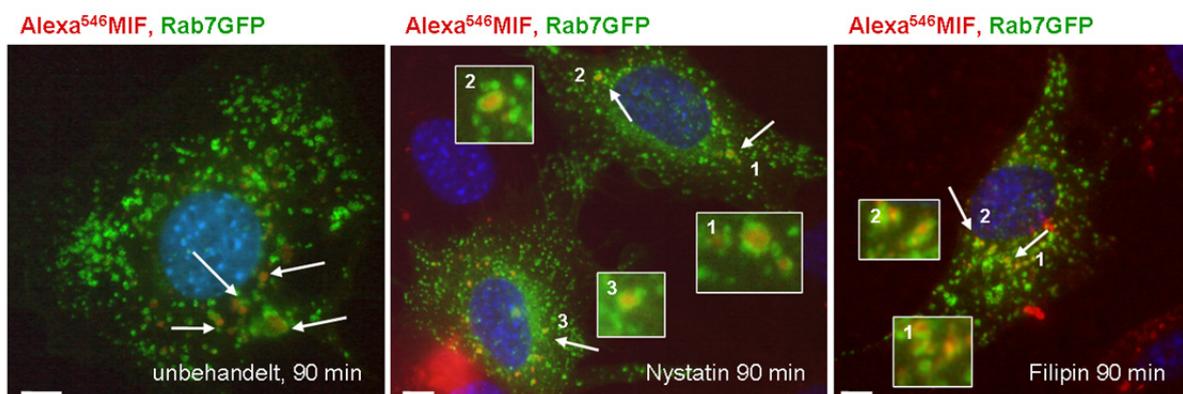
Antikörpers gegen Caveolin-1 (N-20) ermittelt. Aktin diente hierbei als Ladekontrolle. **(A)** Western-Blot. **(B)** Balkendiagramm zu A.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass außer den als Caveolin-1-negativ beschriebenen YT2C2-Zellen auch die Monozyten/Makrophagen kein Caveolin-1 exprimieren. Im Vergleich mit den expressionsstarken MEF-Zellen ist der Proteingehalt an Caveolin-1 in HtTA1- und HEK293-Zellen eher niedrig. Aus diesem Grunde wurden MEF-Zellen für die Studien zur Analyse der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege ausgewählt.

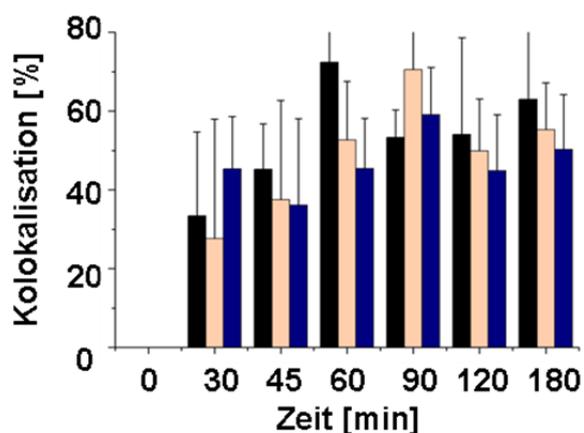
#### 4.5.2 Einfluss der Inhibitoren Nystatin und Filipin auf die MIF-Endozytose

In Übereinstimmung mit den Immunfluoreszenz-basierten Studien bei Verwendung der Clathrininhibitoren MDC und CPZ wurden die Experimente mit Nystatin bzw. Filipin als Inhibitoren in MEF-Zellen durchgeführt. Sowohl anhand der Fluoreszenzaufnahmen von für die jeweilige Bedingung repräsentativer Zellen (Abbildung 37A), als auch aus der quantitativen Analyse der MIF/Rab7-Kolokalisation bei mit Nystatin bzw. Filipin vorbehandelten MEF-Zellen und Kontrollzellen wird offensichtlich, dass beide Inhibitoren keinen signifikanten Einfluss auf die MIF-Endozytose haben (Abbildung 37B). Folglich wird MIF nicht über einen der beiden Endozytosewege über Caveolae oder *lipid rafts* in Zellen aufgenommen.

**A**



**B**



**Abbildung 37: MIF wird nicht über Clathrin-unabhängige Endozytosewege endozytiert.** **(A)** MEF-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid

transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Nystatin (50 µg/ml) oder Filipin (5 µg/ml) vorbehandelt oder blieben unbehandelt und wurden für die Dauer von 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) und Inkubation der Zellen für 0 bis 3 h bei 37°C. Danach wurden die Zellen mit eiskaltem Glycinpuffer (pH 2,8) und eiskaltem PBS (pH 7,2) gewaschen, mit 3,6% Paraformaldehyd fixiert und auf Objektträgern montiert. Für die mikroskopische Analyse wurde ein IX50 Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus verwendet. **(B)** Balkendiagramm zu A. Die schwarzen Balken repräsentieren die unbehandelten Kontrollzellen, die hellrosa Balken die mit Nystatin vorbehandelten Zellen und die blauen Balken die mit Filipin vorbehandelten Zellen. Das Balkendiagramm zeigt das Ergebnis der Quantifizierung aller Fluoreszenzaufnahmen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede nach Behandlung mit einem der Inhibitoren verglichen zu den unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte ± SD von unbehandelten Zellen (n = 4) und mit Nystatin oder Filipin vorbehandelten Zellen (n = 4).

#### 4.6 Abhängigkeit der MIF-Endozytose von Mikrotubuli und der Azidität der Endosomen

Die Idee, dass Mikrotubuli als Schienensystem für den Transport von Vesikeln dienen, ist weit verbreitet. Motorproteine liefern die für den Transport notwendige Energie. Auch für den Prozess der Endozytose konnte von Kharchenko *et al.* eine Beteiligung der Mikrotubuli festgestellt werden<sup>325</sup>. Im Jahre 1991 fanden Sakai *et al.* heraus, dass durch das Tubulusgift Nocodazol nicht die Endosomenbildung, sondern die Verteilung der Endosomen in der Weise beeinträchtigt wurde, dass sich die Endosomen von Zellen nach Behandlung mit Nocodazol nur noch am Rand der Zellen ansiedelten, während sie bei unbehandelten Zellen auch um den Golgi-Apparat vorzufinden waren<sup>326</sup>. Aufgrunddessen konnte auf einen Mikrotubuli-abhängigen Vesikeltransport während des Endozytoseprozesses geschlossen werden. Auch der Clathrin-vermittelte Endozytoseweg beinhaltet einen Mikrotubuli-abhängigen Transport endosomaler Vesikel. Zusätzlich ist ein Reifungsprozess von frühen zu späten Endosomen, der mit einem Vorgang der Ansäuerung der Kompartimente einhergeht, in die Clathrin-abhängige Endozytose involviert.

Durch Verwendung der beiden spezifischen Inhibitoren Bafilomycin und Nocodazol wurde in Internalisierungsexperimenten die Bedeutung der Ansäuerung der Endosomen und der Mikrotubulifunktionalität für die Endozytose von MIF untersucht. Bei Bafilomycin A<sub>1</sub> handelt es sich um ein aus der Fermentation von *Streptomyces spp.* gewonnenes Makrolidantibiotikum, das zur Inhibierung der vakuolären Protonenpumpe (v-ATPasen)<sup>327</sup> und zur Verhinderung der Ansäuerung endosomaler Kompartimente führt. Aufgrund der mangelnden Ansäuerung wird der Abbau aufgenommener Substanzen durch endolysosomale Proteasen verhindert<sup>328</sup>. Bei dem zweiten Inhibitor, Nocodazol, handelt es sich um ein Mikrotubuligift, das die dynamische Organisation der Mikrotubuli und somit ihre Funktionalität beeinträchtigt.

##### 4.6.1 Einfluss von Nocodazol und Bafilomycin auf die MIF-Endozytose

Um den Einfluss der beiden Inhibitoren Bafilomycin und Nocodazol auf die Endozytose von MIF zu analysieren, wurde die Internalisierung von Alexa<sup>546</sup>-MIF in transient mit Rab7GFP transfizierten MEF-Zellen untersucht. Die Bildanalyse der Fluoreszenzaufnahmen verdeutlichte, dass MIF zwar mit den späten Endosomen kolokalisierte, es aber nach Zugabe beider Inhibitoren unabhängig voneinander zu einem offensichtlichen Stillstand des Transports von MIF entlang seines Endozytosewegs kam, was ein Anschwellen der MIF-

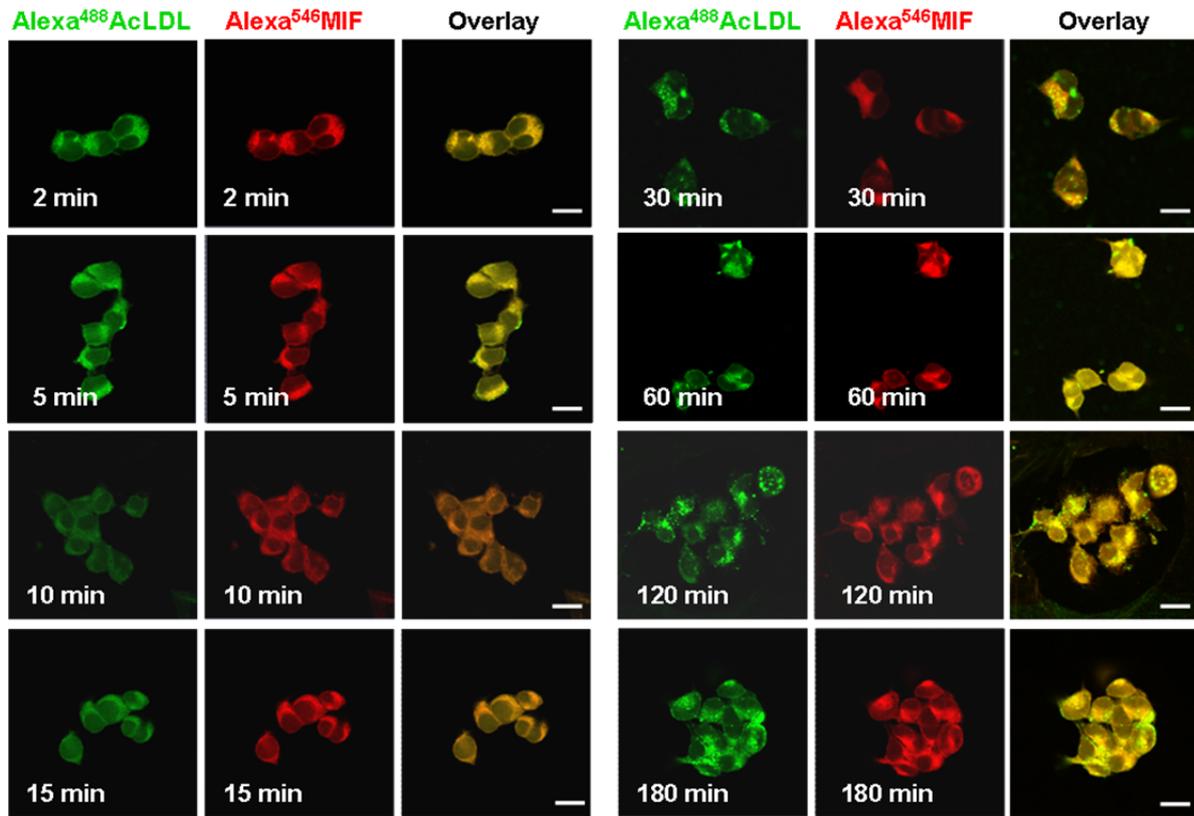


Um all diese Erkenntnisse zur Endozytose von MIF weiterhin zu bekräftigen, sollten im Folgenden Protein-Protein-Kolokalisationsstudien mit MIF und Proteinen, deren Endozytoseweg bereits aufgedeckt ist, angeschlossen werden.

#### **4.7 Kolokalisation von MIF mit acetyliertem LDL und partiell mit Transferrin, aber nicht mit Cholera toxin B**

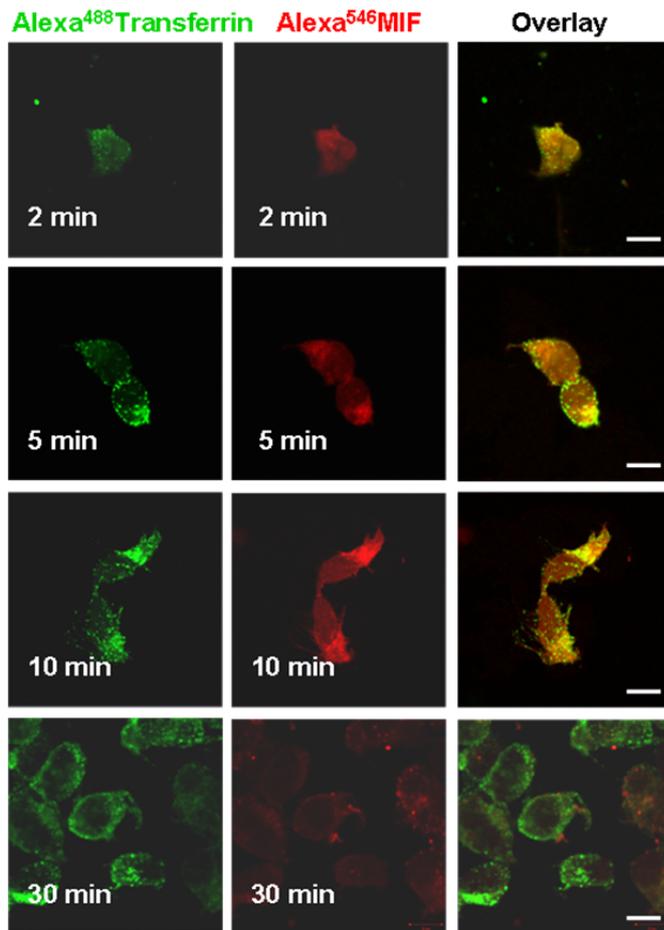
Für Proteine, die über einen Clathrin-abhängigen Endozytoseweg internalisieren, gibt es verschiedene mögliche Routen, denen sie nach ihrer Aufnahme innerhalb der Zellen folgen können. Aus diesem Grund soll der weitere Transportweg des Zytokins MIF intrazellulär durch mögliche Parallelen mit denjenigen Wegen bekannter Proteine schrittweise analysiert werden. Für *low density lipoprotein* (LDL) ist beispielsweise sicher, dass es weiter zu den Lysosomen transportiert wird, wo es degradiert wird, während Transferrin nach seiner Aufnahme in Zellen über das als *recycling endosome* bezeichnete endosomale Kompartiment zurück zur Plasmamembran gebracht wird. Als weiteres „Indikatorprotein“ wurde das bakterielle Toxin Cholera toxin B (CTB), das über einen Dynamin-abhängigen, Clathrin-unabhängigen Endozytoseweg internalisiert wird, verwendet. Zu Beginn wurde der Endozytoseweg von MIF mit demjenigen von acetyliertem LDL, dann mit demjenigen von Transferrin und schließlich mit demjenigen von CTB verglichen, indem HEK293-Zellen nach gleichzeitiger Zugabe von jeweils zwei fluoreszenzmarkierten Proteinen für unterschiedliche Zeitspannen inkubiert wurden und die Kolokalisation von MIF mit dem jeweiligen „Indikatorprotein“ analysiert wurde.

Die Auswertung der Studien mit Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL ergab, eine Kolokalisation beider Proteine bereits nach 2 min, die mit voranschreitender Zeit stärker wurde, und selbst noch nach 180 min bestand (Abbildung 39).



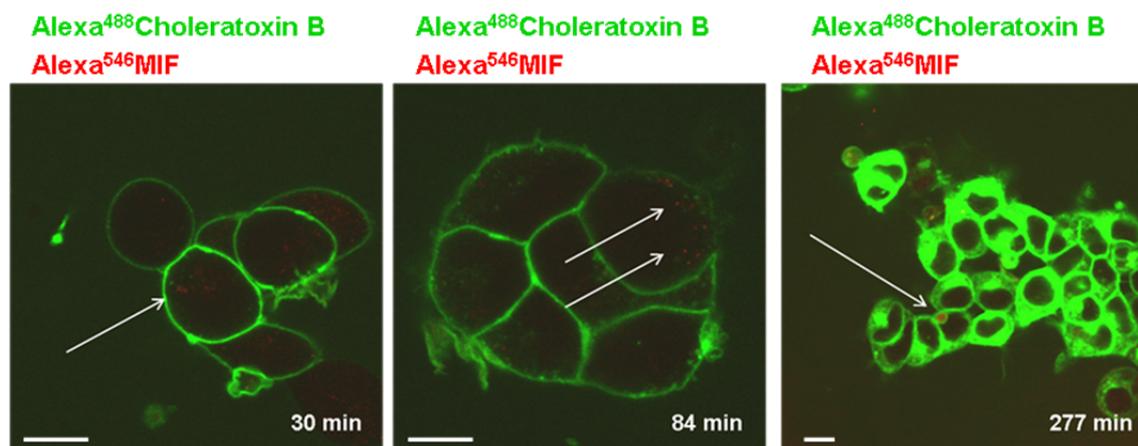
**Abbildung 39: MIF kolokalisiert mit acetyliertem LDL.** HEK293-Zellen wurden auf Deckgläschen in 3-cm-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 min bei 4°C inkubiert. Alexa<sup>546</sup>MIF (1 µg/ml) wurde gleichzeitig mit Alexa<sup>488</sup>AcLDL (5 µg/ml) zu jeder der 3-cm-Schalen gegeben. Nach der Zugabe wurden die HEK293-Zellen bei 4°C für 30 min inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch die gleiche Menge kaltes Medium ersetzt. Die Änderung der Inkubationstemperatur erfolgte unmittelbar nach Zugabe des kalten Mediums von 4°C auf 37°C, so dass die Internalisierung der fluoreszenzmarkierten Proteine für 2 bis 180 min erfolgen konnte. Nach den Waschschrinen, der Fixierung der Zellen und der Montierung auf Objektträgern wurde die mikroskopische Analyse an einem LSM710 Konfokalmikroskop durchgeführt. Die Bildaufnahmen sind repräsentativ für die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. *Scale bars*: 10 µm.

Im Gegensatz dazu, zeigte sich eine starke Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Alexa<sup>488</sup>-Transferrin für frühe Zeitdauern von 5 bis 10 min, die sich jedoch nach 30 min verlor (Abbildung 40).



**Abbildung 40: MIF kolokalisiert zeitweise auch mit Transferrin.** HEK293-Zellen wurden auf Deckgläschen in 3-cm-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 min bei 4°C inkubiert. Alexa<sup>546</sup>MIF (1 µg/ml) wurde gleichzeitig mit Alexa<sup>488</sup>Transferrin (25 µg/ml) zu jeder der 3-cm-Schalen gegeben. Nach der Zugabe wurden die HEK293-Zellen bei 4°C für 30 min inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch die gleiche Menge kaltes Medium ersetzt. Die Änderung der Inkubationstemperatur erfolgte unmittelbar nach Zugabe des kalten Mediums von 4°C auf 37°C, so dass die Internalisierung der fluoreszenzmarkierten Proteine für 2 bis 30 min erfolgen konnte. Nach den Waschschritten, der Fixierung der Zellen und der Montierung auf Objektträgern wurde die mikroskopische Analyse an einem LSM710 Konfokalmikroskop durchgeführt. Die Bildaufnahmen sind repräsentativ für die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. *Scale bars*: 10 µm.

Alexa<sup>546</sup>-MIF kolokalisierte hingegen zu keiner Zeit mit Alexa<sup>488</sup>-Choleratoxin B (Abbildung 41). Als Schlussfolgerung aus den Protein-Protein-Kolokalisationsdaten kann gezogen werden, dass MIF nach seiner Internalisierung einen frühen endosomalen Weg einschlägt, den er sich mit demjenigen von Proteinen wie Transferrin und acetyliertem LDL teilt, dann jedoch in den späten endosomalen/lysosomalen Transportweg transferiert wird, der nur noch mit dem Transportweg des LDL übereinstimmt, nicht jedoch mit demjenigen des Transferrins, das zurück zur Plasmamembran geleitet wird. Die Tatsache, dass MIF zu keiner Zeit seines Internalisierungswegs mit Choleratoxin B kolokalisiert, unterstreicht erneut, dass die MIF-Endozytose einem Clathrin-abhängigen und nicht einem der Clathrin-unabhängigen, Caveolin-abhängigen Endozytosewege folgt.

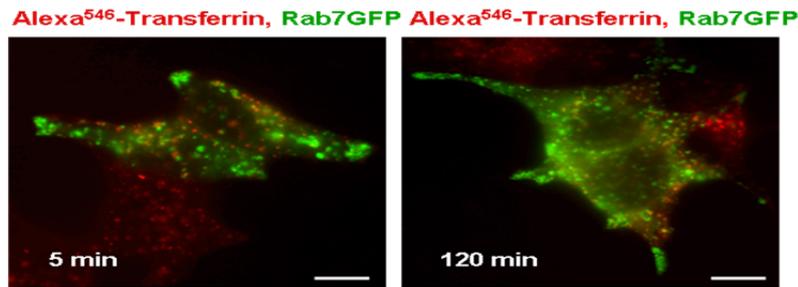


**Abbildung 41: MIF kolokalisiert nicht mit Cholera-Toxin B.** Kolokalisationsstudien zwischen Alexa<sup>546</sup>MIF und Alexa<sup>488</sup>Cholera-Toxin B wurden in *live imaging* Experimenten mit HEK293-Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen 2 d vor dem Experiment auf mit Poly-L-lysin beschichteten Deckgläsern ausgesät. Für das *live imaging* Experiment wurde jeweils ein mit HEK293-Zellen bewachsenes Deckgläschen in die Apparatur einer beheizten Kammer (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) auf einem LSM510 Konfokalmikroskop befestigt. Die Bildaufnahmen wurden direkt nach gleichzeitiger Zugabe von Alexa<sup>546</sup>MIF (1 µg/ml) und Alexa<sup>488</sup>Cholera-Toxin B (10 µg/ml) zum Medium der Zellen gestartet. Die Bildaufnahmen sind repräsentativ für die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. *Scale bars*: 10 µm.

Zur internen Kontrolle der Protein-Protein-Kolokalisationsstudien sollte der Endozytosetransportweg des „Indikatorproteins“ Transferrin stichpunktartig überprüft werden. Laut Literatur wird Transferrin nach seiner Internalisierung zu den frühen Endosomen transportiert und von dort aus über die *recycling endosomes* zurück zur Plasmamembran gebracht. Demzufolge sollte es zu keiner Zeit mit den späten Endosomen, die Teil des lysosomalen Degradationswegs sind, kolokalisieren. Um genau diesen Umstand abzuklären, wurden im Folgenden Kolokalisationsstudien zwischen Alexa<sup>546</sup>-Transferrin und Rab7GFP als Marker der späten Endosomen durchgeführt.

#### 4.8 Alexa<sup>546</sup>-Transferrin wird nicht zu den späten Endosomen transportiert

Die Kolokalisationsstudien mit Alexa<sup>546</sup>-Transferrin und dem späten endosomalen Marker Rab7 in HEK293-Zellen bestätigten, dass Transferrin die späten Endosomen 5 min und 120 min nach seiner Endozytose nicht passierte (Abbildung 42). Demzufolge ist sichergestellt, dass Transferrin tatsächlich nicht in die späten Endosomen gelangt. Ein Aufeinandertreffen von MIF mit Transferrin (Kolokalisation) kann daher zeitlich nur bis zum Transport von MIF in die späten Endosomen stattfinden. Da die Häufigkeit der Kolokalisation zwischen MIF und LDL zu den späteren Zeitdauern hin zunimmt (Abbildung 39), ist hier wahrscheinlich, dass diese in den späten Endosomen und Lysosomen stattfindet.



**Abbildung 42: Transferrin kolokalisiert nicht mit den späten Endosomen.** HEK293-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker der späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die verschiedenen oben angegebenen Zeitdauern mit Alexa<sup>546</sup>-Transferrin (50 µg/ml) inkubiert, einmal mit eiskaltem Glycinpuffer pH 2,8, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 3,6% Paraformaldehyd fixiert, bevor sie auf Objektträgern montiert wurden. Die obigen Fluoreszenzbilder zeigen repräsentative Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten (n = 2). *Scale bars:* 10 µm.

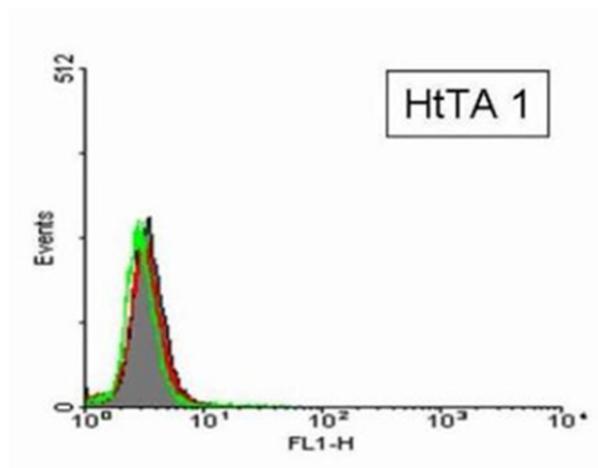
## 4.9 Rezeptorvermittelte MIF-Endozytose unter Beteiligung der Rezeptoren CD74 und CXCR4

Nachdem bislang gezeigt werden konnte, dass MIF über einen Clathrin- und Dynamin-abhängigen Endozytosemechanismus, dessen Effizienz zusätzlich von der Funktionalität des Mikrotubuli-Systems und der vakuolären Protonenpumpe abhängt, internalisiert wird, bestand die nächste Herausforderung darin, eine mögliche Beteiligung seiner drei Zelloberflächenrezeptoren CD74, CXCR4 und CXCR2 am Endozytose-mechanismus von MIF zu untersuchen. Für CD74 ist bekannt, dass es schnellen Zyklen von Internalisierung und Recycling zur Plasmamembran unterliegt. Aufgrund der daraus resultierenden hohen Umsatzrate und geringen Anzahl von CD74-Molekülen an der Zelloberfläche zu einem bestimmten Zeitpunkt schien CD74 ein idealer Kandidat für die Förderung der MIF-Endozytose zu sein.

Zur Erforschung der Beteiligung von CD74 an der Endozytose von MIF musste zunächst ein geeignetes Zellsystem gefunden werden. Am besten geeignet wäre eine adhärente Zelllinie, die kein endogenes CD74 exprimiert. Aufgrund der bisherigen Experimente kamen MEF-Zellen, HEK293- oder HtTA1-Zellen generell in Frage. Da für MEF-Zellen jedoch eine Expression von CD74 beschrieben wurde<sup>239</sup>, beschränkte sich die Auswahl auf HEK293- und HtTA1-Zellen, die anhand der Methode der Durchflusszytometrie auf CD74-Oberflächenexpression untersucht werden sollten.

### 4.9.1 HtTA1- und HEK293-Zellen sind CD74-negativ

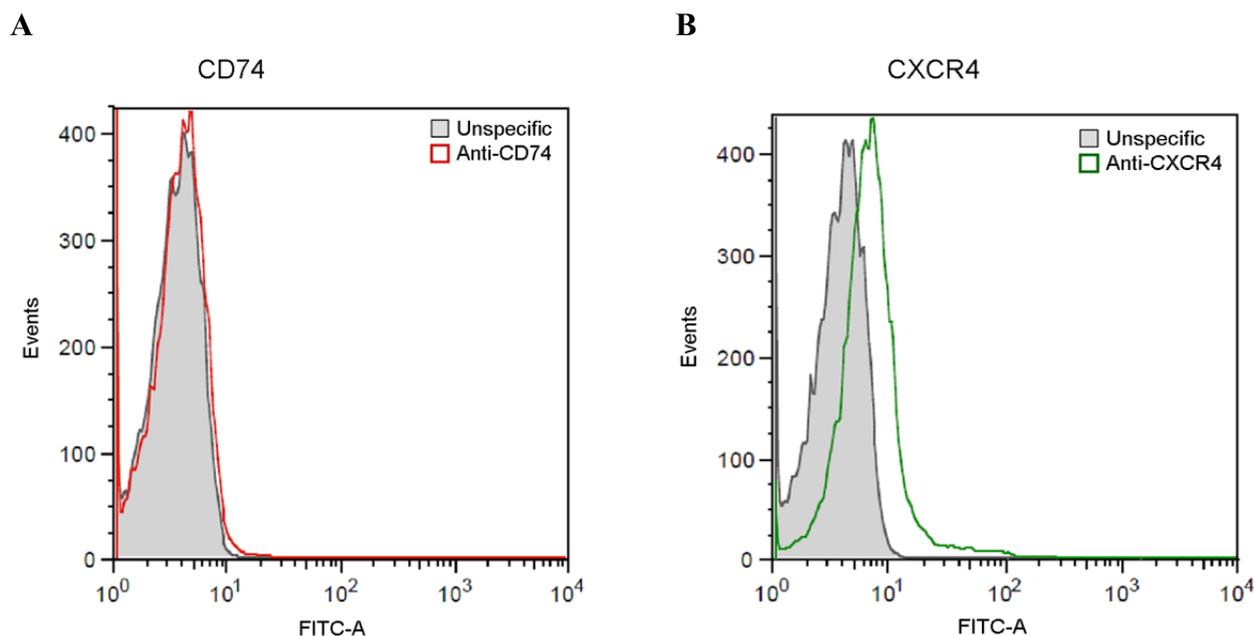
Per FACS wurde im Folgenden die Zelloberfläche von sowohl HEK293-, als auch HtTA1-Zellen auf das Vorhandensein von CD74-Molekülen hin untersucht. Beide Zelllinien waren hierfür negativ (Abbildung 43, Abbildung 44A).



**Abbildung 43: HtTA1-Zellen exprimieren kein CD74.** Für die FACS-Analyse wurden drei Reaktionsgefäße á 200.000 Zellen vorbereitet. Es wurde in der Probenvorbereitung zwischen den Ansätzen wie folgt unterschieden: a) unbehandelt, b) nur mit Sekundärantikörper gefärbt und c) mit anti-CD74-FITC behandelte Zellen. Nach Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Antikörpern im Dunkeln folgten mehrere Waschschriffe, an die sich evtl. eine Fixierung der Zellen vor ihrer Messung am FACS Calibur™ Flow Cytometer anschloss. Obige graphische Darstellung zeigt die Menge an Zellen (x-Achse) gegen die von ihnen ausgehende Fluoreszenzintensität (y-Achse) aufgetragen. Die Höhe des Peaks verdeutlicht die Anzahl an Zellen. Je weiter dieser auf der x-Achse nach rechts verschoben ist, desto mehr Fluoreszenz enthalten die Zellen. Grau: Zellpopulation, Isotypenkontrolle, rot: nur mit Sekundärantikörper behandelte Zellen, grün: mit anti-CD74-FITC behandelte Zellen.

Als Positivkontrolle zur Überprüfung der Methode an sich wurden MonoMac6-Zellen zur gleichen Zeit gefacst. Deren CD74-Oberflächenexpression konnte erwartungsgemäß detektiert werden, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Methode funktionierte (Daten nicht gezeigt). HEK293-Zellen wurden für spätere Studien zusätzlich auf ihre CXCR4-Expression hin untersucht. Diese konnte im Vergleich zur Isotypenkontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 44B).

Aufgrund der Ergebnisse der FACS-Analysen kann geschlussfolgert werden, dass beide Zelllinien, HtTA1- und HEK293-Zellen, kein CD74 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Studien der Einfluss einer ektoptischen Überexpression von CD74 in beiden CD74-negativen Zelllinien analysiert und mit der Endozytoserate in unbehandelten Kontrollzellen verglichen.

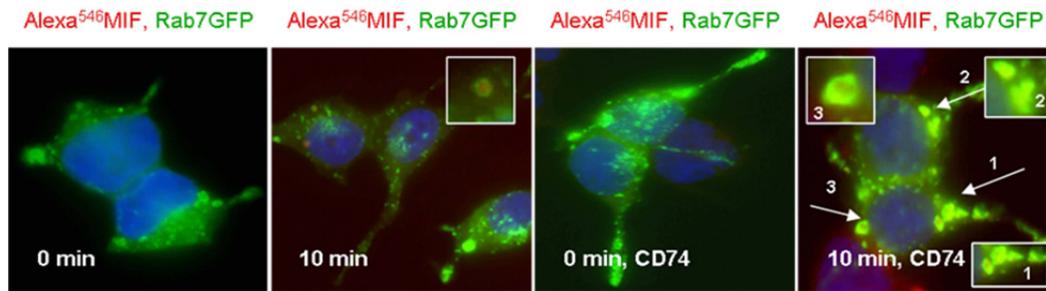


**Abbildung 44: Die Rezeptorfusionsproteine der MIF-Rezeptoren CD74 und CXCR4 werden auf der Zelloberfläche von HEK293-Zellen exprimiert.** Die Fusionsproteine HA-CXCR4 und V5-CD74 wurden ektopisch in HEK293-Zellen überexprimiert. **(A)** Histogramm der Durchflusszytometrie von HEK293-Zellen, die V5-getaggttes CD74 überexprimieren. Der Vergleich der Fluoreszenzintensität zwischen mit einem anti-CD74-Antikörper gefärbten Zellen (rot) und denjenigen, die mit einem FITC-IgG-Antikörper gefärbt wurden (grau), wird im Histogramm verdeutlicht. **(B)** Histogramm der Durchflusszytometrie von HEK293-Zellen, die HA-getaggttes CXCR4 überexprimieren. Die Fluoreszenzintensität von mit einem anti-CXCR4-Antikörper gefärbten Zellen (grün) wird mit derjenigen von Zellen, die mit einem FITC-IgG-Antikörper gefärbt wurden (grau), verglichen.

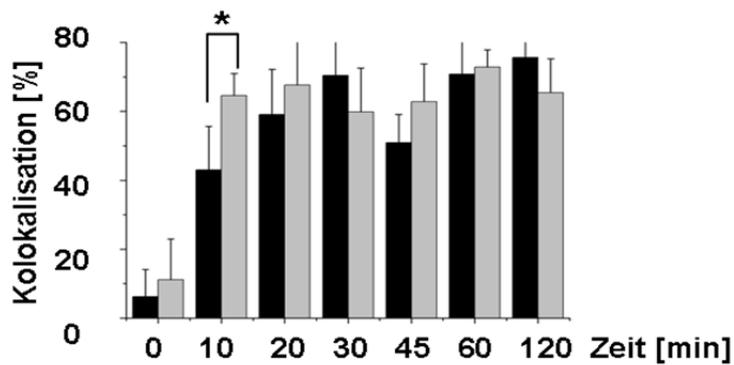
#### 4.9.2 Einfluss einer ektopischen Überexpression in den CD74-negativen Zelllinien HEK293 und HtTA1

CD74 wurde ektopisch in HEK293-Zellen überexprimiert und die Internalisierung von Alexa<sup>546</sup>-MIF in diesen Zellen mit derjenigen in Kontrollzellen, die kein CD74 exprimieren, verglichen. Die ektopische Überexpression führte zu einer Zunahme der Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-MIF und Rab7GFP von ungefähr 32 %, die zu späteren Zeitpunkten hin sich allerdings der Kolokalisationsrate der Kontrollzellen angleich. Dies verdeutlicht, dass die Endozytose von MIF bei Expression von CD74 innerhalb der ersten Minuten ( $\leq 10$  min) beschleunigt wird (Abbildung 45A, B). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde der Versuch in den ebenfalls endogen CD74-negativen HtTA1-Zellen wiederholt. Diese zeigten eine drastische Steigerung der Alexa<sup>546</sup>-MIF/Rab7GFP-Kolokalisation ( $> 3$ -fach) gegenüber den untransfizierten Kontrollzellen nach nur 10 min in den CD74-exprimierenden HtTA1-Zellen. In Übereinstimmung mit den HEK293-Zellen ebte dieser starke Anstieg der Kolokalisation jedoch für Zeitdauern über 10 min ab und näherte sich derjenigen Kolokalisationsrate bei den Kontrollzellen an (Abbildung 45C, D).

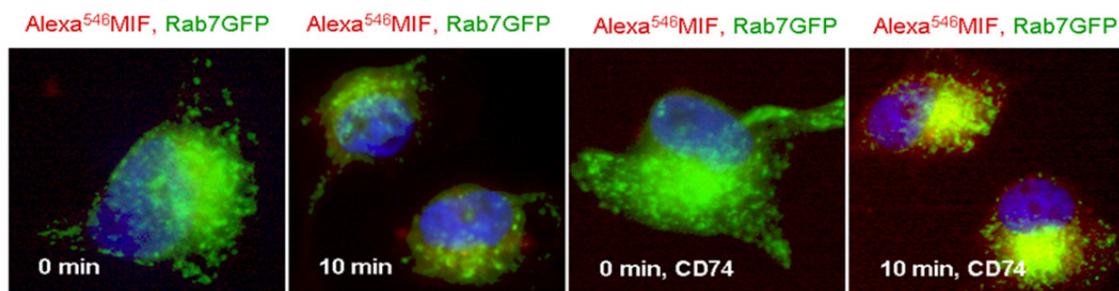
A



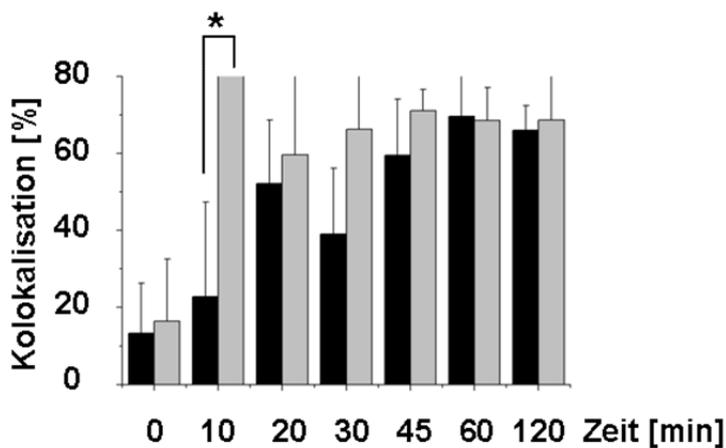
B



C



D



**Abbildung 45: Die Endozytose von MIF wird nach ectopischer Überexpression des Rezeptors CD74 in HEK293- und HfTA1-Zellen beschleunigt.** (A) HEK293-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion mit den Plasmiden pcDNA3.1/V5-His-TOPO-CD74, pBABEpuro und pEGFP-C1-Rab7 oder mit pBABEpuro und pEGFP-C1-Rab7 (Kontrolle) auf 10-cm-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden durch Zugabe von Puromycin (5  $\mu$ g/ml) für 24 h bei 37°C selektiert. Die Zellen wurden abgelöst und auf Deckgläschen in 6-well-Platten ausgesät, bevor sie mit Alexa<sup>546</sup>MIF (200 ng/ml) für

verschiedene Zeitdauern inkubiert wurden. Nach der Inkubation erfolgten mehrere Waschschriffe, die Fixierung der Zellen und die Montage auf Objektträgern zur späteren mikroskopischen Analyse. Die Bilder zeigen repräsentative Zellen aus vier unabhängigen Experimenten; Kontrollzellen (links) verglichen mit HEK293-Zellen, die CD74 ektopisch überexprimierten (rechts). Kolokalisationen zwischen Alexa<sup>546</sup>MIF und Rab7GFP sind verdeutlicht durch die Pfeile. Die Zellkerne wurden unter Verwendung von Hoechst33342 angefärbt. *Scale bars*: 10 µm. **(B)** Balkendiagramm zu A. Schwarze Balken repräsentieren Kontrollzellen, graue Balken HEK293-Zellen, die CD74 ektopisch überexprimieren. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± SD aus vier unabhängigen Versuchen. \* P<0,05. **(C)** Gleiches Experiment wie in A beschrieben mit HtTA1-Zellen. Die Bildaufnahmen zeigen repräsentative Zellen aus drei unabhängigen Versuchen; Kontrollzellen (links) verglichen mit HtTA1-Zellen, die CD74 ektopisch überexprimieren (rechts). Gelbfärbung verdeutlicht Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>MIF und Rab7GFP. Zellkerne wurden mit Hoechst33342 angefärbt. **(D)** Balkendiagramm zu C. Schwarze Balken repräsentieren Kontrollzellen, graue Balken HtTA1-Zellen, die CD74 ektopisch überexprimieren. Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen. \* P < 0,05.

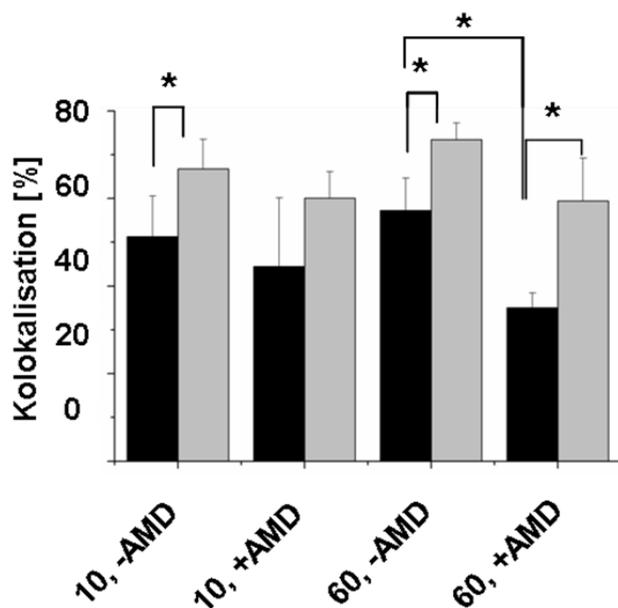
Aus beiden Experimenten schlussfolgernd wird deutlich, dass CD74 besonders die frühen Prozesse während der MIF-Endozytose in beschleunigender Weise fördert. Es muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass der Endozytosemechanismus von MIF auch abläuft, wenn Zellen kein CD74 exprimieren, da auch in „normalen“ untransfizierten HEK293- und HtTA1-Zellen gewisse Mengen an Alexa<sup>546</sup>-MIF mit den späten Endosomen kolokalisieren (siehe Kontrollzellen, Abbildung 45).

Dies lässt vermuten, dass CXCR4, das ubiquitär von fast allen Zellen einschließlich der HEK293- und HtTA1-Zellen exprimiert wird, ebenfalls in den Endozytoseprozess von MIF involviert ist. Dies wäre auch daher denkbar, da die Endozytose von MIF ein Clathrin-abhängiger Prozess ist und für CXCR4 eine Clathrin-abhängige Internalisierung bereits beschrieben wurde<sup>288,329</sup>. Als typisches Internalisierungsmotiv für Rezeptoren, deren Internalisierung über Clathrin-beschichtete Vesikel verläuft, gilt das Dileucinmotiv, das im CXCR4 auch vorzufinden ist.

Um dieser Vermutung im Folgenden nachzugehen, wurde der Einfluss von CXCR4 auf die MIF-Endozytose in HEK293-Zellen durch Blockierung des Rezeptors mit Hilfe des Inhibitors AMD3100 untersucht.

### 4.9.3 Einfluss der Inhibierung von CXCR4 durch AMD3100 auf die MIF-Endozytose

In den Studien zur Aufklärung der Rolle von endogenem CXCR4 für den Endozytosemechanismus von MIF wurde seine funktionelle Bedeutung in Abhängigkeit von CD74 in HEK293-CD74-Transfektanten nach Zugabe des CXCR4-spezifischen Bicyclamininhibitors AMD3100 analysiert. Die CXCR4-Inhibierung durch AMD3100 bewirkte eine zwar geringe, aber signifikante Reduzierung der Kolokalisationsrate um ca. 20% in den HEK293-CD74-Transfektanten. In den Kontrollzellen hingegen, die nur CXCR4 exprimieren, konnte eine Blockierung von 40% durch AMD3100 erzielt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass CXCR4 an der MIF-Endozytose beteiligt ist. Dadurch, dass diesem Effekt teilweise durch ektopische Überexpression von CD74 entgegengewirkt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass sich CD74 und CXCR4 gegenseitig in ihrer Wirkung auf die MIF-Endozytose beeinflussen (Abbildung 46). Des Weiteren entstand die Idee, dass beide Rezeptoren vielleicht ähnlich zu CXCR2 und CD74<sup>112</sup> einen heteromeren Komplex bilden könnten.



**Abbildung 46: CXCR4 ist an der MIF-Endozytose beteiligt.** HEK293-Zellen wurden auf 10-cm-Schalen ausgesät und mit den Plasmiden pCD74minRTS und pEGFP-C1-Rab7 kotransfiziert. 24 h später erfolgte ihre Ablösung von den Schalen und erneute Aussaat auf Deckgläschen in 6-well-Platten. Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen entweder mit AMD3100 (10 µg/ml) vorbehandelt, oder unbehandelt belassen und für 30 min weiter bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Alexa<sup>546</sup>MIF (1 µg/ml) zu den Zellen gegeben und für die angegebenen Zeitdauern auf den Zellen belassen. Nach den Waschschrinen, der Fixierung der Zellen und Montage auf Objektträgern wurden die Zellen auf Kolokalisationsereignisse zwischen Alexa<sup>546</sup>MIF und Rab7GFP hin durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Zur Quantifizierung aller Bilder wurden jeweils mindestens 100 Zellen pro Versuchsbedingung mit unterschiedlichen xy-Koordinaten auf rot/grün Kolokalisation (Gelbfärbung) bzw. auf grüne Ringe (Rab7GFP) mit roter Füllung (Alexa<sup>546</sup>MIF) hin, abhängig von der Fokusebene, untersucht. Zellen mit wenigstens einem Kolokalisationsereignis wurden als positiv bewertet. Schwarze Balken zeigen Kontrollzellen, graue Balken HEK293-Zellen, die CD74 ektopisch überexprimieren. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte ± SD aus vier unabhängigen Versuchen. \* P < 0,05.

#### 4.10 Heteromerisierung des GPCRs CXCR4 mit dem *single membrane-spanning protein* CD74

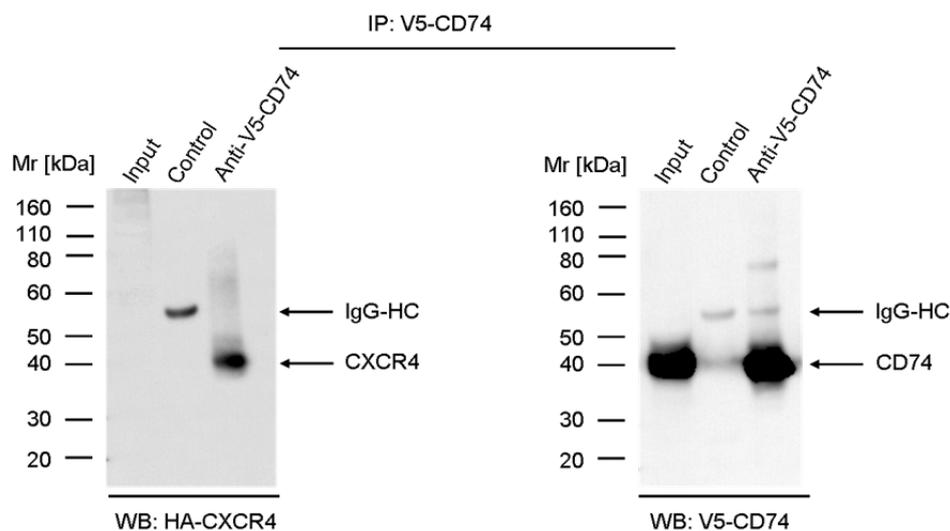
In den bisherigen Studien zeigte sich eine Beteiligung der beiden Rezeptoren CXCR4 und CD74 an der Endozytose von MIF. Da für den G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR2 bereits eine Interaktion mit der invarianten Kette des MHC II-Komplexes/CD74 nachgewiesen werden konnte, bestand das besondere Interesse darin, ob dazu auch CXCR4 befähigt war. CXCR2 und CD74 bilden einen heteromeren Rezeptorkomplex, dem Bedeutung in der Leukozytenrekrutierung zukommt. Im Folgenden sollte analysiert werden, ob CD74/CXCR4-Komplexe entscheidende Bedeutung für die Endozytose von MIF haben.

##### 4.10.1 Direkte Interaktion von CXCR4- und CD74-Rezeptorfusionsproteinen in Koimmunpräzipitationsversuchen in HEK293

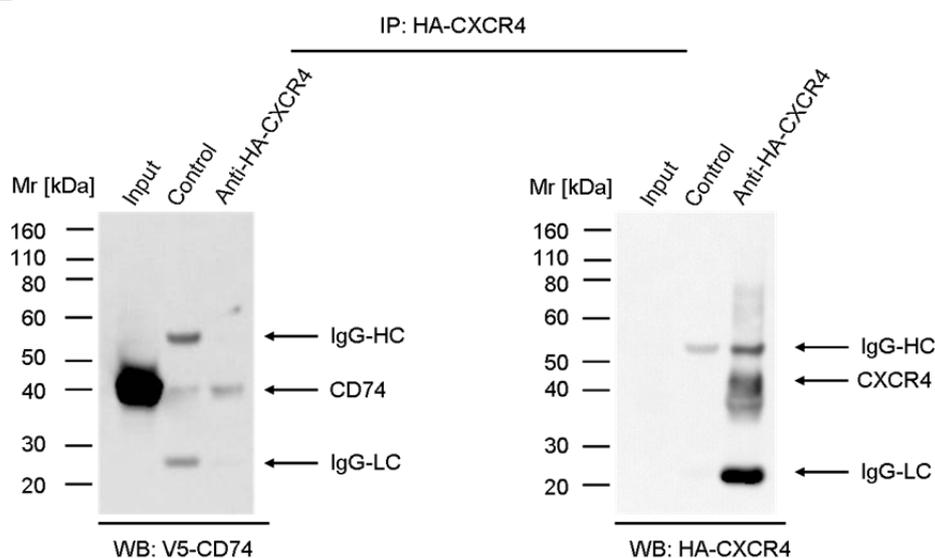
Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine mögliche Interaktion zwischen CD74 und CXCR4 in Koimmunpräzipitationsversuchen untersucht, indem zunächst folgende Fusionsproteine

beider Rezeptoren in HEK293-Zellen überexprimiert wurden: (i) V5-His-getaggte p35 Form von CD74 und (ii) HA-getaggtetes CXCR4. Zusätzlich wurde eine Variante von CD74 ohne ER-Retentionssignal (CD74minRTS) in Zellen, die kein CD74 exprimieren, als ungetaggtetes Protein verwendet (iii). Die Komplexbildung von CD74 und CXCR4 wurde analysiert, indem entweder das V5-getaggte CD74 über an *beads* gebundenen anti-V5 Antikörper aus einem HEK293-Zelllysat herausgezogen wurde und kopräzipitiertes CXCR4 mittels Western-Blot unter Verwendung eines anti-HA-Antikörpers nachgewiesen wurde (Abbildung 47A) oder im *vice versa*-Experiment nach *pulldown* von HA-CXCR4 V5-CD74 im Western Blot mittels eines anti-V5 Antikörpers detektiert wurde (Abbildung 47B). Zur Überprüfung der Effizienz des *pulldowns* erfolgte jeweils die Kontrolldetektion des Proteins an dem gezogen wurde (Abbildung 47A, B rechts). In beiden Fällen konnte nach *pulldown* des einen Proteins eine spezifische Bande für das jeweils andere Protein im Western-Blot nachgewiesen werden. Demzufolge scheint es eine Komplexbildung zwischen CD74 und CXCR4 in HEK293-Zellen nach Überexpression entsprechender Rezeptorfusionsproteine zu geben.

A



B

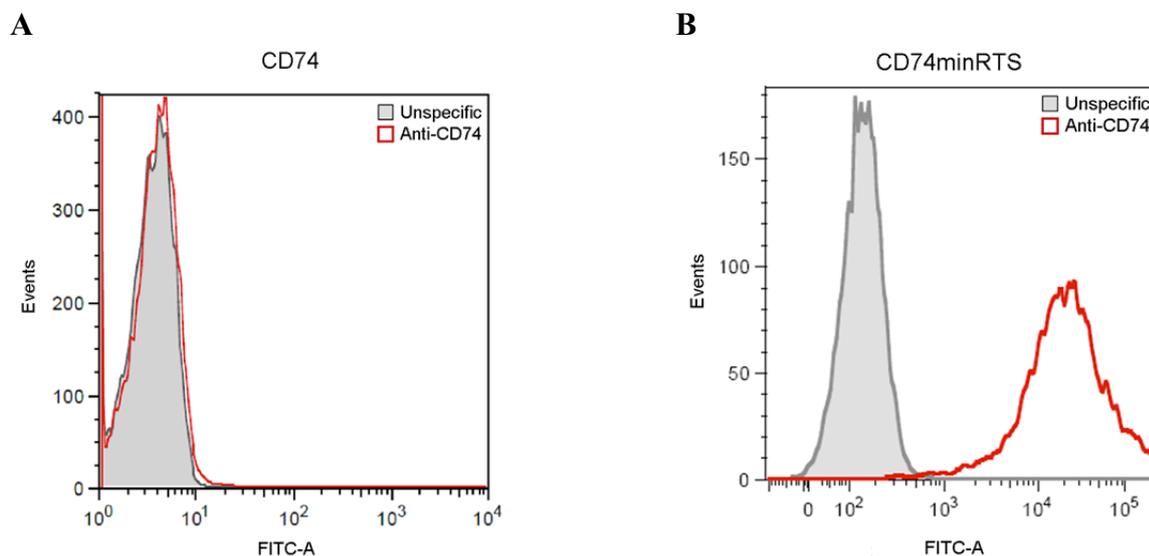


**Abbildung 47: Ektopisch überexprimiertes CXCR4 und CD74 bilden einen Proteinkomplex.** HA-getaggte CXCR4 und V5-getaggte CD74-Rezeptorfusionsproteine wurden in HEK293-Zellen ektopisch überexprimiert.

(A) V5-CD74 wurde mit einem anti-V5-Antikörper immunpräzipitiert und kopräzipitiertes CXCR4 mit einem anti-HA-Antikörper auf der Blotmembran detektiert (links). Zur Kontrolle wurde mit dem anti-V5-Antikörper präzipitiertes CD74 auf derselben Blotmembran detektiert (rechts). (B) Inverses Experiment zu A. Mit einem anti-HA-Antikörper wurde HA-CXCR4 immunpräzipitiert und kopräzipitiertes V5-CD74 mit einem anti-V5-Antikörper auf der Blotmembran detektiert (links). Zur Kontrolle wurde auch hier mit dem anti-HA-Antikörper präzipitiertes CXCR4 auf derselben Blotmembran detektiert. Für die Kontrollimmunopräzipitationen wurde ein IgG-Antikörper verwendet (Kontrolle); die Input-Spuren resultieren aus der Western Blot-Analyse von jeweils 5% des entsprechenden HEK293-Zelllysats. Der molekulare Größenstandard stammt aus denselben Gelen (Mr). IP, Immunpräzipitation; WB: Western Blot. Unspezifische Färbung der schweren (IgG-HC) und leichten Immunglobulinketten (IgG-LC) entstanden durch den sekundären Antikörper. Da der anti-HA-Antikörper ein eher schlechterer Antikörper für die Western Blot-Analyse ist, sieht man in den Inputspuren häufig nur eine schwache oder aber keine Bande für CXCR4.

#### 4.10.2 Das *single membrane-spanning protein* CD74 ohne ER-Retentionssignal (CD74minRTS) wird auf der Zelloberfläche von HEK293-Zellen exprimiert und kann mit CXCR4 interagieren

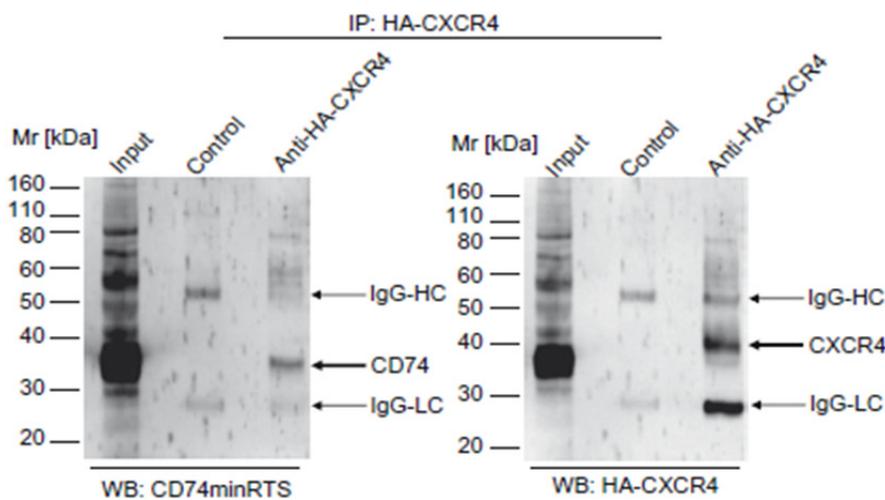
Bei Untersuchung der Zelloberflächenexpression der verwendeten Rezeptorfusionsproteine wurde gezeigt, dass *full-length* CD74-Protein aufgrund eines in seiner Sequenz kodierten ER-Retentionssignals nur zu sehr geringen Mengen auf der Zelloberfläche der MHC II-negativen HEK293-Zellen exprimiert wurde. Um die Oberflächenexpression von CD74 zu verbessern, wurde eine Variante von CD74 kloniert, bei der genau diese Sequenz fehlte. Eine FACS-Analyse dieser neu generierten CD74-Variante verdeutlichte, dass das Fehlen des ER-Retentionssignals eine deutlich verbesserte Zelloberflächenexpression im Vergleich zu derjenigen des Wildtyp-CD74-Proteins zur Folge hatte (Abbildung 48A, B).



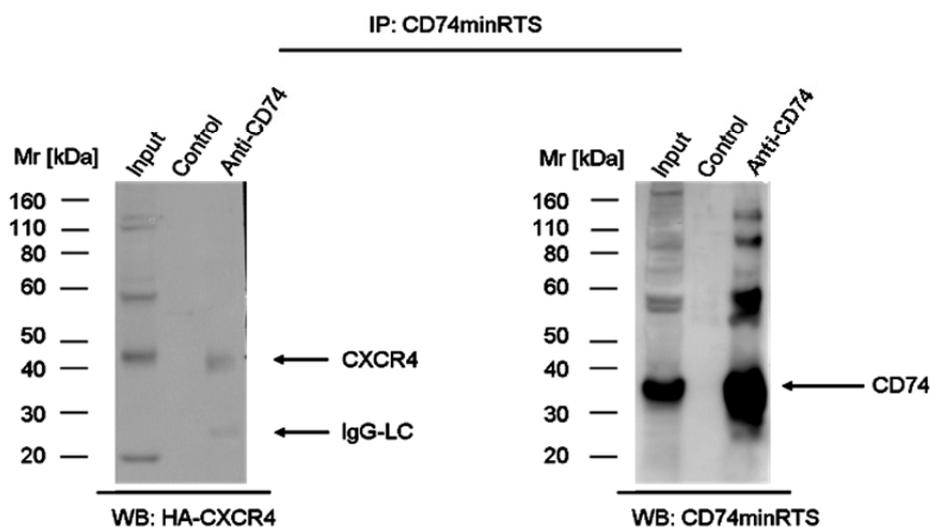
**Abbildung 48:** Die durch Entfernung des ER-Retentionssignals modifizierte Variante des MIF-Rezeptors CD74 (CD74minRTS) wird im Gegensatz zur V5-getaggten Version des vollständigen CD74-Proteins auf der Zelloberfläche von HEK293-Zellen exprimiert. Das Fusionsprotein V5-CD74 (A) oder CD74minRTS (B) wurde ektopisch in HEK293-Zellen überexprimiert. Die Abbildung zeigt das Histogramm der Durchflusszytometrie von HEK293-Zellen, die V5-getaggtes *full-length* V5-CD74 überexprimieren (A) oder CD74minRTS überexprimieren (B). Der Vergleich der Fluoreszenzintensität zwischen mit einem anti-CD74 Antikörper gefärbten Zellen (rot) und denjenigen, die mit einem FITC-IgG Antikörper gefärbt wurden (grau), wird im Histogramm verdeutlicht.

Um nun zu überprüfen, ob eine gesteigerte Oberflächenexpression von CD74 auch mit einer Verbesserung der *pulldown*-Rate von CD74/CXCR4-Komplexen einhergeht, wurden HEK293-Zellen mit dem die neue CD74-Variante exprimierenden Plasmid pCD74minRTS und dem Plasmid pcDNA3.1-CXCR4(HA)<sub>3</sub> transfiziert und die Komplexe mit Hilfe eines anti-HA Antikörpers aus dem HEK293-Zellysate präzipitiert (Abbildung 49A). Bei Detektion von CD74minRTS zeigte sich eine deutlichere Bande im Western Blot als bei der Detektion von V5-CD74 (Abbildung 47B). Zur Bestätigung der Koimmunpräzipitation wurde auch das *vice versa* Experiment, in dem CD74minRTS herausgezogen wurde und HA-CXCR4 auf der Blotmembran detektiert wurde, durchgeführt. Anhand Abbildung 49B wird veranschaulicht, dass auch die Koimmunpräzipitation erfolgreich war. Um die Effizienz des jeweiligen *pulldowns* zu überprüfen, erfolgte zusätzlich immer noch die Detektion des präzipitierten Proteins auf derselben Membran (Abbildung 49A, B rechts).

A



B



**Abbildung 49: Ektopisch überexprimiertes CXCR4 und CD74minRTS bilden einen Proteinkomplex.** HA-getaggte CXCR4 und CD74minRTS-Rezeptorfusionsproteine wurden in HEK293-Zellen ektopisch überexprimiert. (A) HA-CXCR4 wurde mit einem anti-HA Antikörper immunpräzipitiert und CD74 mit einem anti-CD74 Antikörper im Western-Blot detektiert (links). (B) CD74 wurde mit einem anti-CD74 Antikörper

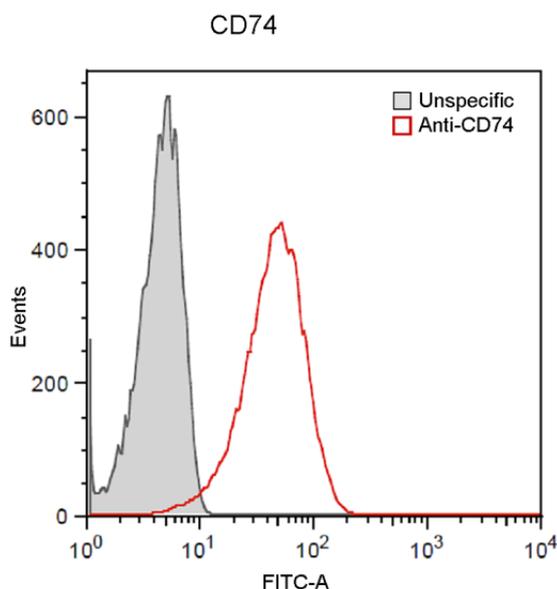
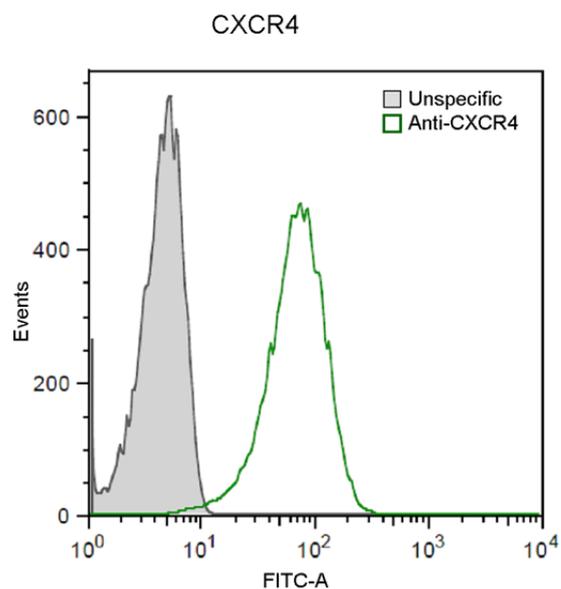
immunpräzipitiert und kopräzipitiertes CXCR4 mit einem anti-HA-Antikörper auf der Blotmembran detektiert (links). Zur Kontrolle wurde mit einem anti-CXCR4 Antikörper präzipitiertes CXCR4 (**A**) oder einem anti-CD74-Antikörper präzipitiertes CD74 (**B**) auf derselben Blotmembran detektiert (rechts). Für die Kontrollimmunopräzipitationen wurde ein IgG-Antikörper verwendet (Kontrolle); die Input-Spuren resultieren aus der Western Blot-Analyse von jeweils 5% des entsprechenden HEK293-Zelllysats. Der molekulare Größenstandard stammt aus denselben Gelen (Mr). IP, Immunpräzipitation; WB: Western Blot. Unspezifische Färbung der schweren (IgG-HC) und leichten Immunglobulinketten (IgG-LC) entstanden durch den sekundären Antikörper.

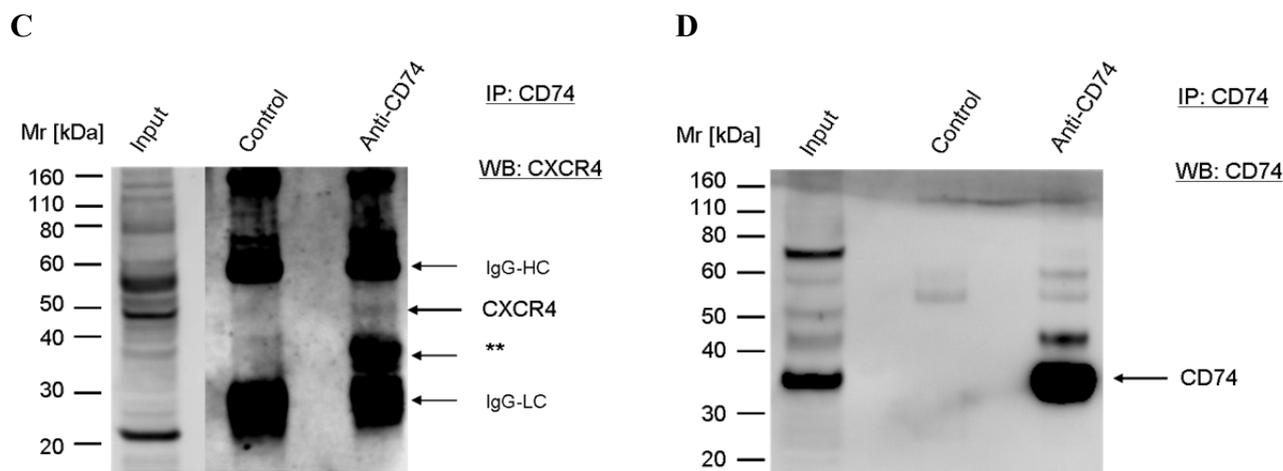
### 4.10.3 Direkte Interaktion von endogenem CXCR4 und CD74 in MonoMac6

Da die bisherigen Koimmunpräzipitationen nur Aufschluss über die Interaktion zwischen überexprimierten Rezeptorfusionsproteinen von CXCR4 und CD74 in HEK293-Zellen lieferten, aber nichts über das endogene Verhalten der beiden Proteine aussagten, sollte nun in Monozyten, die beide Proteine endogen exprimieren, der Nachweis einer Interaktion erbracht werden.

#### 4.10.3.1 MonoMac6 Zellen exprimieren CD74 und CXCR4

Vor Durchführung weiterer Koimmunpräzipitationsexperimente wurde zunächst mittels FACS-Analysen die Oberflächenexpression von CD74 und CXCR4 in humanen MonoMac6-Monozyten nachgewiesen. Eine beachtliche Menge an CD74 und CXCR4 konnte auf der Zelloberfläche detektiert werden (Abbildung 50A, B).

**A****B**



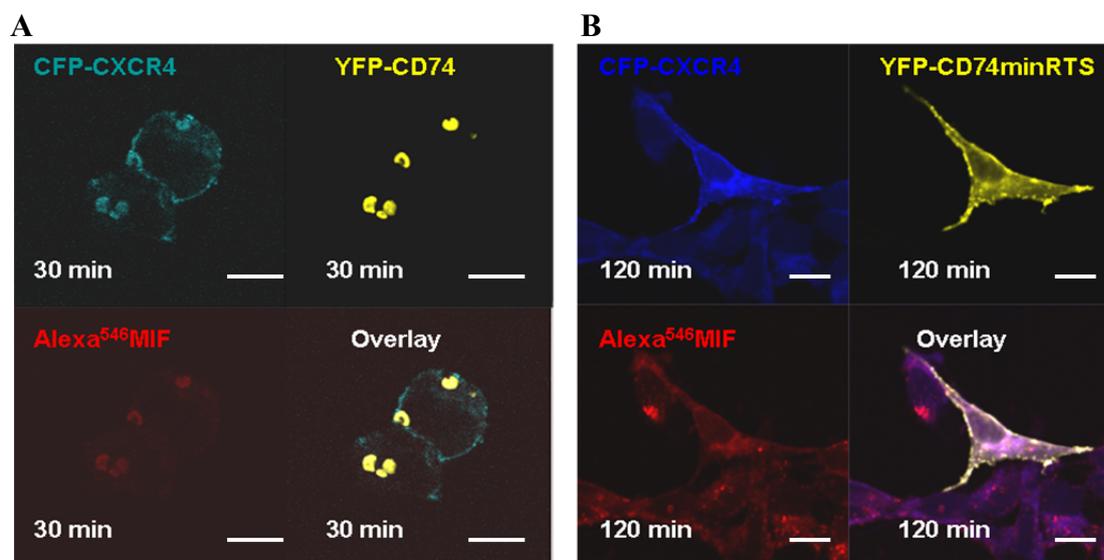
**Abbildung 50: Bildung endogener CXCR4/CD74-Rezeptorkomplexe in Monozyten. Koimmunpräzipitation endogener CD74/CXCR4-Komplexe aus Zelllysaten von MonoMac6-Zellen. (A)** Das Histogramm der Durchflusszytometrie zeigt die Fluoreszenzintensität von mit einem anti-CD74 Antikörper gefärbten Zellen (rot) im Vergleich zu solchen, die mit einem FITC-IgG Antikörper gefärbt wurden (grau). **(B)** Histogramm der Durchflusszytometrie wie in A nur diesmal wurden die Zellen mit einem anti-CXCR4 Antikörper gefärbt (grün). **(C)** Die Bildung von endogenen CXCR4/CD74-Komplexen wurde gezeigt mittels Koimmunpräzipitation. MonoMac6-Zelllysate wurden einer Immunpräzipitation mit anti-CD74 Antikörpern unterzogen und komplexiertes CXCR4 wurde anschließend durch Western Blot-Analyse mit einem anti-CXCR4 Antikörper nachgewiesen. **(D)** Kontrollblot zur Detektion des immunpräzipitierten CD74. Für die Kontrollimmunopräzipitationen wurde ein IgG-Antikörper verwendet (Kontrolle); die Input-Spuren resultieren aus der Western Blot-Analyse von jeweils 5% des entsprechenden MonoMac6-Zelllysats. Der molekulare Größenstandard stammt aus denselben Gelen (Mr). IP, Immunpräzipitation; WB: Western Blot. Unspezifische Färbung der schweren (IgG-HC) und leichten Immunglobulinketten (IgG-LC) entstanden durch den sekundären Antikörper. \*\* in der Abbildung deuten darauf hin, dass zusätzlich zu der Haupt-CXCR4-Bande bei 40 kDa eine zweite spezifische Bande detektiert werden konnte. Diese repräsentiert wahrscheinlich eine zur Hauptbande unterschiedlich glykosylierte CXCR4-Variante (47 kDa).

Um anschließend zu bestätigen, dass auch die endogenen Rezeptorproteine CD74 und CXCR4 miteinander interagieren können, sollte mittels einer endogenen Koimmunpräzipitation die Bildung von CD74/CXCR4-Rezeptorheteromeren in humanen MonoMac6-Monozyten nachgewiesen werden. Durch Immunpräzipitation von CD74 aus Monozytenzelllysaten mit Hilfe eines anti-CD74 Antikörpers konnte endogenes CXCR4 kopräzipitiert werden. Dies wurde bei der Western-Blot Analyse der Zelllysate durch eine starke Bande um die 40 kDa, die in der Kontroll-KoIP nicht vorhanden war, verdeutlicht (Abbildung 50C). Im Western Blot zeigte sich eine zweite, offensichtlich spezifische Bande bei ca. 45-47 kDa, die möglicherweise eine anders glykosylierte Form des CXCR4 repräsentieren könnte. Die Effizienz der Präzipitation wurde durch Detektion des CD74 mittels anti-CD74 Antikörper ebenfalls auf der Blotmembran überprüft (Abbildung 50D). Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass in Monozyten endogen exprimiertes CD74 zumindest teilweise mit vermutlich verschiedenen glykosylierten Varianten von CXCR4 eine Komplexbildung eingehen kann.

#### 4.11 Kolokalisation von CD74, CXCR4 und MIF

Eine Interaktion der beiden MIF-Rezeptoren CD74 und CXCR4 wurde bislang durch Koimmunpräzipitationsstudien nach ektopischer Überexpression der getaggen

Rezeptorfusionsproteine in HEK293-Zellen (Kapitel 4.10.1) und in einer endogenen Koimmunpräzipitation in Monozyten veranschaulicht. Allerdings war bislang nicht bekannt, ob die Kolokalisation zwischen CD74 und CXCR4 während der Endozytose des Zytokins MIF stattfand und somit auch funktionelle Bedeutung für den Endozytosemechanismus hatte. Um dies aufzuklären, wurden HEK293-Zellen transient mit YFP-CD74 und CXCR4-CFP transfiziert. Eine mögliche Kolokalisation zwischen den beiden Rezeptoren und MIF wurde nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF für eine Dauer von 120 min mittels Fluoreszenzaufnahmen mit einem konfokalen LSM analysiert. Nach nur 30 min konnte eine Kolokalisation zwischen YFP-CD74, CXCR4-CFP und Alexa<sup>546</sup>-MIF festgestellt werden, die jedoch meist innerhalb der Zelle vorzufinden war (Abbildung 51A).



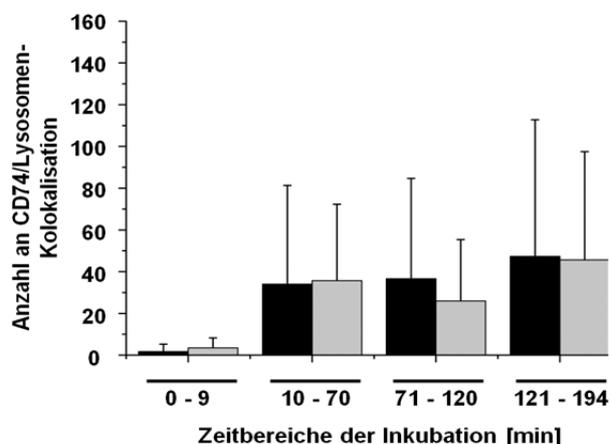
**Abbildung 51: CXCR4 und CD74 kolokalisieren mit MIF in HEK293-Zellen.** HEK293-Zellen wurden auf 10-cm-Schalen ausgesät und mit den Plasmiden pEYFP-C1-CD74 und pECFP-N1-CXCR4 (**A**) oder mit pEYFP-C1-CD74minRTS und pECFP-N1-CXCR4 (**B**) kotransfiziert. 24 h später wurden die Zellen abgelöst und auf Deckgläschen in 3-cm-Schalen ausgesät. Nach weiteren 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit Alexa<sup>546</sup>MIF (1 µg/ml) für 30 min (**A**) oder für 120 min (**B**) inkubiert. Nach den Waschschritten mit Glycinpuffer und PBS und der Fixierung der Zellen wurden sie zur mikroskopischen Analyse auf Objektträgern montiert. Kolokalisationen zwischen Alexa<sup>546</sup>MIF, CFP-CXCR4 und YFP-CD74 (**A**) bzw. YFP-CD74minRTS (**B**) wurden durch Konfokalmikroskopie analysiert. *Scale bars*: 10 µm.

Um im Folgenden sicherzustellen, dass sich CD74 hauptsächlich auf der Plasmamembran befand, wurde das Experiment wiederholt, wobei statt des YFP-CD74-Konstrukts das YFP-CD74minRTS-Konstrukt, von dem bekannt war, dass CD74minRTS vorwiegend an der Zelloberfläche exprimiert wurde (Kapitel 4.10.2), transfiziert wurde. Hierbei konnte eine starke, vor allem membranständige, Kolokalisation zwischen CXCR4-CFP, YFP-CD74minRTS und Alexa<sup>546</sup>-MIF nach zweistündiger Inkubation der HEK293-Zellen mit Alexa<sup>546</sup>-MIF nachgewiesen werden, die im Fluoreszenzbild durch eine weiße Färbung veranschaulicht wird (Abbildung 51B). Obwohl die Kolokalisation vorwiegend an der Plasmamembran stattzufinden scheint, gibt es auch vesikelartige Strukturen, in denen die beiden Rezeptoren mit MIF kolokalisieren. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass beide Rezeptoren am Endozytoseprozess von MIF beteiligt sind.

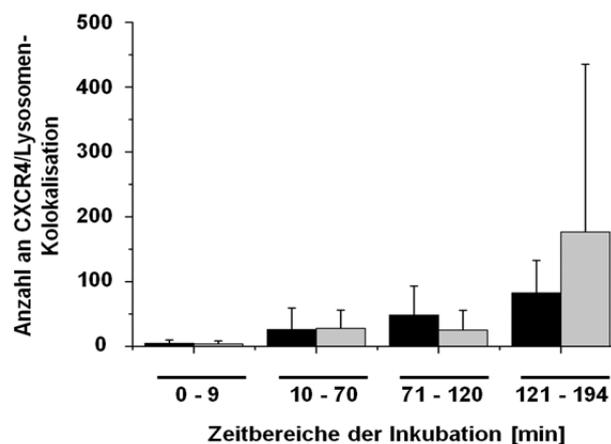
## 4.12 Kolokalisation von CD74 und CXCR4 mit den Lysosomen

Aufgrund der von Borroni et al. gewonnenen Erkenntnisse darüber, dass der Transport von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu den Lysosomen u.U. davon abhängig ist, ob der Rezeptor über längere Zeit seinem Liganden ausgesetzt ist und für CXCR4 bereits gezeigt werden konnte, dass es in Abwesenheit seines Liganden CXCL12 konstitutiv internalisiert und über langsame Recyclingendosomen an die Plasmamembran zurücktransportiert wird, während die Stimulation mit CXCL12 dazu führt, dass CXCR4 zu den späten Endosomen und Lysosomen geleitet wird statt recycelt zu werden<sup>288</sup>, war es interessant zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Lokalisierung von CXCR4 und CD74 in Abhängigkeit der Zugabe von MIF gibt oder nicht. Hierzu sollten Kolokalisationsstudien in HEK293-Zellen unternommen werden, bei denen diese mit den Plasmiden pEYFP-CD74minRTS und pECFP-CXCR4 transient transfiziert wurden und nach Anfärbung der Lysosomen mittels des Lysosomenmarkers LysoTrackerRed der Firma Invitrogen entweder mit MIF stimuliert wurden oder ein derartiger Stimulus entfiel. Die Kolokalisation von CXCR4 und CD74 mit den Lysosomen wurde anhand von *live imaging*-Experimenten untersucht. Die quantitative visuelle Auswertung der Fluoreszenzbilder aus vier unabhängigen Versuchen resultierte in den in Abbildung 52 dargestellten Balkendiagrammen. Während die MIF-Stimulation auf die Lokalisation von CXCR4 mit den Lysosomen besonders für längere Inkubationszeiten fördernd wirkt, scheint es auf diejenige von CD74 keinen Einfluss zu geben.

A



B



**Abbildung 52: CD74 und CXCR4 kolokalisieren in HEK293-Zellen mit den Lysosomen.** HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden pECFP-CXCR4 (4 µg) und pEYFP-CD74minRTS (4µg) transient transfiziert, 24 h wachsen gelassen, auf sterile Deckgläschen transferiert und für die *live imaging*-Experimente in die Lebkammer auf einem LSM710-Konfokalmikroskop montiert. Nach Zugabe von LysoTrackerRed (40 nM) und huMIF (1 µg/ml) zum Medium der HEK293-Zellen wurden fortlaufend Bilderaufnahmen angefertigt. Für die Ansätze ohne MIF waren die Arbeitsschritte identisch nur ohne MIF-Zugabe. Die quantitative Auswertung der Anzahl an Kolokalisationen von CD74 (A) bzw. CXCR4 (B) mit den Lysosomen ohne MIF- und nach MIF-Stimulation erfolgte nach Abschluss aller Experimente. Die Ergebnisse stammen aus vier unabhängigen Experimenten. Schwarz: Kolokalisation ohne MIF-Stimulus, grau: Kolokalisation mit MIF-Stimulus.

## 4.13 Initiierung des AKT-Signaltransduktionswegs

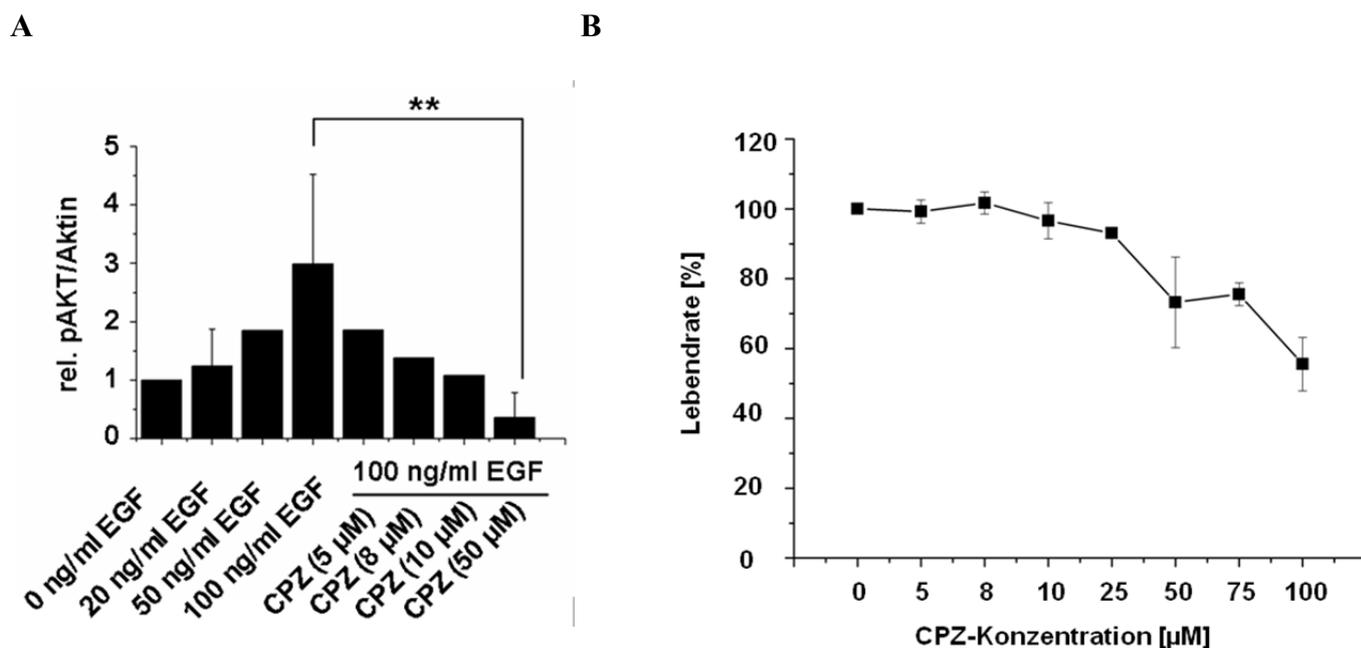
In den letzten Jahren wurde immer mehr offensichtlich, dass die Initiierung von Signaltransduktionskaskaden durch Zytokine nicht mehr ausschließlich durch eine

Rezeptoraktivierung durch Zytokinbindung an der Plasmamembran ausgelöst werden kann, sondern durchaus auch nach Endozytose des ligandengebundenen Rezeptors aus dem endolysosomalen Kompartiment heraus. Dieser Prozess wird auch als „endosomales Signaling“ oder „endosomale Signaltransduktion“ bezeichnet. Da beide MIF-Rezeptoren, CD74 und CXCR4, einen Beitrag zur MIF-Endozytose leisten und auch komplexiert mit endozytiertem MIF kolokalisieren, kam die Frage auf, ob ein durch MIF-vermittelter Signaltransduktionsweg wie der PI3K/AKT-Signalweg einzig durch MIF-Bindung an der Plasmamembran initiiert werden kann oder auch nach Endozytose des Rezeptors aktiviert werden kann und welche der beiden MIF-Rezeptoren in den Prozess involviert sind.

#### **4.13.1 Die EGF-vermittelte AKT-Aktivierung wird durch Signale von der Plasmamembran und durch endosomale Signale initiiert**

Für den Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*) wurde eine AKT-Aktivierung infolge von Signalen aus dem Endosom heraus, also eine endosomale AKT-Signaltransduktion, bereits beschrieben<sup>330,331</sup>. Aus diesem Grund wurde der Aktivierungseffekt, den EGF auf die Proteinkinase B über endosomale Signale ausübt, zunächst in den HtTA1-Zellen untersucht, da diese den EGF-Rezeptor in ausreichenden Mengen exprimieren. Um zusätzlich eine Zytotoxizität des verwendeten Inhibitors CPZ auf die HtTA1-Zellen auszuschließen, wurde begleitend ein sogenannter MTT-Assay durchgeführt.

Abbildung 53A veranschaulicht eine Dosis-abhängige Zunahme der AKT-Phosphorylierung an Ser473 durch EGF mit einer maximalen Stimulation bei einer EGF-Konzentration von 100 ng/ml (Phosphorylierungsrate = 2,9). Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Chlorpromazin (CPZ) bewirkte eine Dosis-abhängige Inhibition der EGF-vermittelten AKT-Aktivierung, wobei eine Konzentration von 50  $\mu$ M CPZ zu einer signifikanten kompletten Blockierung des Signals führte. Die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests (MTT-Assay) in Abbildung 53B konnten eine vermehrte Toxizität von CPZ auf die HtTA1-Zellen als Begründung für die Abnahme der Phosphorylierungsrate weitgehend ausschließen. Demzufolge beruht die AKT-Aktivierung durch EGF auf einem endosomalen Signaltransduktionsmechanismus.



**Abbildung 53: EGF bewirkt eine Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs und die durch EGF-initiierte AKT-Aktivierung kann durch den Endozytoseinhibitor CPZ in HtTA1-Zellen inhibiert werden.** (A) Die durch EGF hervorgerufene Aktivierung von AKT wird in HtTA1-Zellen größtenteils durch Signale aus dem Endosom bewirkt (*endocytic signaling*). HtTA1-Zellen wurden in 24-well-Platten in D-MEM Medium mit 10% FCS ausgesät und für 24 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch die gleiche Menge an Medium mit 0,5% FCS ersetzt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde eine Dosis-Wirkungskurve mit Konzentrationen für EGF zwischen 0 und 100 ng/ml huEGF durchgeführt. Anhanddessen konnte eine Konzentration von 100 ng/ml huEGF als diejenige mit der besten AKT-Aktivierung herausgestellt werden. Deshalb wurde diese Konzentration für die folgenden Studien eingesetzt. Die HtTA1-Zellen wurden mit CPZ-Konzentrationen von 5  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 10  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M für 30 min bei 37°C vorbehandelt oder blieben unvorbehandelt, bevor sie durch Zugabe von huEGF (100 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert wurden. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD aus fünf unabhängigen Experimenten. \*\* P < 0,01. (B) Zytotoxizität von CPZ auf HtTA1-Zellen. Mit Lebendraten von 75-55% bei CPZ-Konzentrationen zwischen 50 und 100  $\mu$ M wirkt CPZ nur geringfügig toxisch. Die Werte stammen aus vier unabhängigen Experimenten.

#### 4.13.2 Die MIF-vermittelte AKT-Aktivierung

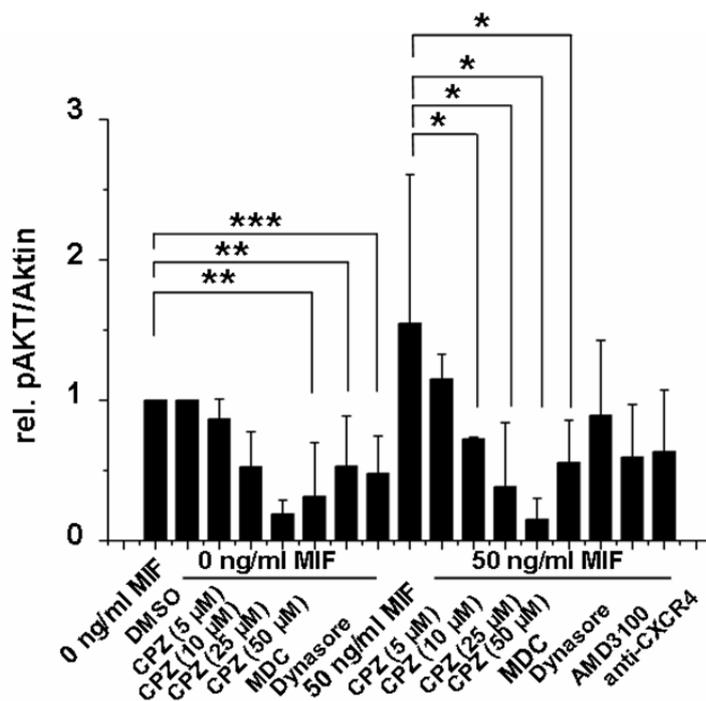
Um nun zu analysieren, ob die MIF-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B ebenfalls über einen endosomalen Signaltransduktionsmechanismus verläuft oder ausschließlich von membranständigen Signalen initiiert wird, wurde obiges Experiment mit MIF und einem ausgeweiteten Segment an Endozytoseinhibitoren wiederholt. Außer der Frage nach einem möglichen endosomalen Signaltransduktionsmechanismus sollte auch die Beteiligung der Rezeptoren CD74 und CXCR4 an der Signalvermittlung untersucht werden. Für die folgenden Studien wurden sowohl die modifizierten HeLa-Zellen (HtTA1), als auch humane T-Lymphozyten und humane Dermalfibroblasten verwendet.

#### ***4.13.2.1 Die MIF-vermittelte Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs wird zelltypabhängig durch Signale von der Plasmamembran und/oder solchen aus dem Endosom induziert***

##### *HELA ZELLEN*

Rekombinantes MIF konnte eine AKT-Phosphorylierung an Ser473 in HtTA1-Zellen induzieren. Allerdings entsprach das Ausmaß der Aktivierung keinesfalls demjenigen durch EGF. Trotz der suboptimalen aktivierenden Wirkung (Phosphorylierungsrate = 1,5) konnten signifikante Inhibitionen der AKT-Phosphorylierung nach Zugabe ansteigender CPZ-Konzentrationen oder einer MDC-Konzentration von 50 µM erzielt werden. Auffällig war, dass CPZ, MDC und Dynasore auch einen inhibitorischen Effekt auf die Grundphosphorylierung der Proteinkinase B ohne Zugabe von exogenem MIF aufwiesen (Abbildung 54). Dieser Effekt kann insofern erklärt werden, als das endogene MIF über einen autokrinen Mechanismus den AKT-Signalweg aktiviert<sup>239</sup> und die Endozytoseinhibitoren mit diesem Mechanismus interferierten. Die MIF-vermittelte AKT-Phosphorylierung konnte auch durch Dynasore, AMD3100 und neutralisierende CXCR4-Antikörper inhibiert werden.

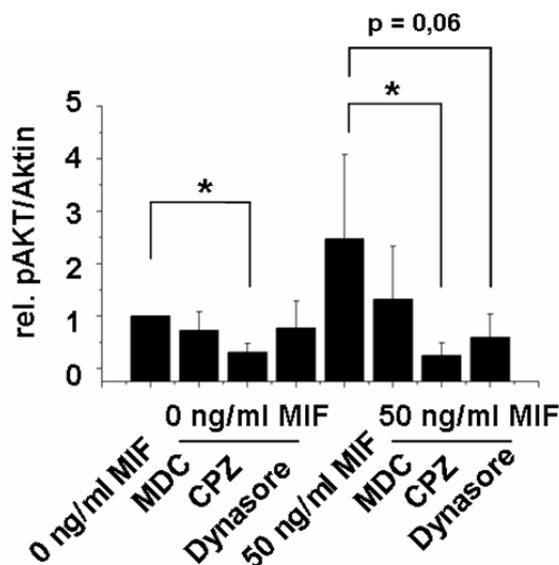
Zusammenfassend kann demnach angenommen werden, dass die Aktivierung des AKT-Signalwegs über die MIF/CXCR4-Achse zumindest teilweise über endosomale Signaltransduktion vermittelt wird. Obwohl die Wirkung von CPZ auf die MIF-induzierte AKT-Aktivierung gegenüber derjenigen durch endogenes MIF nicht sonderlich ausgeprägt war, sollten die Indizes, die auf eine teilweise durch endosomale Signale bewirkte AKT-Aktivierung über die MIF/CXCR4-Achse hindeuteten, in weiteren Zelllinien bestätigt oder widerlegt werden.



**Abbildung 54: Der durch MIF-Stimulierung bewirkten AKT-Aktivierung in HfTA1-Zellen kann teilweise durch Endozytoseinhibitoren entgegengewirkt werden.** Durch MIF-stimulierte AKT-Phosphorylierung wird in HfTA1-Zellen in gewissem Maße durch Signale aus dem Endosom (*endosomal signaling*) initiiert. HfTA1-Zellen wurden in 24-well-Platten in D-MEM Medium mit 10% FCS ausgesät. Nach 24 h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und durch die gleiche Menge an D-MEM Medium mit 0,5% FCS ersetzt. Der erneuten Inkubation für 24 h bei 37°C folgte eine Vorbehandlung mit einem der folgenden Endozytoseinhibitoren MDC (50 μM), Dynasore (80 μM) oder CPZ (5 μM, 10 μM, 25 μM oder 50 μM) für 30 min bei 37°C. Kontrollzellen erfuhren keine Vorbehandlung, wurden aber ebenfalls für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen durch Zugabe von MIF (50 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert. Zusätzlich zu den Endozytoseinhibitoren wurden der CXCR4-spezifische Inhibitor AMD3100 (1 μg/ml) oder ein anti-CXCR4-Antikörper (10 μg/ml) verwendet, um die AKT-Aktivierung zu inhibieren. Nach der Stimulation wurden die Zellen bei 13000 g für 5 min zentrifugiert, lysiert und für die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet. Relative Phosphorylierungsraten (phospho-AKT/Aktin) wurden durch Bestimmung der Bandendensitometrie mit Hilfe der Aida Image Analyser Software ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte ± SD aus elf unabhängigen Experimenten. \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001.

### T-LYMPHOZYTEN

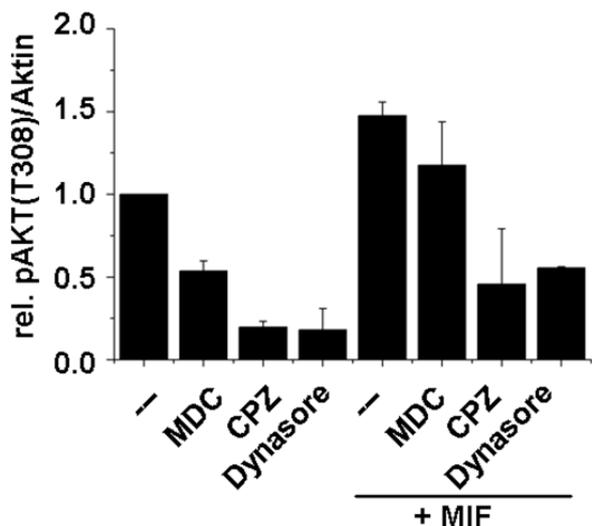
Für Jurkat T-Zellen ist bekannt, dass sie eine robuste AKT-Phosphorylierungsantwort infolge einer MIF-Stimulation liefern<sup>117</sup>. Daher sollten die in HfTA1-Zellen durchgeführten Studien in Jurkat T-Zellen wiederholt werden. Eine ca. 2,4-fache AKT-Phosphorylierung an Ser473 gegenüber der Grundphosphorylierung wurde in diesen Zellen nach MIF-Stimulation erzielt, der durch MDC, CPZ und Dynasore entgegengewirkt werden konnte. Der inhibitorische Effekt von CPZ war signifikant (p<0,05), wohingegen Dynasores Effekt nur knapp die Signifikanzgrenze verpasste (p=0,06). Dennoch untermauern diese Studien die Annahme, dass die durch MIF-induzierte AKT-Aktivierung zumindest zum Teil durch endosomale Signale initiiert wird (Abbildung 55).



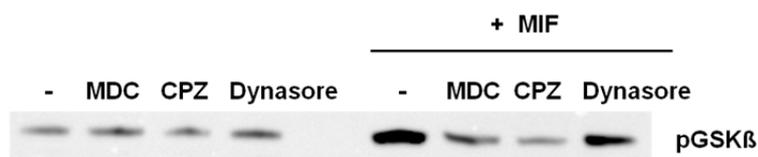
**Abbildung 55: Die durch MIF-Stimulierung bewirkte AKT-Aktivierung (Phosphorylierung an Ser473) in Jurkat-T-Zellen kann teilweise durch Endozytoseinhibitoren blockiert werden.** Durch MIF-stimulierte AKT-Phosphorylierung wird in Jurkat-T-Zellen in gewissem Maße durch Signale aus dem Endosom (*endosomal signaling*) initiiert. Die Jurkat-T-Zellen wurden in 24-well-Platten in RPMI1640-Medium mit 10% FCS ausgesät. Nach 24 h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und durch die gleiche Menge an RPMI1640-Medium mit 0,5% FCS ersetzt. Der erneuten Inkubation für 24 h bei 37°C folgte eine Vorbehandlung mit einem der folgenden Endozytoseinhibitoren MDC (50  $\mu$ M), CPZ (50  $\mu$ M) oder Dynasore (80  $\mu$ M) für 30 min bei 37°C. In allen Experimenten wurden die Kontrollzellen durch Zugabe der der Menge an Inhibitoren entsprechenden Menge an Puffer stimuliert und ebenfalls für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen durch Zugabe von MIF (50 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert, dann bei 13000 g für 5 min zentrifugiert, lysiert und für die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet. Relative Phosphorylierungsraten (phospho-AKT/Aktin) wurden durch Bestimmung der Bandendensitometrie mit Hilfe der Aida Image Analyser Software ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SD aus fünf unabhängigen Experimenten. \*  $P < 0,05$ .

Um einen Hinweis auf die Aktivierung der Proteinkinase B zu bekommen, wurde zusätzlich zur Phosphorylierung an Ser473 zunächst exemplarisch in zwei Versuchen die Phosphorylierung an Thr308 analysiert (Abbildung 56). Da die Phosphorylierung der Proteinkinase B an beiden Phosphorylierungsstellen ein erstes Indiz für deren Aktivität war, wurde zur Absicherung der Daten und als Nachweis der Aktivierung ein AKT-Kinaseassay durchgeführt.

Obwohl die MIF-stimulierte AKT-Phosphorylierung an Thr308 im Mittel nur bei 1,5-fach liegt, konnte sie deutlich durch die Endozytoseinhibitoren beeinträchtigt werden, woraus geschlussfolgert werden kann, dass auch diese durch endosomale Signale initiiert wird oder die Inhibition aus der Inhibition der Phosphorylierung an Ser473 resultiert. Dieser Versuch und der nun folgende AKT-Aktivierungsassay der Firma Cell Signaling („*Akt Kinase Assay Kit*“) verdeutlichen, dass es sich bei der Phosphorylierung der Proteinkinase B durch MIF an Ser473 und Thr308 auch um eine Aktivierung der Kinase handelt, die durch die Wirkung der Endozytoseinhibitoren MDC, CPZ und Dynasore in unterschiedlichem Ausmaße blockiert werden kann, was durch die schwächeren Banden für Phospho-GSK $\beta$  im Blot verdeutlicht wird (Abbildung 57).



**Abbildung 56: Die durch MIF-Stimulierung bewirkte AKT-Aktivierung (Phosphorylierung an Thr308) in Jurkat-T-Zellen kann teilweise durch Endozytoseinhibitoren blockiert werden.** Auch die durch MIF-stimulierte AKT-Phosphorylierung an Thr308 wird in Jurkat-T-Zellen in gewissem Maße durch Signale aus dem Endosom (*endosomal signaling*) initiiert. Die Jurkat-T-Zellen wurden in 24-well-Platten in RPMI1640-Medium mit 10% FCS ausgesät. Nach 24 h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und durch die gleiche Menge an RPMI1640-Medium mit 0,5% FCS ersetzt. Der erneuten Inkubation für 24 h bei 37°C folgte eine Vorbehandlung mit einem der folgenden Endozytoseinhibitoren MDC (50 µM), CPZ (50 µM) oder Dynasore (80 µM) für 30 min bei 37°C. In allen Experimenten wurden die Kontrollzellen durch Zugabe der der Menge an Inhibitoren entsprechenden Menge an Puffer stimuliert und ebenfalls für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen durch Zugabe von MIF (50 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert, dann bei 13000 g für 5 min zentrifugiert, lysiert und für die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet. Relative Phosphorylierungsraten (phospho-AKT(Thr308)/Aktin) wurden durch Bestimmung der Bandendensitometrie mit Hilfe der Aida Image Analyser Software ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte ± SD aus zwei unabhängigen Experimenten.

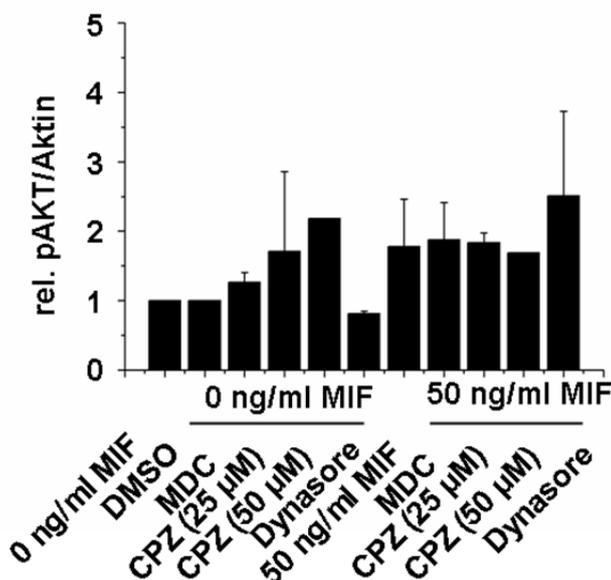


**Abbildung 57: Die durch MIF-Stimulierung bewirkte AKT-Aktivierung hat eine Phosphorylierung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) zur Folge.** Bis zur Lyse der Jurkat T-Zellen wurden alle Arbeitsschritte wie in Abbildung 55 beschrieben durchgeführt. Anders als beim AKT-Aktivierungsassay in Abbildung 53 erfolgte die Zellyse mit dem dem „Akt Kinase Assay Kit“ der Firma Cell Signaling beiliegenden „Cell Lysis Buffer“. Zur Immunpräzipitation der Proteinkinase B (AKT) aus dem Zellysate wurde dieses mit an *beads* immobilisiertem monoklonalen Phospho-AKT(Ser473)-Antikörpern („*immobilized Phospho-Akt (Ser473)(D9E) Rabbit mAb (Bead Conjugate)*“) versetzt und ü.N. im Überkopfschüttler bei 4°C rotiert. Im anschließenden *in vitro*-Kinase Assay wurden die *beads* nach einigen Waschschritten mit ATP und dem Substrat GSK3-Fusionsprotein versetzt und für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt, die Proben bei 95°C für 5 min denaturiert und auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Wie üblich erfolgte die Western-Blot-Analyse und Immundetektion mit dem Ziel des Nachweises von Phospho-GSK-3 auf der Blotmembran. Alle für diesen Assay benötigten Reagenzien waren im Kit enthalten. Der obige Blot ist repräsentativ für die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen.

#### HUMANE DERMALFIBROBLASTEN

Obwohl in den obigen beiden Zelllinien, HtTA1 und Jurkat T-Zellen, eine teilweise Abhängigkeit der AKT-Aktivierung von endosomalen Signalen nachgewiesen werden konnte, soll im Folgenden deutlich werden, dass diese Erkenntnis nicht universell auf alle Zelltypen

zutreffen scheint. Äquivalente AKT-Aktivierungsassays in humanen Dermalfibroblasten verdeutlichten, dass dort die MIF-stimulierte AKT-Phosphorylierung nicht durch Endozytoseinhibitoren beeinflusst werden konnte (Abbildung 58). Demzufolge könnte die Entscheidung, welcher Signaltransduktionsmechanismus (plasmamembran-assoziiert vs. endosomal) für die Aktivierung des AKT-Signalwegs zuständig ist vom entsprechend betrachteten Zelltyp abhängen.



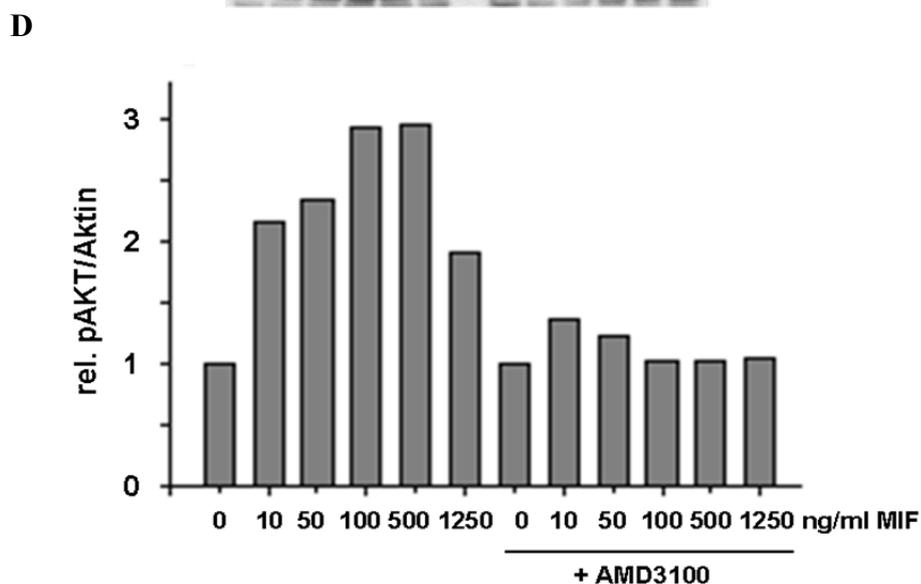
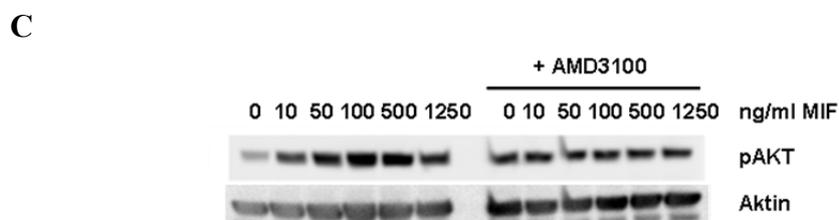
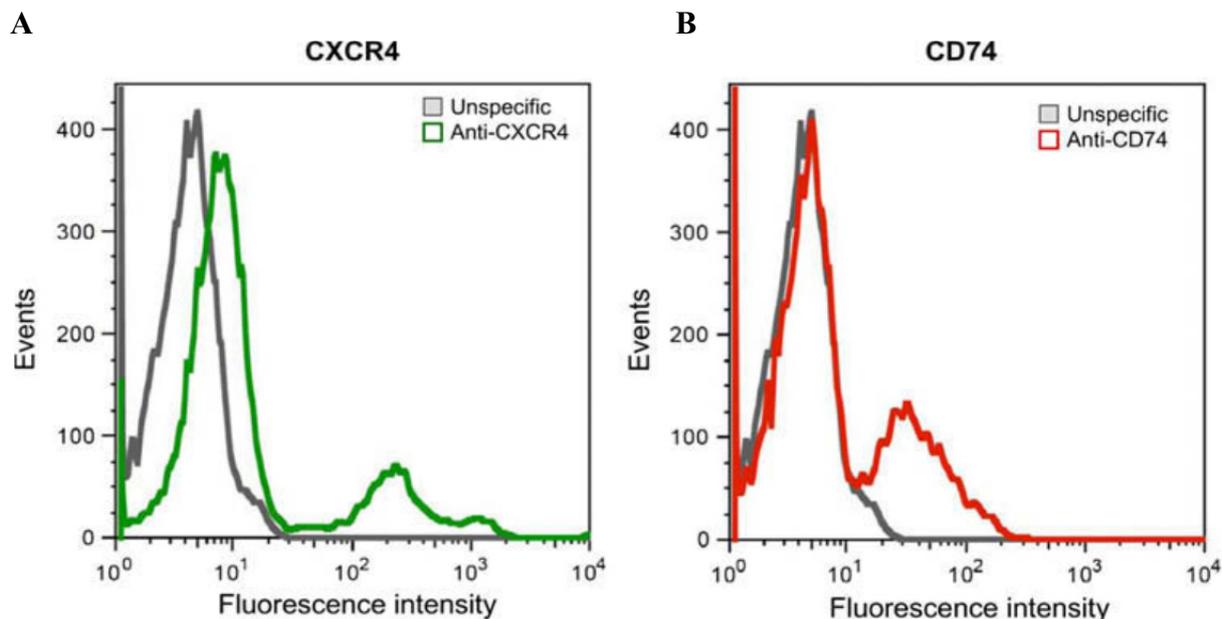
**Abbildung 58: Die durch MIF-Stimulierung bewirkte AKT-Aktivierung kann in humanen Dermalfibroblasten durch Endozytoseinhibitoren nicht blockiert werden.** Humane Dermalfibroblasten (F277) wurden in 24-*well*-Platten in D-MEM Medium mit 10% FCS ausgesät. Nach 24 h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und durch die gleiche Menge an D-MEM Medium mit 0,5% FCS ersetzt. Der erneuten Inkubation für 24 h bei 37°C folgte eine Vorbehandlung mit einem der folgenden Endozytoseinhibitoren MDC (50 µM), Dynasore (80 µM) oder CPZ (25 µM oder 50 µM) für 30 min bei 37°C. In allen Experimenten wurden die Kontrollzellen durch Zugabe der der Menge an Inhibitoren entsprechenden Menge an Puffer stimuliert und ebenfalls für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen durch Zugabe von MIF (50 ng/ml) für 10 min bei 37°C stimuliert, dann bei 13000 g für 5 min zentrifugiert, lysiert und für die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot vorbereitet. Relative Phosphorylierungsraten (phospho-AKT/Aktin) wurden durch Bestimmung der Bandendensitometrie mit Hilfe der Aida Image Analyser Software ermittelt. Die Ergebnisse repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten.

#### 4.13.2.2 *Abhängigkeit der Signaltransduktion zur AKT-Aktivierung von den Rezeptoren CD74 und CXCR4*

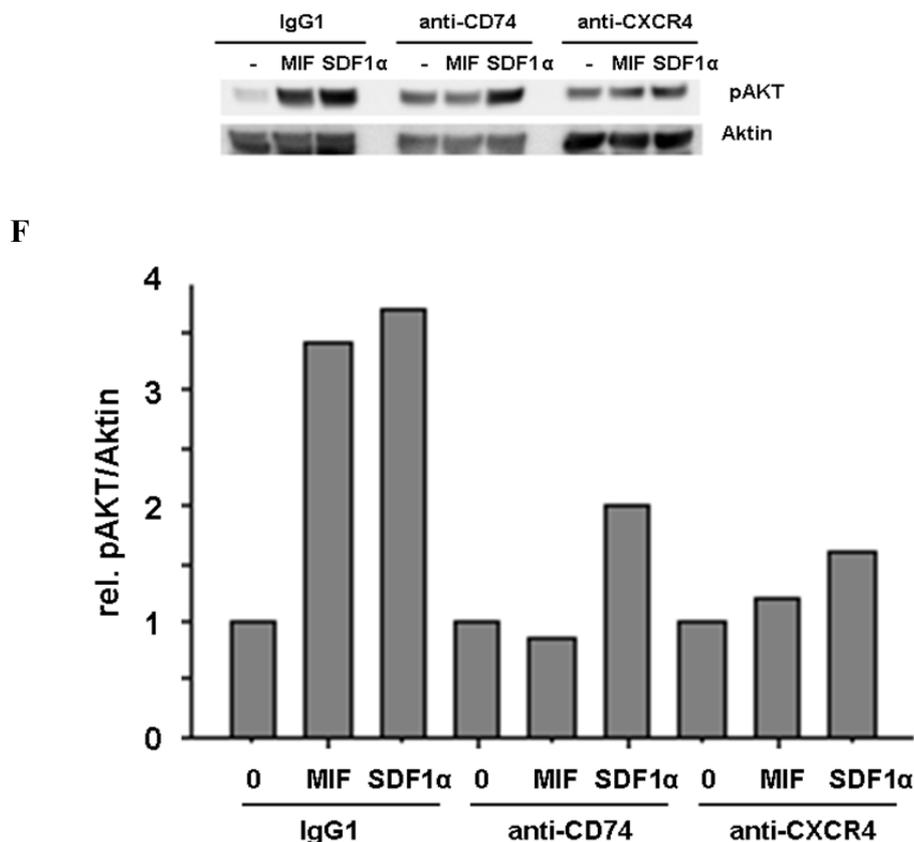
Eine MIF-stimulierte Aktivierung des AKT-Signaltransduktionswegs durch Phosphorylierung der Proteinkinase B an Ser473 konnte in HtTA1-, Jurkat T-Zellen und humanen Dermalfibroblasten verdeutlicht werden (Kapitel 4.13.2.1). Des Weiteren wurde verdeutlicht, dass diese Aktivierung in HtTA1- und Jurkat T-Zellen zumindest teilweise durch endosomale Signale initiiert wurde. Eine Beteiligung der MIF-Rezeptoren CD74 und CXCR4 oder eine funktionelle Bedeutung des heteromeren CD74/CXCR4-Rezeptorkomplexes für die MIF-induzierte AKT-Aktivierung aufzuzeigen, war Ziel der weiteren Studien.

Da Jurkat T-Zellen die beste AKT-Aktivierung infolge einer MIF-Stimulation im Vergleich mit den anderen untersuchten Zelllinien zeigten, wurde diese Zelllinie für die folgenden

Experimente auserwählt. Mit Hilfe einer FACS-Analyse wurde zunächst nachgewiesen, dass beide Rezeptoren, CD74 und CXCR4, in ausreichendem Maße auf der Zelloberfläche von Jurkat T-Zellen exprimiert werden (Abbildung 59A, B). Durch Verwendung des spezifischen CXCR4-Inhibitors AMD3100 im oben bereits beschriebenen AKT-Aktivierungsassay mit MIF konnte eine Beteiligung von CXCR4 an der Signalübertragung zur AKT-Phosphorylierung verdeutlicht werden.



**E**



**Abbildung 59: Die Komplexbildung zwischen den MIF-Rezeptoren CXCR4 und CD74 korreliert mit einem funktionellen Zusammenspiel beider bei der AKT-Aktivierung.** Während die MIF-stimulierte AKT-Aktivierung in Jurkat T-Zellen sowohl durch den CXCR4-Inhibitor AMD3100, als auch durch anti-CXCR4 und anti-CD74 Antikörper blockiert werden kann, kann die SDF-1 $\alpha$ -vermittelte AKT-Aktivierung nur durch anti-CXCR4, nicht aber durch anti-CD74 Antikörper reduziert werden. (A) Das Histogramm der Durchflusszytometrie zeigt die Zelloberflächenexpression von CXCR4 auf Jurkat T-Zellen. Die Fluoreszenzintensität von mit anti-CXCR4 Antikörpern gefärbten Zellen (grün) wird mit derjenigen von mit FITC-IgG unspezifisch gefärbten Zellen (grau) verglichen. (B) Das Histogramm der Durchflusszytometrie zeigt die Zelloberflächenexpression von CD74 auf Jurkat T-Zellen. Die Fluoreszenzintensität der mit anti-CD74 Antikörpern gefärbten Zellen (rot) wird mit derjenigen von mit FITC-IgG unspezifisch gefärbten Zellen (grau) verglichen. (C) Jurkat T-Zellen wurden in 24-well-Platten in D-MEM Medium mit 10% FCS ausgesät. Nach 24 h Inkubation der Zellen bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und durch die gleiche Menge an D-MEM Medium mit 0,5% FCS ersetzt. Der erneuten Inkubation für 24 h bei 37°C folgte eine Vorbehandlung mit AMD3100 (1  $\mu$ g/ml, + AMD3100) für 30 min und die Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen an MIF für 10 min. Die AKT-Aktivierung wurde durch Western Blot-Analyse der entsprechenden Zelllysate mit einem Phospho-Ser473-AKT Antikörper ermittelt. Aktin diente hierbei zur Standardisierung. (D) Quantifizierung des in C dargestellten Blots. Die Phosphorylierungsraten (pAKT/Aktin) resultieren aus den Mittelwerten aus zwei unabhängigen Versuchen. (E) Entsprechendes Experiment wie in C mit Antikörperbehandlung statt AMD3100. Jurkat T-Zellen wurden mit anti-CD74, anti-CXCR4 Antikörper oder mit Kontroll-IgG (jeweils 10  $\mu$ g/ml) für 30 min vorbehandelt. Die Zellen wurden dann mit MIF (100 ng/ml) bzw. CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) (100 ng/ml) stimuliert. (F) Quantifizierung des in E dargestellten Blots. Die Phosphorylierungsraten (pAKT/Aktin) resultieren aus den Mittelwerten aus zwei unabhängigen Versuchen.

Nach Stimulation der Jurkat T-Zellen mit rekombinantem MIF konnte bis zu einer Konzentration von 500 ng/ml in der Western-Blot-Analyse eine dosis-abhängige Zunahme der AKT-Phosphorylierung an Ser473 festgestellt werden, wohingegen diese durch AMD3100 signifikant blockiert wurde (Abbildung 59C, D). Um im Folgenden zu überprüfen, ob auch CD74 zusätzlich zu CXCR4 an der AKT-Aktivierung beteiligt ist, wurden Jurkat T-Zellen vor ihrer Stimulation mit MIF oder dem kognitiven Liganden von CXCR4, SDF-1 oder CXCL12, mit anti-IgG-, anti-CD74- oder anti-CXCR4-Antikörpern inkubiert. Während die

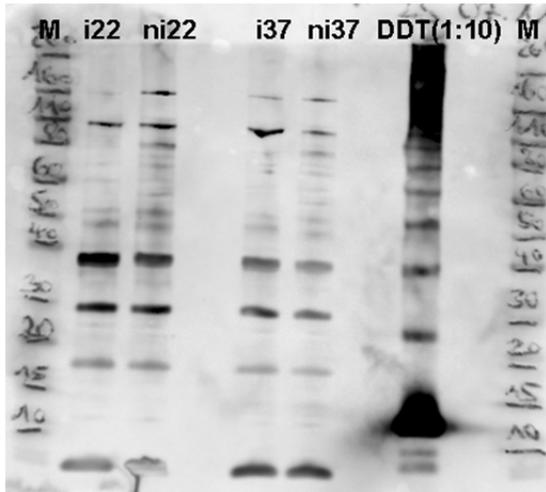
AKT-Phosphorylierung infolge der Stimulation mit SDF-1 $\alpha$  nur durch neutralisierende CXCR4-Antikörper inhibiert werden konnte, wirkte sich eine Vorbehandlung sowohl mit anti-CD74-, als auch mit anti-CXCR4-Antikörpern inhibierend auf die MIF-stimulierte AKT-Phosphorylierung aus (Abbildung 59E, F). Demzufolge wird die MIF-induzierte AKT-Signaltransduktion, nicht aber die SDF-1 $\alpha$ -induzierte AKT-Signaltransduktion über CD74/CXCR4-Rezeptorkomplexe vermittelt.

#### **4.14 Proteinexpression von huD-DT in *E.coli* BL21(DE3)**

Da D-DT dem bisher untersuchten Zytokin MIF nicht nur hinsichtlich seiner Topologie, seiner Struktur und seiner Sequenz ähnlich ist, sondern anfängliche Studien bezüglich seiner pathophysiologischen Bedeutung auch eine Analogie hinsichtlich seiner Bedeutung für die Zellmigration, seiner Rolle bei Leber- und Krebserkrankungen, sowie für verschiedene Signaltransduktionswege (ERK, JNK) verdeutlichten (siehe Kapitel 1.2.1.3), stellte sich die Frage nach einer Äquivalenz bezüglich des Endozytosevorgangs zwischen MIF und D-DT.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollte D-DT zunächst in *E.coli* BL21(DE3) rekombinant hergestellt, mittels *Fast protein liquid chromatography* (FPLC) aufgereinigt und schließlich durch die Methode der Gelfiltration (siehe Kapitel 2.18.2) wie MIF mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 546 markiert werden.

Trotz des Austestens verschiedenster Expressionsbedingungen (Expression bei 22°C, ü.N. vs. Expression bei 37°C, 4 h) gelang es weder eine robuste Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG zu erzielen, noch in anschließenden Silbergefärbungen (nicht gezeigt) oder Western Blots eine Bande auf der erwarteten Laufhöhe bei ca. 12 kDa entsprechend des mitgeführten D-DT-Standards zu bekommen (Abbildung 60). Auch die Vermutung, es könnte sich bei derjenigen Bande bei ca. 37 kDa um das Homotrimer von D-DT handeln und das dass Monomer aufgrund der hohen Denaturierungstemperatur von D-DT nicht sichtbar war, konnte nicht bestätigt werden, denn auch eine weitere Zugabe von Detergenz (10  $\mu$ l 1 M DTT) zu den Proben und längeres Kochen bei höherer Temperatur (105°C, 10 min) bewirkte keine Bande im Western Blot bei ca. 12 kDa, die dem Monomer entspräche.



M: Novex Protein Marker

i22: induzierte Bakterienkultur 22°C, ü.N., 0,1 mM IPTG

i37: induzierte Bakterienkultur 37°C, 4 h, 1 mM IPTG

ni22: nicht induzierte Bakterienkultur 22°C, ü.N., 0,1 mM IPTG

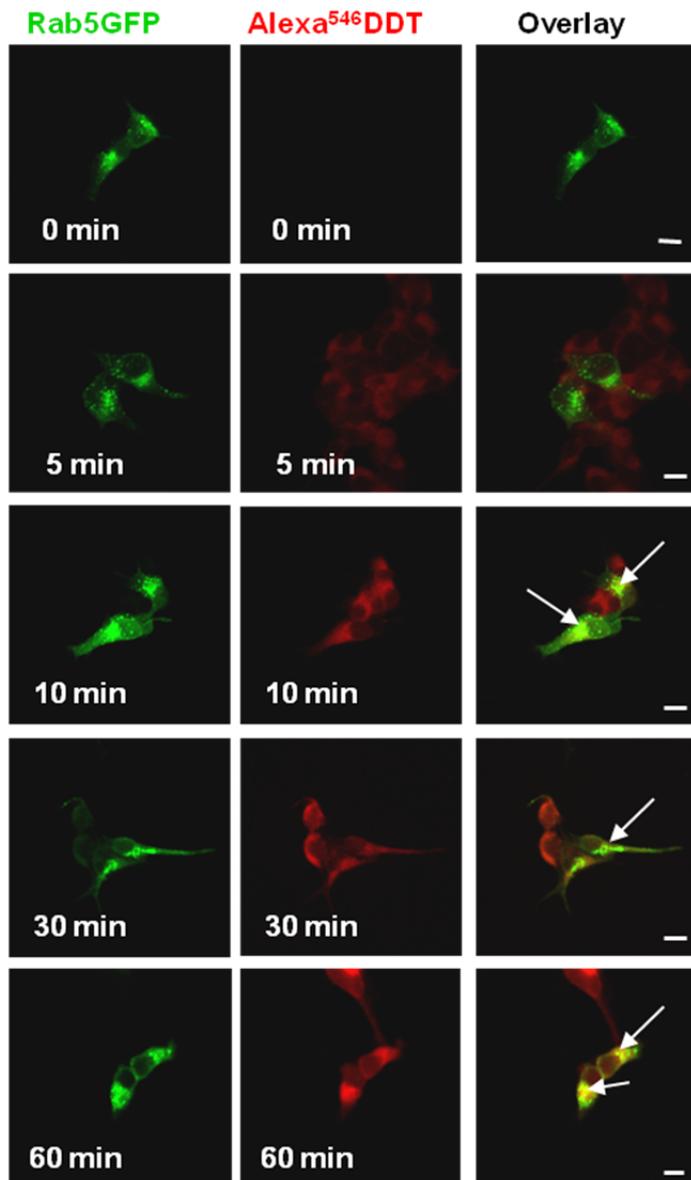
ni37: nicht induzierte Bakterienkultur 37°C, 4 h, 1 mM IPTG

**Abbildung 60: Western Blot der Proteinexpression von huD-DT in *E.coli* BL21(DE3) bei 22°C, ü.N. und bei 37°C für 4 h.** Nach Animpfen einer Hauptkultur mit einer Vorkultur erfolgte eine Wachstumsphase der Bakterien bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5. Durch Zugabe von 0,1 mM bzw. 1 mM IPTG zur Schüttelkultur wurde die Expression von D-DT gezielt angeschaltet. Nach 4-stündiger bzw. ü.N.-Kultivierung der Bakterien bei 37°C bzw. bei 22°C wurden diese geerntet. Proben für die Analyse im Western Blot wurden vor Lagerung der Bakterienpellets bei -20°C gewonnen (siehe auch Kapitel 3.1.3 und 3.1.4). Der Blot zeigt die Expression von D-DT bei 22°C und 37°C repräsentativ für die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. DDT (1:10), D-DT-Standard aus Yale, 1:10 verdünnt in PBS.

Aufgrund mangelnder Zeit weitere Arbeit in die Optimierung der Proteinexpression von D-DT zu investieren, wurde beschlossen, auf fertiges humanes D-DT aus der Arbeitsgruppe von R. Bucala aus Yale zurückzugreifen, um die Endozytosestudien zu D-DT nach dessen Fluoreszenzmarkierung (siehe Kapitel 3.2.8) zu beginnen.

#### 4.15 Partielle Kolo-kalisation von D-DT mit den frühen und den späten Endosomen, sowie mit den Lysosomen

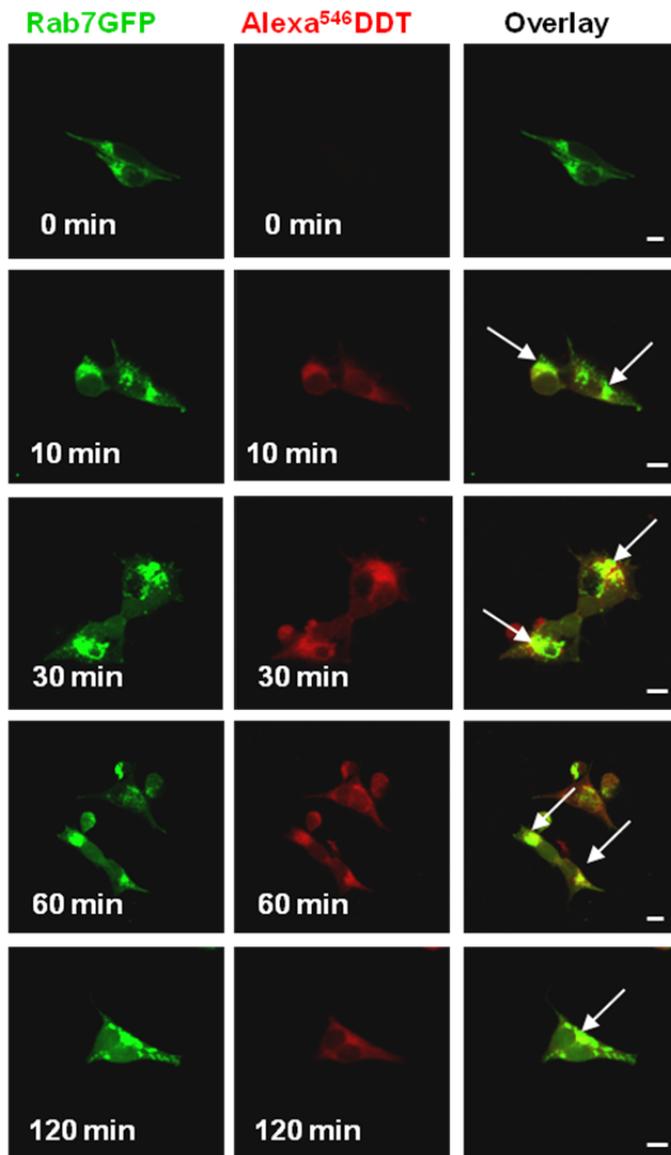
Für die Immunfluoreszenz-basierten Internalisierungsassays mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT, bei denen HEK293-Zellen mit dem frühen endosomalen Marker Rab5GFP oder mit dem späten endosomalen Marker Rab7GFP transient transfiziert wurden, konnte eine partielle Kolo-kalisation zwischen Rab5GFP bzw. Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>-D-DT gefunden werden. Diese verdeutlichte sich durch eine Gelbfärbung innerhalb der HEK293-Zellen, die aus einer Überlagerung der endosomalen Grünfärbung und des roten Alexa<sup>546</sup>-D-DT resultierte. Sowohl die Kolo-kalisation zwischen Rab5GFP und Alexa<sup>546</sup>-D-DT, als auch diejenige zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>-D-DT zeigte sich ab einer 10-minütigen Inkubation mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT (Abbildung 61, Abbildung 62).



**Abbildung 61: Partielle Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und den frühen Endosomen (Rab5GFP).** HEK293-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab5GFP (Marker für die frühen Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die verschiedenen oben angegebenen Zeitdauern mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT (200 ng/ml) inkubiert, einmal mit eiskaltem Glycinpuffer pH 2,8, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 3,6% Paraformaldehyd fixiert, bevor sie auf Objektträgern montiert wurden. Die obigen Fluoreszenzbilder zeigen repräsentative Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten (n = 2). Die Pfeile verdeutlichen die Kolokalisation zwischen Rab5GFP und Alexa<sup>546</sup>-D-DT. Scale bars: 10 µm.

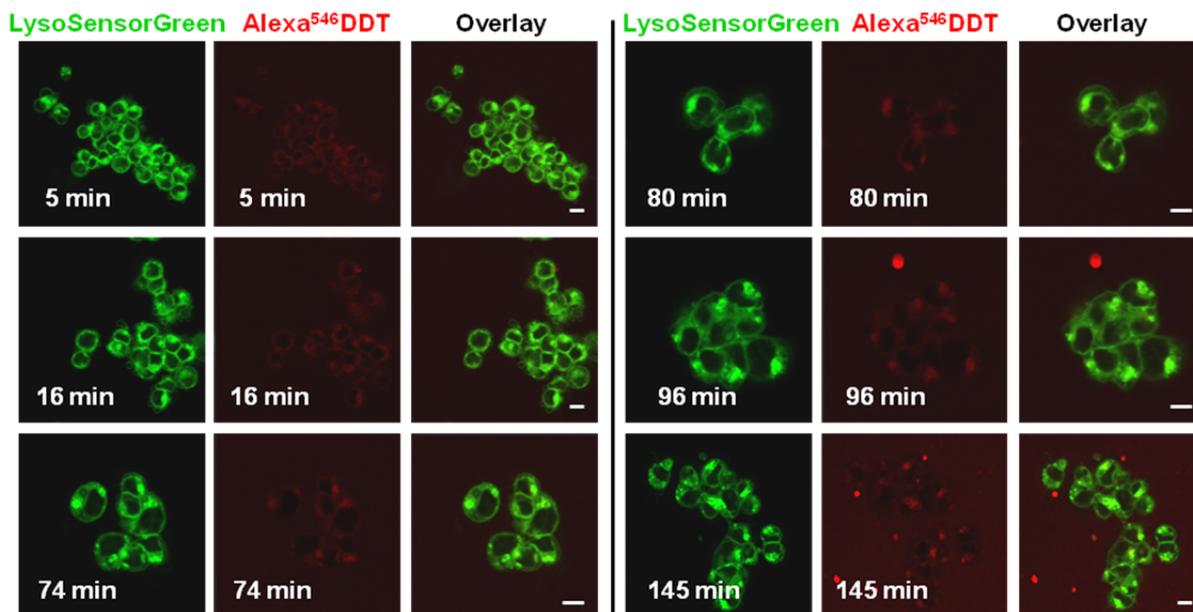
Zur Absicherung der vorläufigen Daten für die Endozytose von D-DT wurden zusätzlich Kofärbungen zwischen dem Farbstoff LysoSensorGreen, der Lysosomen und sonstige saure Kompartimente anfärbt, und Alexa<sup>546</sup>-D-DT in HEK293-Zellen durchgeführt (Abbildung 63). Die Analyse dieser Studien ergab eine Kolokalisation von Alexa<sup>546</sup>-D-DT mit sauren Kompartimenten erstmals nach einer 5-minütigen Inkubation mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT. Dieses Ergebnis würde die gewonnenen Erkenntnisse aus den Kolokalisationsstudien mit Rab5GFP und Rab7GFP weiter untermauern und auf eine tatsächliche Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und den endosomalen Kompartimenten in Analogie zu MIF hindeuten. Auch

nach fast 2,5-stündiger Inkubation (145 min) mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT zeigte sich noch eine Kolokalisation zwischen D-DT und dem Marker LysoSensorGreen (Abbildung 63), was für eine Kolokalisation mit den Lysosomen sprechen könnte.



**Abbildung 62: Partielle Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und den späten Endosomen (Rab7GFP).** HEK293-Zellen wurden mit einem das Fusionsprotein Rab7GFP (Marker für die späten Endosomen) exprimierenden Plasmid transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die verschiedenen oben angegebenen Zeitdauern mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT (200 ng/ml) inkubiert, einmal mit eiskaltem Glycinpuffer pH 2,8, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 3,6% Paraformaldehyd fixiert, bevor sie auf Objektträgern montiert wurden. Die obigen Fluoreszenzbilder zeigen repräsentative Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten (n = 2). Die Pfeile verdeutlichen die Kolokalisation zwischen Rab7GFP und Alexa<sup>546</sup>-D-DT. Scale bars: 10  $\mu$ m.

Anhand der bisherigen Ergebnisse könnte davon ausgegangen werden, dass sich D-DT bezüglich seiner Endozytose ähnlich wie MIF verhält.



**Abbildung 63: Partielle Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und LysoSensorGreen.** HEK293-Zellen ( $10^6$ ) wurden 24 h vor dem *live imaging*-Experiment auf runden Deckgläschen ausgesät und bei 37°C inkubiert. Für die Konfokalmikroskopie wurden die HEK293-Zellen mit Vollmedium, das mit LysoSensor<sup>TM</sup>Green DND-189 in einer Konzentration von 1 µM versetzt war, für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Das Medium wurde durch frisches Medium ohne LysoSensor-Zusatz ersetzt und eines der Deckgläschen mit den angewachsenen HEK293-Zellen am Tag des Experiments in eine Apparatur eingespannt, mit Medium, das mit Alexa<sup>546</sup>-D-DT einer Konzentration von 2 µg/ml angereichert war, versorgt und auf dem Konfokalmikroskop LSM710 montiert. Die Bildaufnahmen erfolgten unmittelbar für 5 bis 145 min nach Zugabe. Gelbfärbung verdeutlicht Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und LysoSensor<sup>TM</sup>Green. Scale bars: 10 µm.

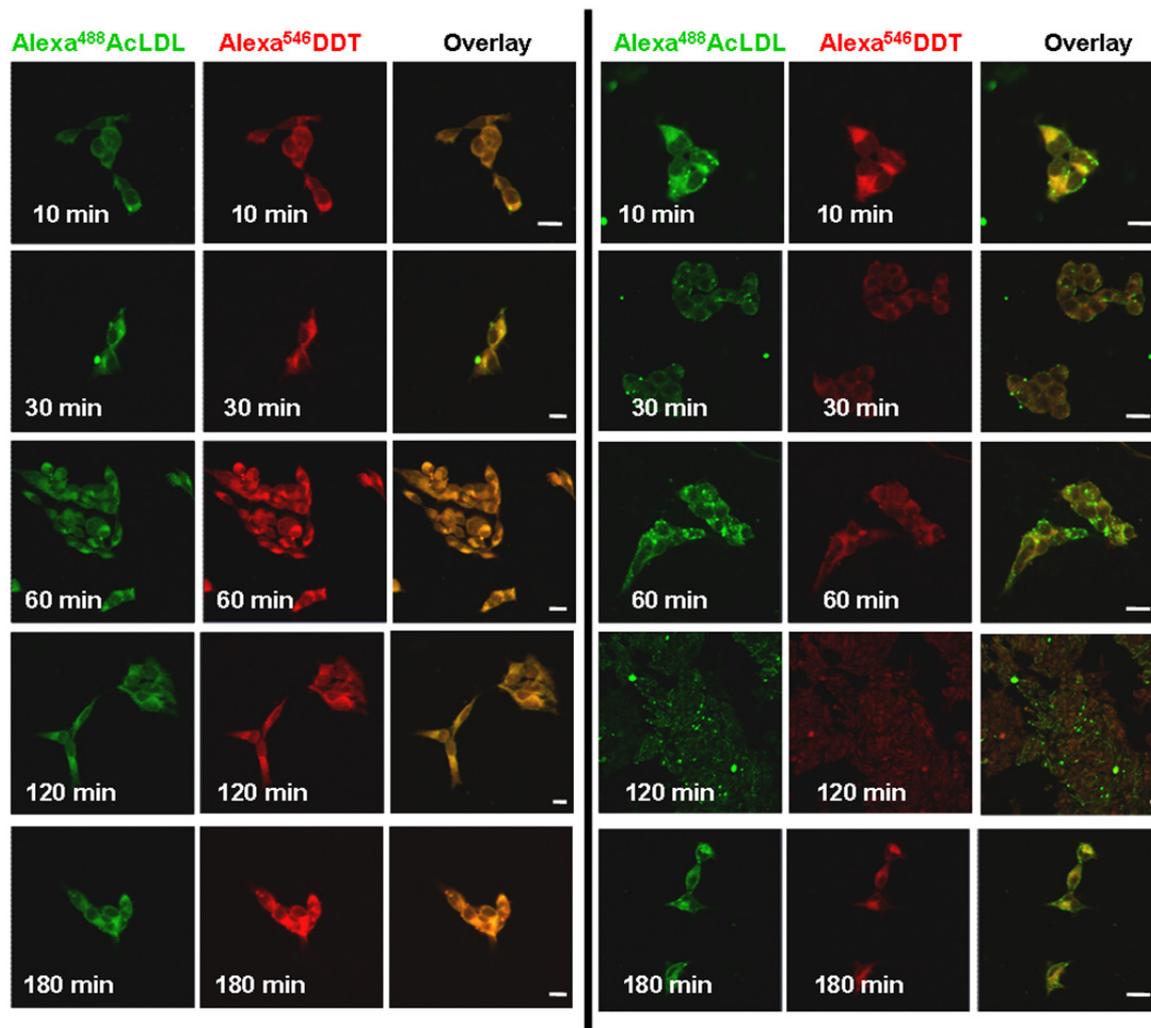
Bei genauerer Betrachtung der Fluoreszenzaufnahmen zur Analyse des Endozytoseverhaltens von D-DT und deren Vergleich mit entsprechenden Bildern von MIF kann jedoch ein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Anders als Alexa<sup>546</sup>-MIF, das nach seiner Endozytose in vesikelartigen punktförmigen Strukturen erscheint (siehe Abbildung 20, Abbildung 25, Abbildung 28), scheint Alexa<sup>546</sup>-D-DT nach seiner Endozytose eher flächig in der Zelle vorzuliegen (siehe Abbildung 61, Abbildung 62). Aus dieser Beobachtung resultierend könnte die vermeintliche Kolokalisation zwischen Rab5GFP, Rab7GFP bzw. LysoSensorGreen und Alexa<sup>546</sup>-D-DT aufgrund seines flächigen Vorkommens auch zufällig sein. Eine sichere, verlässliche Aussage kann zum derzeitigen Zeitpunkt, nicht zuletzt aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten (n=2) in nur einem Zelltyp, nicht getroffen werden.

Um dennoch die D-DT-Endozytose im Folgenden weiter zu untersuchen, wurden analog zur Aufklärung der MIF-Endozytose Kolokalisationsstudien zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL in HEK 293-Zellen durchgeführt.

#### 4.16 Partielle Kolokalisation von D-DT mit acetyliertem LDL

Nach 10- bis 180-minütiger Inkubation von HEK293-Zellen mit gemeinsam zugegebenem Alexa<sup>546</sup>-D-DT und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL zeigte sich in manchen Zellen eine Kolokalisation zwischen beiden Proteinen, in anderen nicht (Abbildung 64). Auch unterschied sich das Verhalten der Proteine untereinander von Experiment zu Experiment, weswegen an dieser

Stelle keine verlässliche Aussage bezüglich der Parallelität des D-DT-Endozytosewegs mit demjenigen von LDL oder auch von MIF getroffen werden kann.



**Abbildung 64: Partielle Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL.** HEK293-Zellen wurden auf Deckgläschen in 3-cm-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 min bei 4°C inkubiert. Alexa<sup>546</sup>-D-DT (1 µg/ml) wurde gleichzeitig mit Alexa<sup>488</sup>-AcLDL (5 µg/ml) zu jeder der 3-cm-Schalen gegeben. Nach der Zugabe wurden die HEK293-Zellen bei 4°C für 30 min inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und durch die gleiche Menge kaltes Medium ersetzt. Die Änderung der Inkubationstemperatur erfolgte unmittelbar nach Zugabe des kalten Mediums von 4°C auf 37°C, so dass die Internalisierung der fluoreszenzmarkierten Proteine für 10 bis 180 min erfolgen konnte. Nach den Waschschritten, der Fixierung der Zellen und der Montierung auf Objektträgern wurde die mikroskopische Analyse an einem LSM710 Konfokalmikroskop durchgeführt. Die Bildaufnahmen sind repräsentativ für die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Fluoreszenzbilder auf der linken Seite zeigen HEK293-Zellen mit Kolokalisation zwischen Alexa<sup>546</sup>-D-DT und Alexa<sup>488</sup>-AcLDL verdeutlicht durch die Gelbfärbung. Diejenigen Bilder auf der rechten Seite zeigen solche HEK293-Zellen mit keiner bis geringer Kolokalisation. *Scale bars:* 10 µm.

Zusammenfassend kann anhand der Ergebnisse aus den wenigen Pilotversuchen zum Endozytoseverhalten von D-DT geschlossen werden, dass es tendenziell eine Parallele zwischen der Internalisierung von MIF und D-DT geben könnte, deren tatsächliches Vorkommen jedoch durch weitergehende Versuche in Zukunft bestätigt und abgesichert werden müsste. Generell wäre es auch möglich, dass D-DT aufgrund seines flächigen Erscheinungsbildes nach seiner Aufnahme in die Zelle zunächst ins Cytoplasma gelangt und

---

erst später in den endolysosomalen Weg eintritt. Mit dieser Hypothese könnte sich das flächige Erscheinen im Gegensatz zu MIF durchaus erklären lassen.

## 5 Diskussion

MIF ist ein inflammatorisches Zytokin mit Chemokin-ähnlichen Eigenschaften, das eine entscheidende Rolle in akuten und chronischen Entzündungskrankheiten, Autoimmunität und Krebs spielt<sup>136</sup>. Die Wirkung von MIF auf seine Zielzelle wird durch die Rezeptoren CD74, CXCR2 und CXCR4, in Abhängigkeit ihres Expressionsverhaltens vermutlich entweder individuell, oder von mehreren miteinander initiiert<sup>114,181,332</sup>. Da die Rezeptoren erst kürzlich entdeckt wurden, ist der Mechanismus der MIF-Endozytose bislang nur geringfügig verstanden. Während erste Studien vermuten ließen, dass die Endozytose von MIF hauptsächlich über einen rezeptorunabhängigen Internalisierungsweg verlief<sup>315,316</sup>, deuteten spätere Studien auf einen kanonischen Rezeptor-vermittelten Endozytoseweg hin. Bislang ist jedoch nicht bekannt, um welchen der verschiedenen möglichen Internalisierungswege in Säugetierzellen es sich beim Endozytoseweg des Zytokins MIF handelt. Anfängliche Studien deuten auf eine Beteiligung von  $\beta$ -Arrestin-1 und CD74 hin und geben Hinweise darauf, dass eine Komplexbildung mit Thioredoxin förderlich sein könnte<sup>318,319</sup>.

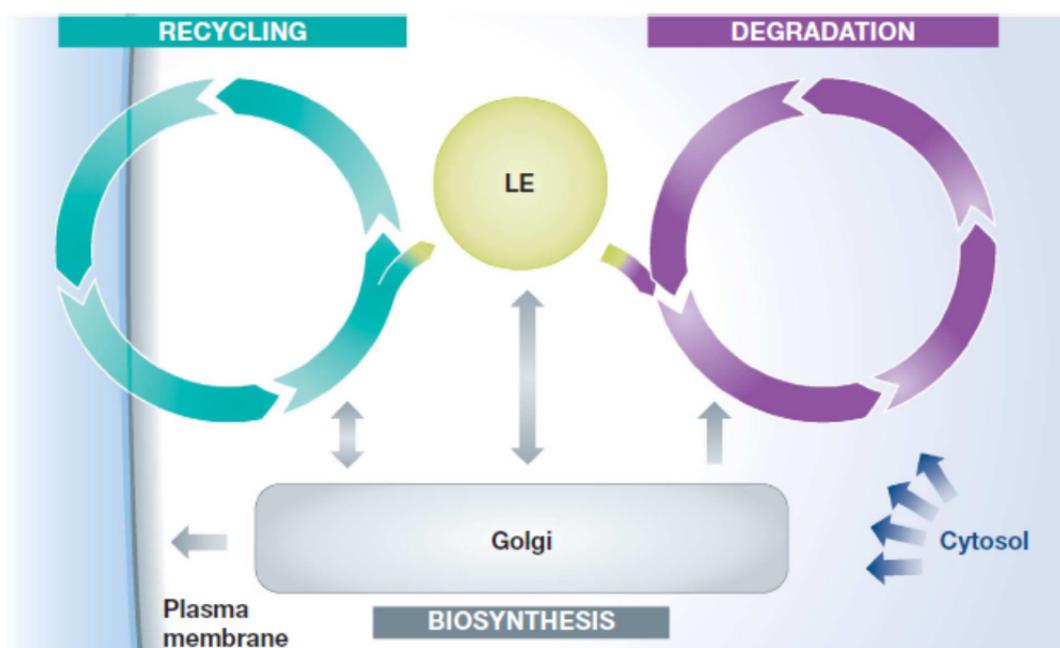
Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sollen im Folgenden vor dem Hintergrund vorhandener Literatur erläutert und interpretiert werden.

### 5.1 Zytokine wie MIF werden über einen Endozytosemechanismus in Zellen internalisiert

Das Interesse der Wissenschaft an der Aufklärung der Internalisierungswege verschiedenster Zytokinrezeptoren nimmt im Laufe der letzten Jahre stetig zu<sup>288</sup>. Die beiden Zytokine CXCL12/SDF-1 $\alpha$  und CXCL11 werden über einen Clathrin-vermittelten Endozytoseweg internalisiert und in Lysosomen abgebaut<sup>333</sup>. Für TNF- $\alpha$ , welches wichtige Funktionen in der Immunantwort und der Organogenese übernimmt, konnte eine endozytotische Aufnahme in Makrophagen und eine Lokalisierung in den Endosomen von Shurety *et al.* im Jahre 2001 nachgewiesen werden<sup>334</sup>. Das als Entzündungsmediator dienende Interleukin IL-1 $\alpha$  internalisiert in die murine Thymomazelllinie EL4 und akkumuliert anschließend in den Nuclei der Zellen<sup>335,336</sup>. Bereits 1985 wurde die Internalisierung von murinem IFN- $\beta$  in L929-Mausfibroblasten mit dem Ergebnis untersucht, dass IFN- $\beta$  bei Temperaturänderung der Zellen von 4°C auf 37°C in *coated pits* lokalisiert und über einen schnellen Rezeptor-vermittelten Endozytoseweg aufgenommen wird<sup>337</sup>. Auch der Endozytoseweg der beiden Wachstumsfaktoren IL-2 und CSF-1 zur Aufnahme in eine humane Tumor-T-Zelllinie und in CTLL-Zellen bzw. in murine Makrophagen konnte als Rezeptor-vermittelter Internalisierungsweg herausgearbeitet werden<sup>338-340</sup>. Die Internalisierung des Zytokins MIF, die erstmals von Kleemann *et al.* in den Jahren 2000 und 2002 postuliert wurde, konnte für MEF-, HEK293- und HeLa-Zellen durch seine Kolokalisation mit frühen und späten Endosomen bestätigt werden<sup>315,316</sup>.

## 5.2 Der Transportweg von MIF verläuft über die frühen, die späten Endosomen und die Lysosomen

Für die Internalisierung von Proteinen oder sonstigen Substanzen in Säugetierzellen gibt es generell verschiedenste mögliche Wege. Neben der Makro- oder Mikropinozytose und der Phagozytose, bei denen es sich bei beiden um Clathrin- und Caveolin-unabhängige Aufnahmewege handelt, die eher zur Aufnahme entweder von Flüssigkeiten, in Flüssigkeiten gelösten Partikeln oder von Bakterien, Zellbruchstücken oder parasitären Zellen dienen, gibt es im Wesentlichen zwei grundsätzlich unterschiedliche Endozytosemechanismen, nämlich die Clathrin-abhängige Endozytose und die Clathrin-unabhängige, Caveolin-abhängige Endozytose. Anhanddessen welche endosomalen Kompartimente ein Protein nach seiner Internalisierung passiert, kann festgestellt werden, ob das internalisierte Protein für den Abbau oder fürs Recycling bestimmt ist. Schlüsselkompartimente für den Degradationsweg sind die späten Endosomen und Lysosomen, während die *recycling endosomes* spezifisch für den *recycling*-Weg zurück zur Plasmamembran sind. Erst kürzlich berichteten Huotari und Helenius in ihrem Review „Endosome maturation“ über eine vereinfachte Darstellung des klassischen Endozytosewegs, die aus drei wesentlichen Elementen besteht, nämlich dem *recycling circuit* (Abbildung 65, links), dem *degradative system* (Abbildung 65, rechts) und einem Bindeelement in der Mitte, dem *unidirectional feeder pathway*. Die Funktion als sogenannter *feeder* wird von den späten Endosomen (LE) übernommen (Abbildung 65). Außerdem vermitteln die späten Endosomen den Transport lysosomaler Komponenten vom trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den Lysosomen. Auf diese Weise wird die Instandhaltung, Diversifikation und Erweiterung des *Recycling*- und Degradierungssystems gewährleistet. Auch das Zytosol gehört zu den essentiellen Elementen des vereinfachten Systems, da es für die Versorgung mit zeitweise assoziierten peripheren Membrankomponenten sorgt, die den Endozytoseweg unterstützen, regulieren und definieren <sup>341</sup>.



**Abbildung 65: Die Grundelemente der endozytotischen Machinerie.** Das Endozytosesystem besteht aus drei wesentlichen Elementen: dem *recycling circuit* (bestehend aus der Plasmamembran, den frühen Endosomen, den *recycling endosomes* und einer Reihe vesikulärer *carrier*), dem *degradation cycle* (bestehend aus den

Lysosomen) und einem beide miteinander verbindenden *feeder pathway* (bestehend aus den späten Endosomen (LE)) vom *recycling circuit* zum *degradative system*. Der hauptsächliche Interaktionspartner für die Versorgung mit lysosomalen Komponenten ist das zum Golgi-Apparat gehörende trans-Golgi-Netzwerk (TGN), das mit der Plasmamembran, den frühen Endosomen und den späten Endosomen in Kontakt steht. Der *recycling circuit* hat vom *degradative cycle* unabhängige Funktionen, während der *degradative cycle* eine „Einrichtung“ in der Zelle darstellt, die nicht nur dem Abbau von Substraten aus den Endosomen dient, sondern insgesamt dem Abbau in der Zelle dient. Das Zytosol übernimmt eine zentrale Rolle in der Versorgung aller Membrankompartimente mit peripheren Proteinen. Diese Proteine sind nötig für das molekulare *sorting*, Membranverschmelzung und -teilung und Organellmobilität. Entnommen aus <sup>341</sup>.

Außer für die Zytokine CXCL12 und CXCL11 <sup>333</sup> konnte auch für MIF ein degradativer Transportweg über die frühen und späten Endosomen und die Lysosomen verdeutlicht werden. Der einzige wirkliche Nachweis von MIF in Lysosomen erfolgte in der vorliegenden Dissertation in MEF-Zellen. Da die späten Endosomen jedoch als sogenannte *feeder* funktional zwischen dem *Recycling*- und dem Degradationsweg anzusiedeln sind und ihr Transport unidirektional in Richtung Lysosomen stattfindet, kann auch für die anderen untersuchten Zelllinien, HEK293- und HeLa-Zellen, aufgrund der Kollokalisierung mit den späten Endosomen von einem weiteren Transport von MIF zu den Lysosomen ausgegangen werden.

### 5.3 Der Endozytoseprozess von MIF erfolgt über einen Dynamin-abhängigen, Clathrin-vermittelten Endozytoseweg

Zur genauen Charakterisierung des Endozytosewegs von MIF und zur Analyse, ob dessen Internalisierung über einen Clathrin-vermittelten oder einen Clathrin-unabhängigen, Caveolin-abhängigen Endozytoseweg erfolgt, wurden Studien mit Alexa<sup>546</sup>-MIF unter Verwendung von für die Wege spezifischen Inhibitoren durchgeführt. Bei der Fluoreszenzmarkierung des humanen MIF wurde besonders darauf geachtet, dass sie unter nativen Bedingungen stattfand, sodass das fluoreszenzmarkierte MIF volle Bioaktivität zeigte und Endotoxin-frei war. Eine schnelle und effiziente Internalisierung von MIF wurde für einen relativ weiten Konzentrationsbereich an zugegebenem MIF zwischen 200 ng/ml und 5 µg/ml in verschiedensten Zelltypen u.a. in MEF-, HEK293- und HeLa-Zellen nachgewiesen. Auch Xie *et al.* und Kleemann *et al.* hatten bereits zuvor die Endozytose von MIF in RAW264.7 Makrophagen beobachtet <sup>316,319</sup>. Infolgedessen wurde insgesamt für diverse Zelltypen sowohl für Immunzellen, als auch für Nicht-Immunzellen die Endozytose von MIF verdeutlicht und eine mit diesem Vorgang einhergehende Auswirkung auf das MIF *signaling* vermutet. Nach erfolgreicher Internalisierung koloalisiert MIF sehr schnell mit endosomalen Markern. Dieser Vorgang fand unter verschiedenen Versuchsbedingungen, sowohl nach Zugabe von Alexa<sup>546</sup>-MIF unter physiologischen Bedingungen (37°C), als auch in Versuchen mit Temperaturänderung (4°C/ 37°C) statt und ergab sich sowohl aus der Analyse fixierter Zellen, als auch aus derjenigen aus *live imaging*- Experimenten. Eine Kollokalisierung mit dem späten endosomalen Marker Rab7 wurde erstmals 10 min nach MIF-Zugabe zu den Zellen beobachtet und konnte auch nach bis zu 160 min noch detektiert werden. Genauere Untersuchungen bezüglich des Endozytosewegs von MIF (Clathrin-vermittelt vs. Clathrin-unabhängig) erfolgten unter Verwendung der verschiedenen für die Endozytosewege spezifischen Inhibitoren. Trotz eines nicht bei allen Inhibitoren (MDC, CPZ, dominant-negatives Dynamin, Dynasore) einheitlichen inhibitorischen Effekts auf den

Endozytosemechanismus, nicht zuletzt aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Wirkmechanismen, und Unterschieden in der Blockierung der Internalisierung zwischen den verschiedenen Zelltypen konnten merkliche signifikante Inhibitionsraten (bis zu 62%) für die MIF-Endozytose verzeichnet werden, die eine Abhängigkeit des Endozytoseprozesses von Clathrin und Dynamin verdeutlichten. Die aus den Studien in Fibroblasten, HEK293-Zellen und HeLa-Zellen erlangte Schlussfolgerung, die MIF-Endozytose sei ein Dynamin- und Clathrin-abhängiger Prozess, geht mit derjenigen von Xie *et al.* konform, der eine Empfindlichkeit der MIF-Internalisierung gegenüber CPZ in RAW264.7 Makrophagen zeigte<sup>319</sup>. Zusätzlich zu den Beobachtungen von Xie *et al.* wird die Schlussfolgerung, dass es sich bei der MIF-Endozytose um einen Dynamin- und Clathrin-abhängigen Internalisierungsweg handelt, auch dadurch bestätigt, dass sich die Endozytose des in den Studien verwendeten Referenzproteins für die Clathrin-vermittelte Endozytose, LDL, in ähnlichem Maße durch die Inhibitoren MDC und Dynasore blockieren ließ.

#### **5.4 Clathrin-unabhängige Endozytosewege über Caveolae/ lipid rafts haben keinen Einfluss auf die MIF-Endozytose**

Um einen eventuellen zusätzlichen Einfluss der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege über Caveolae/lipid rafts auf die Endozytose von MIF auszuschließen, wurde in äquivalenten Studien mit Inhibitoren für diese Wege (Nystatin, Filipin) die Kolokalisation zwischen MIF und dem späten endosomalen Marker Rab7 analysiert. Die Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Daten resultierte in keiner signifikanten Inhibierung und konnte zusätzlich dadurch untermauert werden, dass MIF zu keiner Zeit mit dem Referenzprotein der Clathrin-unabhängigen Endozytosewege, Cholera toxin B, kolokalisierte.

#### **5.5 Der Transportweg von MIF ist abhängig von der Azidität der endolysosomalen Kompartimente und vom Mikrotubuli-System**

Der MIF-Transport entlang der endolysosomalen Kompartimente scheint die Intaktheit des Mikrotubuli-Systems, sowie eine funktionelle Ansäuerung der späten Endosomen vorauszusetzen, da es zu einer beträchtlichen Inhibierung des MIF-Transports infolge einer Behandlung mit dem Mikrotubuligift Nocodazol und des Inhibitors der Protonenpumpe Bafilomycin kam, die sich in einer Arretierung der MIF-Endozytose und einem daraus resultierenden unglaublichen Anschwellen der Endosomen äußerte.

Endosomen sind mobil und ihre Bewegungen korrelieren stark mit ihrem Reifungsgrad und ihrer Funktion. Während sich anfangs viele kleinere Endosomen im Randbereich einer Zelle befinden, werden diese später durch wenige größere Endosomen ersetzt, die dann in der Nähe des Nukleus lokalisiert sind. Diese zentripetale Bewegung wird durch Kinesin- und Dyneinmotorproteine entlang von Mikrotubuli vermittelt, deren Ursprung im Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) liegt<sup>341</sup>. Bei Zerstörung der Mikrotubuli beispielsweise durch das Mikrotubuligift Nocodazol wird der Reifungsprozess der Endosomen verzögert, weil die GTPase Rab5 zusammen mit Rab7 auf den Endosomen lokalisiert bleibt<sup>342</sup>. Während ein inhibitorischer Effekt bezüglich der anfänglichen Ansäuerung (~ pH 6,0) ausbleibt<sup>343</sup>, hat die Verzögerung eine Inhibition des Transports der internalisierten „Fracht“ zu Kompartimenten

mit niedrigerem pH ( $\sim$  pH 5,0), wie er beispielsweise in reifen späten Endosomen und Lysosomen vorliegt, zur Folge<sup>311</sup>. Auch der Abbau im Lysosom wird durch Nocodazol verzögert<sup>343</sup>. All diese Erkenntnisse begründen sowohl die Arretierung des Transports des internalisierten Zytokins MIF, als auch das scheinbare Anschwellen der Rab7-enthaltenden Endosomen. Durch den verzögerten Reifungsprozess von frühen zu späten Endosomen enthalten die Endosomen im Übergangszustand zwischen frühem und spätem Endosom beide GTPasen Rab5 und Rab7 und schwellen durch die fortwährende Internalisierung bei gleichzeitigem verlangsamten Abbau von internalisiertem MIF in den Lysosomen scheinbar an.

Während in die Mobilität der frühen Endosomen nur Kinesine z.B. das Kinesin-3 Motorprotein KIF16B involviert sind, scheint die Mobilität der späten Endosomen sowohl von den Kinesinen, als auch vom *minus-end-directed* Dynein-abhängigen Transport abhängig zu sein<sup>344-346</sup>. Neuere Studien widersprechen jedoch der Sichtweise, dass Dynein als Hauptmotorprotein des Transports von späten Endosomen zum Minusende der Mikrotubuli dient und favorisieren eine indirekte Rolle des Dyneins in der Regulation des Aktinzytoskeletts<sup>347</sup>. Tatsächlich scheint das Aktinzytoskelett auch in den degradativen Endozytoseweg involviert zu sein, womit eine bereits lang bekannte Blockierung des Transports zwischen frühen und späten Endosomen nach dessen Zerstörung auch erklärt werden könnte<sup>348</sup>. Eine weitere Funktion des Aktinzytoskeletts besteht in seiner Beteiligung u.a. an der Fusion zwischen späten Endosomen und Lysosomen<sup>349</sup>, wodurch sich auch die Arretierung der MIF-Internalisierung begründen ließe. In Anlehnung an die Erkenntnisse von Lakadamyali *et al.*, dass es zwei verschiedene Populationen früher Endosomen in den Zellen gibt, die sich in ihrer Reifungsdauer zu späten Endosomen unterscheiden und von denen sich die eine Population durch eine schnelle Reifung und eine hohe Mobilität entlang der Mikrotubuli (dynamische Population) auszeichnet, während die andere langsamer reift und eher statisch ist<sup>11</sup>, lässt die Abhängigkeit des MIF-Transports von der Funktionalität des Mikrotubuli-Systems auf einen vorwiegenden Transport von MIF durch die dynamische frühe endosomale Population schließen.

Auch die Inhibierung der Ansäuerung der Endosomen nach Behandlung der Zellen mit Bafilomycin bewirkte eine deutliche Beeinträchtigung der MIF-Endozytose. Bafilomycine wirken wie auch Concanamycine als starke Inhibitoren der v-ATPasen, indem sie zu einem schnellen Anstieg des pH-Werts in sauren Organellen der Zelle führen<sup>350</sup>. Zusätzlich zur Verhinderung der Ansäuerung der Endosomen wird durch Bafilomycin der Transport internalisierter Proteine von den frühen Endosomen zu den späten Endosomen blockiert, so dass von einem Defekt bezüglich der Endosomenreifung ausgegangen werden muss<sup>311,351-353</sup>. Dieser Effekt scheint zelltypabhängig zu sein, da zumindest in einer Arbeit eine Blockierung der Fusion von späten Endosomen mit Lysosomen beschrieben wurde<sup>354</sup>. Auch die Abspaltung der reifen späten Endosomen von den frühen Endosomen benötigt einen niedrigen luminalen pH-Wert<sup>355</sup>. Die direkte inhibitorische Wirkung von Bafilomycin auf die v-ATPasen verhindert zusätzlich die Bildung später Endosomen<sup>351</sup>. Daraus schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass durch Bafilomycin der endolysosomale Transportweg scheinbar an verschiedensten Übergängen zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten beeinträchtigt werden kann. Normalerweise liegt der pH-Wert früher Endosomen zwischen 6,8 und 6,1, bei späten Endosomen liegt er zwischen 6,0 und 4,8 und in Lysosomen bei um

4,5<sup>356</sup>. Der niedrige pH-Wert ist nicht nur essentiell für die Funktion hydrolytischer Enzyme, sondern wird auch fürs *membrane trafficking*, für die Sortierung und Einordnung der internalisierten „Fracht“ in ihren weiteren Transportweg, sowie für Vorgänge wie z.B. die Inaktivierung internalisierter Pathogene benötigt. Die Tatsache, dass der pH-Wert nach Bildung der späten Endosomen bis zur Fusionierung mit einem Lysosom absinkt, kann u.a. dadurch erklärt werden, dass die Protonenpumpen in der Membran (v-ATPasen) hauptsächlich in den vakuolären Domänen der frühen Endosomen lokalisiert sind und sich ihr Vorkommen in den späten Endosomen somit nach der Fusionierung konzentriert<sup>357</sup>. Nach erfolgreicher Ansäuerung ist ein Transport der internalisierten „Fracht“ in die Lysosomen und ihr dortiger Abbau vorgesehen.

## 5.6 Der MIF-Endozytoseweg weist Parallelen mit demjenigen von LDL auf

Für die verschiedenen endozytotischen Unterwege in Säugetierzellen sind Referenzproteine oder –toxine bekannt. Die klassische Clathrin-vermittelte Endozytose, die schließlich mit dem Abbau des internalisierten Ligandens in den Lysosomen endet, wird gut durch die Endozytose von LDL repräsentiert. Im Gegensatz dazu, verläuft die Internalisierung von Transferrin zwar auch Clathrin-assoziiert, führt jedoch nach der Endozytose zu einem baldigen *recycling* des Liganden zurück zur Plasmamembran. Die Aufnahme des Bakterientoxins Cholera toxin B hingegen verläuft über einen Clathrin-unabhängigen Weg über Caveolae oder *lipid rafts* Strukturen. Am meisten gleicht der MIF-Endozytoseweg demjenigen von LDL. Mit Transferrin kolokalisierte MIF nur zu frühen Zeiten des Endozytoseprozesses, aber nicht mehr danach, was darauf schlussfolgern lässt, dass sich MIF mit Transferrin nur den Weg über die endosomalen Vesikel bis zum frühen, *sorting endosome* teilt, aber nicht wie Transferrin über *recycling endosomes* zur Plasmamembran zurücktransportiert wird<sup>3,16,17</sup>. Eine mögliche Aufnahme von MIF über einen Caveolin-abhängigen Endozytoseweg konnte ausgeschlossen werden, da weder eine Kolokalisation mit Cholera toxin B, noch eine signifikante Inhibierung der MIF-Endozytose durch die beiden Inhibitoren Nystatin und Filipin beobachtet werden konnte. Die Strategie sich dem Endozytoseweg eines Zielproteins durch Kolokalisationsstudien mit Referenzproteinen wie beispielsweise Transferrin, LDL oder Cholera toxin B schrittweise anzunähern und damit Ergebnisse aus Kolokalisationsstudien mit endolysosomalen Markern zu bestätigen oder *vice versa* liefert zuverlässige Erkenntnisse und wurde u.a. auch zur Aufklärung des Endozytosewegs von Amyloid  $\beta$ -Protein verwendet, welches in amyloiden Plaques bei Patienten zu finden ist, die an der am häufigsten vorkommenden Form altersbedingter Demenz, Alzheimer, leiden<sup>358,359</sup>.

## 5.7 CD74 fördert die MIF-Endozytose, aber auch CXCR4 ist in den Internalisierungsvorgang involviert

Obwohl die Rezeptormechanismen über die MIF seine Zielzellen aktiviert, lange Zeit unklar waren, ist heutzutage bekannt, dass MIF seine Wirkung in Abhängigkeit von der Zielzelle und dem inflammatorischen Zusammenhang über die drei Rezeptoren CD74, CXCR2 und CXCR4 ausüben kann. Bei CD74 handelt es sich um die membranständige Form der MHC

Klasse-II invarianten Kette<sup>118</sup>. CXCR2 ist ein bekannter Rezeptor für die ELR+ CXC Chemokine wie beispielsweise CXCL8<sup>112</sup> und CXCR4 ist der bekannte Rezeptor für SDF-1 $\alpha$ /CXCL12<sup>112</sup>. Aufgrund seiner geringen Verweildauer auf der Plasmamembran und seinen schnellen Recyclingzyklen<sup>227</sup> war CD74 ein guter möglicher Kandidat zur Initiierung der MIF-Endozytose. Auch CXCR4 kam bereits zu Beginn der Endozytosestudien aufgrund seiner ubiquitären Expression auf verschiedensten Zelltypen als Mediator der MIF-Internalisierung in Frage.

Mehrere Studien innerhalb der vorliegenden Arbeit suggerieren, dass beide Rezeptoren, CD74 und CXCR4, zur Endozytose des Zytokins MIF beitragen. Die ektopische Überexpression des in HEK293- und HeLa-Zellen endogen nicht exprimierten CD74 führte zu einer beachtlichen Beschleunigung der Internalisierung von MIF innerhalb früher Zeitpunkte des Endozytosemechanismus mit einem deutlichen Höhepunkt nach 10-16 min. Jedoch kann MIF auch in Abwesenheit von CD74 internalisiert werden. Auf dieser Erkenntnis beruhend gab es vermutlich noch einen weiteren Rezeptor, der in den Endozytoseprozess involviert war. Da HEK293- und HeLa-Zellen endogen moderate Mengen an CXCR4 exprimieren, entstand die Annahme, dass die CD74-unabhängige Endozytose von MIF über CXCR4 vermittelt wurde. Interessant ist in diesem Zusammenhang allerdings, dass Xie et al. in ihren Studien keine Endozytose von MIF in CD74-defizienten COS-7-Zellen beobachteten. Eine mögliche Begründung hierfür könnte sein, dass es sich bei COS-7-Zellen um aus dem Affen stammende Zellen handelt, die keinesfalls humanes CXCR4 exprimieren<sup>319</sup>. Die Bedeutung von CXCR4 für die MIF-Endozytose konnte zusätzlich auch durch aus konfokalen mikroskopischen Studien in HEK293-Zellen stammenden Daten untermauert werden, die eine markante Kollokalisierung zwischen exogen zugegebenem Alexa<sup>546</sup>-MIF und transient exprimiertem YFP-CD74 und CFP-CXCR4 zeigten. Experimente mit dem CXCR4-spezifischen Inhibitor AMD3100 bestätigten zusätzlich die Rolle von CXCR4 für die MIF-Endozytose, da die Blockierung des CXCR4-Rezeptors durch AMD3100 eine 40%-ige Reduzierung der Kollokalisierung zwischen MIF und dem späten endosomalen Marker Rab7 zur Folge hatte.

## 5.8 CD74 und CXCR4 können funktionale heteromere Rezeptorkomplexe bilden

Da beide Rezeptoren CD74 und CXCR4 in den Vorgang der MIF-Endozytose involviert zu sein scheinen und aufgrund der Kenntnis über eine mögliche Bildung heteromerer Rezeptorkomplexe zwischen CD74 und dem G-Proteingekoppelten Rezeptor (GPCR) CXCR2<sup>112</sup>, entstand die Idee dazu, dass CD74 möglicherweise auch mit dem zweiten GPCR CXCR4 heteromere Komplexe bilden könnte.

Der Grundgedanke zu einer möglichen Existenz heteromerer CD74/CXCR-Rezeptorkomplexe resultierte damals aus den Erkenntnissen darüber, dass in Inhibierungsexperimenten mit Antikörpern in atherogenen Arterien eine Rekrutierung atherogener Leukozyten durch MIF von CD74 und einem *Crosstalk* zwischen den MIF/CD74- und den MIF/CXCR2- oder den MIF/CXCR4-induzierten Signalwegen abhängig war<sup>112</sup>. MIF aktiviert über seine Interaktion mit CD74 den ERK1/2-MAPK- und den

PI3K/AKT-Signaltransduktionsweg und reguliert somit Zellproliferation und *survival*<sup>118,231,239,360</sup>, während seine Interaktion mit CXCR2 oder CXCR4 die Rekrutierung atherogener Monozyten und von Neutrophilen bzw. die T-Zell-Rekrutierung, sowie die Aktivierung von G<sub>i</sub>-Protein-, PI3K-, Calcium- oder Integrin-vermittelter Signaltransduktion initiiert werden<sup>112,114,173,360</sup>. Anhand von Rezeptorbindungsstudien zeigte sich, dass MIF an jedem der Rezeptoren CD74, CXCR2 und CXCR4 einzeln mit hoher Affinität binden kann und diese Fähigkeit keiner Koexpression eines weiteren Rezeptors bedarf. Allerdings steigerte eine Koexpression von CD74 mit CXCR2 oder CXCR4, wie sie in Monozyten vorkommt, die durch MIF-initiierten Zellantworten<sup>112</sup>, was auf die Existenz heteromerer Rezeptorkomplexe zurückführbar sein könnte.

Der Nachweis der heteromeren CD74/CXCR2-Rezeptorkomplexe wurde damals nach Überexpression von CD74 und CXCR2 und unter semi-endogenen Expressionsbedingungen erbracht<sup>112</sup>. Die Existenz und Funktionalität von CD74/CXCR4-Rezeptorkomplexen wurde in der vorliegenden Dissertation ebenfalls durch Überexpression beider Rezeptoren als getaggte Rezeptorfusionsproteine und anschließender IP-Western-Analyse erbracht. Zusätzlich konnte in Monozyten und T-Zellen nachgewiesen werden, dass auch unter endogenen Bedingungen CD74 und CXCR4 Komplexe miteinander eingehen können. Eine funktionelle Rolle der Komplexbildung konnte dadurch verdeutlicht werden, dass die MIF-vermittelte CD74-abhängige AKT-Aktivierung in T-Zellen sowohl durch Zugabe des CXCR4-spezifischen Inhibitors AMD3100, als auch durch neutralisierende CD74- oder CXCR4-Antikörper blockiert werden konnte<sup>117</sup>. Das Zusammenspiel von CD74 und CXCR4 hinsichtlich der Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden konnte außer für AKT auch für JNK in Jurkat T-Zellen gezeigt werden<sup>241</sup>.

Anhand konfokalmikroskopischer Aufnahmen von HEK293-Zellen konnte bestätigt werden, dass ein Teil der CD74- und CXCR4-Moleküle als heteromere Komplexe vorliegt. Da CD74 normalerweise schnellen *Recycling*zyklen unterworfen ist und Ii-Moleküle meist nur dann zur Plasmamembran gelangen, wenn sie im Golgi-Apparat und endolysosomalen Kompartiment gegenüber den Klasse II-Molekülen überschüssig vorliegen, konnte der Anteil an membranständigen CD74/CXCR4-Rezeptorkomplexen durch Überexpression der CD74-Variante ohne ER-Retentionssignal (CD74<sup>minRTS</sup>) erhöht werden.

Obwohl Interaktionen zwischen Chemokin/GPCR und Rezeptoren mit nur einer Transmembrandomäne zunächst ungewöhnlich erschienen, so sind sie heutzutage kein Einzelfall mehr. Zusätzlich zur CD74/CXCR2-Interaktion, gibt es vielerlei weitere Berichte über einen vermutlichen *Crosstalk* hinsichtlich der Signaltransduktion zwischen GPCRs und Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK)<sup>361,362</sup>. Interessanterweise wurde auch bereits über einen *Crosstalk* zwischen CXCR4 und einer RTK berichtet<sup>363</sup>. Für CD74 konnte umgekehrt eine direkte Interaktion mit dem typischen GPCR Angiotensin II Typ I-Rezeptor (AGTR1) nachgewiesen werden<sup>364</sup>. Die Bindestelle für die Interaktion mit CD74 liegt innerhalb des C-Terminus des AGTR1 und wurde bereits als wichtige Stelle für die Ausschleusung von AGTR1 aus dem ER entdeckt und ist zudem hoch konserviert in vielen GPCRs<sup>364</sup>. Daher liegt die Vermutung nahe, sie könne auch als Bindestelle zwischen CXCR4 und CD74 fungieren.

Die in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse zu CD74/CXCR4-Rezeptorkomplexen können zum bislang wenig erforschten Gebiet über mögliche Funktionen oligomerer CXC- oder CC-

Rezeptorkomplexe<sup>365</sup> und zum Verständnis der Funktionalität homo- und heteromerer Chemokinrezeptoroligomerisierungen zukünftig beitragen.

Zusätzlich wird durch die Identifizierung der CD74/CXCR4-Interaktion das begrenzte Sortiment an Interaktionspartnern von CD74 oder CXCR4 erweitert. Bisher konnte nur für HLA-DR, CD44, AGTR1 und MIF eine Bindung an CD74 nachgewiesen werden<sup>118,364,366,367</sup>.

Auch die Liste der Proteine, die an CXCR4 binden, ist begrenzt und beinhaltet neben CXCL12<sup>368,369</sup> nur MIF<sup>112,247</sup> und HIVgp120<sup>368</sup>.

Bezüglich der Initiation von Signaltransduktionskaskaden werden zukünftig wichtige Fragen zu klären sein. Eine davon betrifft beispielsweise die Interaktion von CD74 mit seinem häufig als signalübertragenden Korezeptor bezeichneten Glykoprotein CD44, welches als Initiator für durch die Bindung von MIF an CD74 induzierte Signalkaskaden dient<sup>231,367</sup>. In dieser Hinsicht wird interessant sein, zu analysieren, ob CD44 ebenfalls zum CD74/CXCR4-Rezeptorkomplex gehört oder es zumindest zu ihm rekrutiert werden kann<sup>231,239</sup>. Des Weiteren könnte in diesem Zusammenhang über die Existenz heterotrimerer CXCR2/CD74/CXCR4- oder sogar über heterotetramere CXCR2/CD74/CXCR4/CD44-Komplexe spekuliert werden. Bezüglich der CD74/CXCR4-Rezeptorkomplexe ist auch noch unklar, ob sie bereits vorgefertigt vorliegen oder erst als Konsequenz einer Ligandenaktivierung gebildet werden. Nach heutigem Wissensstand besteht zusätzlich zur direkten bilateralen Interaktion von CD74 und CXCR4 auch noch die Möglichkeit, dass sich beide nur in einer gemeinsamen Membrandomäne oder einem *lipid raft* befinden oder Teil eines größeren Komplexes sind<sup>332</sup>. Um diese Möglichkeiten ausschließen zu können, müssten weitere Analysen wie z.B. BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*)- oder FRET (*fluorescence resonance energy transfer*)-Studien folgen. Eine weitere offene Frage besteht darin, ob SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 an CD74/CXCR4-Komplexe binden kann. Die Resultate aus den AKT-Aktivierungsexperimenten argumentierten eher gegen eine derartige Möglichkeit, da die CXCL12-vermittelte AKT-Phosphorylierung zwar durch neutralisierende CXCR4-Antikörper inhibiert werden konnte, aber entsprechende CD74-Antikörper kaum zu einer Inhibierung führten. Erste Hinweise bezüglich einer möglichen funktionellen Interaktion zwischen CD74 und CXCR4 wurden interessanterweise bereits 2009 von Marsh *et al.* erlangt, die eine Koexpression von CD74 und CXCR4 in Typ II alveolaren Epithelzellen fanden, aber die Möglichkeit einer direkten funktionellen Interaktion nicht näher untersuchten<sup>370</sup>.

Hinsichtlich einer möglichen funktionellen Aufgabe von heteromeren CD74/CXCR4-Rezeptorkomplexen muss berücksichtigt werden, dass der Anteil funktioneller auf der Zelloberfläche existierender CD74/CXCR4-Komplexe am Gesamtpool exprimierter Rezeptoren einer Zelle vermutlich nur gering sein wird, da CD74 auf den meisten MHC Klasse II-positiven Zellen nur zu einem geringen Anteil an der Zelloberfläche exprimiert wird und der Chemokinrezeptor CXCR4 vorwiegend intrazellulär exprimiert wird. Im Falle einer Entzündung könnte sich diese Verteilung jedoch zugunsten von membranständigen CD74/CXCR4-Rezeptorkomplexen ändern und wichtige Aufgaben hinsichtlich der Aktivierung wichtiger Signalkaskaden übernehmen. Nicht nur über CD74 werden verschiedenste bedeutsame Funktionen des inflammatorischen Zytokins MIF vermittelt, sondern auch über die CXCL12/CXCR4-Achse werden wichtige Schlüsselprozesse wie z.B. das T-Zell-*trafficking* bei einer Entzündung und Immunisierung<sup>275,371,372</sup>, die Tumorzellinvasion, Metastasierung<sup>373</sup> und das Stammzell-Homing<sup>374</sup> induziert, von denen

einige Funktionen auch von MIF induziert werden können<sup>112</sup>. Trotz ihrer gemeinsamen Funktionen können MIF und CXCL12 auch entgegengesetzte Wirkungen wie beispielsweise bei der atherogenen T-Zell-Rekrutierung erzielen<sup>112</sup>.

Außer der Aufschlüsselung der molekularen Details bezüglich der CD74/CXCR4-Komplexbildung und der Stöchiometrie könnten sich die CD74/CXCR4-Komplexe zukünftig als wichtige Komponente zur Spezifizierung der MIF- und CXCL12-induzierten Wirkungen herausstellen.

### 5.9 Die MIF-induzierte AKT-Aktivierung wird zelltypabhängig partiell über *endosomal signaling* initiiert

Eine Charakterisierung der über die MIF-Rezeptoren induzierten Signaltransduktionswege ergab eine Abhängigkeit der Aktivierung der ERK1/2- und/oder JNK-Signalwege, sowie des PI3K/AKT-Signalwegs von CD74 und/oder einem der beiden CXC-Rezeptoren. Infolge einer MIF-Stimulation kam es sowohl zu einer schnellen transienten, als auch zu einer anhaltenden *sustained* Aktivierung der Signalwege<sup>118,194,238,241</sup>. Eine funktionelle Interaktion von CD74 und CXCR4 konnte bereits fürs JNK-Signaling gezeigt werden<sup>241</sup> und spielt auch für die Aktivierung des AKT-Signalwegs eine Rolle<sup>117</sup>. Obwohl sich mittlerweile Hinweise häufen, die auf eine Beteiligung der beiden Rezeptoren CD74 und CXCR4 bezüglich der Aktivierung verschiedenster durch MIF-induzierter Signalwege hindeuten, ist bislang nur wenig über mögliche Abschaltungsmechanismen der Signalwege bekannt, die häufig im Zusammenhang mit einer  $\beta$ -Arrestin-Aktivierung und der Endozytose von Ligand/Rezeptorkomplexen stehen. In Studien zur MIF-induzierten ERK-Aktivierung in CD74- und CD44-Transfektanten und Mutanten dieser Rezeptoren konnte von Shi *et al.* im Jahre 2006 erstmals ein möglicher Abschaltungsmechanismus eines Signalwegs verdeutlicht werden. Eine durch MIF-induzierte Serinphosphorylierung innerhalb der intrazytoplasmatischen Domäne von CD74 führte in Abhängigkeit von CD44 und der Proteinkinase A (PKA) zu einer Abschwächung des ERK-Signaling<sup>231</sup>. Obwohl die Serinphosphorylierung an CD74 in Bezug auf die durch MIF-bewirkte Fähigkeit zum Signaling in dieser Arbeit nicht weiter thematisiert wurde, scheint dies das erste Indiz hinsichtlich eines Inaktivierungsmechanismus fürs MIF-Signaling zu sein. Eine eventuelle Korrelation zwischen einem Abschaltungsmechanismus von Signalwegen und der Endozytose von MIF wurde erst kürzlich von Xie *et al.* untersucht. In seinen Studien zur MIF-induzierten anhaltenden *sustained* ERK-Aktivierung erlangte er Hinweise darauf, dass das Adaptorprotein  $\beta$ -Arrestin-1 nach MIF-Stimulation mit CD74 interagiert und dies mit einer CPZ-sensitiven Endozytose von MIF und einer Reduktion des anhaltenden ERK-Signaling einherging. Aus dieser Erkenntnis heraus, scheint  $\beta$ -Arrestin-1 als Bindeglied zwischen MIF-Endozytose und Aktivierung des ERK-Signalwegs zu fungieren<sup>319</sup>. Für seine Rolle bezüglich der Desensibilisierung von GPCRs, die mit der Internalisierung des Rezeptors und einer damit verbundenen Herabregulierung der Signaltransduktion einhergeht, ist  $\beta$ -Arrestin bereits bestens bekannt. Zusätzlich zu ihrer Fähigkeit, die sterische Bindung zwischen Agonist-aktivierten GPCRs zu erschweren und damit ihre Desensibilisierung einzuleiten, nach der die  $\beta$ -Arrestine ihre Bezeichnung erhielten, können sie auch Signalkaskaden unabhängig von einer G-Proteinaktivierung initiieren, indem sie als sogenannte *scaffolds* bestimmte Elemente spezifischer Signalwege in räumliche Nähe

zueinander bringen<sup>375</sup>. Auch für CXCR4 ist eine Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin bekannt, die zur Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors führt. Ob allerdings oben beschriebene Mechanismen von  $\beta$ -Arrestin auch auf die MIF-induzierte CXCR4-Aktivierung zutreffen oder ob  $\beta$ -Arrestin eine mechanistische Verbindung zwischen der MIF-Endozytose und der Aktivierung der durch MIF-initiierten AKT- und JNK-Signalwege bildet, ist bislang unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduzierung bezüglich des Gehalts an phosphoryliertem AKT infolge der durch MIF-induzierten AKT-Aktivierung bei Verwendung von Endozytoseinhibitoren wie z.B. CPZ im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden. In Abhängigkeit des Vorhandenseins der in die AKT-Aktivierung involvierten Rezeptoren CD74 und CXCR4 auf der Zelloberfläche der verwendeten Zelllinien zeigte sich eine signifikante Inhibition in Jurkat T-Zellen, die beide Rezeptoren exprimieren, während in HeLa-Zellen, die nur CXCR4, aber kein CD74 exprimieren, nur ein Trend zu erkennen war. Demzufolge muss von einer zumindest teilweise auf Signale aus dem Endosom (*endosomal signaling*) zurückführbare MIF-vermittelte Aktivierung des AKT-Signalwegs ausgegangen werden, die wahrscheinlich auch auf funktionelle CD74/CXCR4-Komplexe angewiesen ist<sup>117</sup>. Eine weitere mögliche Erklärung dafür, dass der Einsatz von Endozytoseinhibitoren in CD74-defizienten HeLa-Zellen zu keiner signifikanten Inhibition des AKT-Signalwegs führt, könnte auch darin begründet liegen, dass durch CXCR4 eine AKT-Aktivierung über Signale von der Plasmamembran begünstigt wird, während CD74 *endosomal signaling* fördert. Anhanddessen, dass die MIF-induzierte Aktivierung des AKT-Signalwegs in humanen Dermalfibroblasten, die beide Rezeptoren nur in geringem Maße exprimieren, ebenfalls durch Endozytoseinhibitoren nicht signifikant inhibiert werden kann, zeigt sich eine zusätzliche Abhängigkeit des Verhältnisses zwischen plasmamembran-initiiertes und endosomales Aktivierung von MIF-induzierten Signalwegen vom betrachteten Zelltypen.

CD74 ist ein nur einmal die Membran durchspannendes Typ II-Glykoprotein, welches schnellen *Recycling*zyklen mit einem Verbleib der einzelnen Moleküle von nur 3-4 min an der Plasmamembran unterliegt<sup>227</sup>. Nicht zuletzt aus diesem Grund und da es *human leukocyte antigen* (HLA)-DR-Moleküle zu subzellulären endozytotischen Kompartimenten bringt und auch selbst dort prozessiert wird, gilt CD74 als guter Kandidat zur Vermittlung der AKT-Aktivierung über Signale aus dem Endosom (*endosomal signaling*). In MHC Klasse-II-positiven Zellen wird CD74 größtenteils im endolysosomalen Kompartiment exprimiert. Für mit HLA-DR-komplexiertes CD74 konnte durch Moldenhauer *et al.* eine Kolokalisation mit den frühen Endosomen veranschaulicht werden. Außerdem zeigten sie, dass CD74, das erst im ER-Lumen mit den MHC Klasse-II- $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten assoziiert, den Transport der Klasse-II-Moleküle zu späten Endosomen und Lysosomen veranlasst<sup>376</sup>. Eine Kolokalisation von transient in HEK293-Zellen überexprimiertem CD74minRTS mit den Lysosomen konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit verdeutlicht werden. Aufgabe zukünftiger Studien wird sein, Proteine zu identifizieren, die den Transport von CD74 in Abwesenheit von MHC Klasse-II-Molekülen ins endosomale Kompartiment fördern.

Eine direkte Interaktion von CD74 und CXCR4 mit  $\beta$ -Arrestin wurde bereits gezeigt<sup>319,377</sup>. Außer den beiden bereits eingangs genannten Funktionen von  $\beta$ -Arrestinen als negative Regulatoren der GPCRs und als *scaffold proteins* für Mitglieder der SRC-Familie, fördern  $\beta$ -Arrestine das *Signaling* von Rezeptoren nach der Endozytose. Die Bindestelle des  $\beta$ -Arrestins

an den Rezeptor ist dabei ausschlaggebend für seine Funktion. Während eine Bindung von  $\beta$ -Arrestin an den C-Terminus des Chemokinrezeptors dessen Internalisierung und Desensibilisierung bewirkt, fördert eine Interaktion mit den intrazellulären *loops*  $\beta$ -Arrestin-vermitteltes *Signaling*<sup>288</sup>. Als direkte Bindestelle zwischen CXCR4 und  $\beta$ -Arrestin konnte das SHSK-Motiv im dritten intrazellulären *loop* von CXCR4 herausgestellt werden<sup>378</sup>. Demnach sollte  $\beta$ -Arrestin bei Bindung an CXCR4 eine Initiierung des  $\beta$ -Arrestin-vermittelten *Signalings* bewirken. Für CD74 ist das genaue Bindemotiv an  $\beta$ -Arrestin bislang nicht bekannt, obwohl das innerhalb der zytoplasmatischen Sequenz von CD74 liegende LIxxxPML-Motiv bereits als Erkennungsmotiv für die beiden Clathrinadaptoren AP1 und AP2 identifiziert wurde<sup>28</sup>.

Der CXCR4-Internalisierungsweg ist mittlerweile weitestgehend aufgeschlüsselt. CXCR4 wird über einen Clathrin-vermittelten Endozytoseweg<sup>329</sup> aufgenommen und kann sowohl konstitutiv, als auch in Abhängigkeit eines Liganden internalisiert werden<sup>379</sup>. Der Transport von CXCR4 zu den Lysosomen ist Rab7-abhängig und kann durch längere Ligandeneinwirkung gefördert werden<sup>380,381</sup>. Bei konstitutiver Internalisierung von CXCR4 wird dieses immer wieder über *recycling endosomes* zur Plasmamembran zurück befördert<sup>380</sup>.

Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse über den MIF-Endozytoseweg passen demnach sehr gut mit dem derzeitigen Wissensstand über die Endozytosemechanismen von CD74 und CXCR4 zusammen. Obwohl für viele Chemokinrezeptoren eine Inhibierung ihrer Endozytose mit einer Abnahme der Aktivierung von Signaltransduktionswegen einherging, konnte für CXCR4-Mutanten, die nicht mehr zur Internalisierung fähig waren, dennoch eine Fähigkeit, Signalkaskaden zu initiieren und eine Interaktion mit  $\beta$ -Arrestin nachgewiesen werden<sup>377</sup>. Die verbleibende AKT-Aktivierung durch MIF in CD74-negativen, CPZ-behandelten Zellen könnte daher tatsächlich durch über CXCR4 auf der Plasmamembran vermittelte Signale bewirkt worden sein. Das Ziel zukünftiger mechanistischer Studien wird u.a. aus der Identifizierung der in die MIF-vermittelte AKT-Aktivierung involvierten Faktoren, wie beispielsweise  $\beta$ -Arrestin-1, AP-2, Eps15, Annexin-8 und Myosin II A, bestehen, sowie darin, zu untersuchen, wie dies mit dem Vorgang der MIF-Endozytose korreliert.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Endozytoseweg des Zytokins MIF als schneller, Clathrin- und Dynamin-abhängiger, vom Mikrotubuli-System und der Ansäuerung endosomaler Kompartimente abhängiger, dem LDL-Endozytoseweg ähnlicher Internalisierungsweg, in den CD74 und CXCR4 involviert sind, herausgearbeitet. Für zukünftige weitergehende Analysen sollte hierdurch der Weg geebnet sein.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Trotz seiner Entdeckung bereits im Jahre 1966, seiner Klonierung vor 20 Jahren und des kürzlich erlangten Wissens über die Existenz dreier funktionaler MIF-Rezeptoren, CD74, CXCR2 und CXCR4, sind zellbiologische Gesichtspunkte beispielsweise bezüglich Endozytose, Sekretion oder intrazellulärer Transportmechanismen des Zytokins MIF bislang nur wenig verstanden. Aufgrund der Funktionen von MIF als pleiotroper inflammatorischer Vermittler mit chemokinartigen Eigenschaften und seiner entscheidenden Rolle in der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen wie beispielsweise septischem Schock, rheumatoider Arthritis, Atherosklerose, Kolitis, Glomerulonephritis und der Tumorgenese, wäre besonders die Aufklärung seines Internalisierungsmechanismus in Zielzellen, sowie des mechanistischen Zusammenhangs zwischen Endozytose und Initiierung von Signaltransduktionswegen wünschenswert. Auch ist die Abschaltung von MIF-Signalen bis dato vollkommen ununtersucht. Zusätzlich zum heute bereits guten Einblick in die molekulare Struktur, die Biologie und die pathophysiologische Bedeutung von MIF könnten neue Erkenntnisse bezüglich seines Endozytosemechanismus und dessen Korrelation mit der Signaltransduktion und Signalabschaltung entscheidend zum Verständnis der Funktion von MIF und zur Entwicklung therapeutischer Strategien zur Bekämpfung MIF-bedingter Krankheitssymptome beitragen.

Obwohl erste Studien bezüglich der Endozytose des Zytokins MIF im Zusammenhang mit Experimenten zur Veranschaulichung der Interaktion von intrazellulärem, zytosolischem MIF mit der COP9-Signalosomkomponente JAB1/CSN5 auf einen Rezeptor-unabhängigen Mechanismus hindeuteten, wurde später aufgrund der schnellen zellulären Aufnahme von MIF bei physiologischen Konzentrationen eher von einem kanonischen Rezeptor-vermittelten Endozytoseweg ausgegangen. Bisher war jedoch unklar, um welchen der in Säugetieren möglichen Endozytosewege es sich bei MIF handelte.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde genau dieser Fragestellung durch Studien zur Aufklärung der Endozytose des Zytokins MIF in Fibroblasten, T-Zellen und verschiedenen anderen Zelllinien nachgegangen. Zur Analyse molekularer Einzelheiten bezüglich des Endozytosewegs wurden innerhalb mikroskopischer Analysen sowohl mittels konventioneller, als auch mittels Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung endosomaler Marker Kolokalisationsstudien mit fluoreszenzmarkiertem MIF durchgeführt. Zudem wurde der Endozytoseweg sukzessive durch Verwendung verschiedenster pharmakologischer Inhibitoren für die unterschiedlichen möglichen Internalisierungswege in Säugetieren herausgearbeitet. Eine Beteiligung der bekannten MIF-Rezeptoren CD74 und CXCR4 wurde zusätzlich in Blockierungs- und Überexpressionsversuchen analysiert.

Anhand verschiedenster Kolokalisationsstudien mit den pharmakologischen Inhibitoren Monodansylcadaverin (MDC), Chlorpromazin (CPZ) und Dynasore wurde verdeutlicht, dass es sich beim Internalisierungsweg des Zytokins MIF um einen Dynamin-abhängigen, Clathrin-vermittelten Endozytoseweg handelt. MIF wird innerhalb weniger Minuten (10-20 min) zu den späten Endosomen transportiert, kolokalisiert aber auch mit den frühen Endosomen und den Lysosomen. Eine Beteiligung der Clathrin-unabhängigen, Caveolin-abhängigen Endozytosewege konnte für die Aufnahme von MIF in Zellen ausgeschlossen werden, da Nystatin und Filipin keine signifikanten Effekte zeigten und keine Kolokalisation

mit dem Referenzprotein für diese Endozytosewege, Cholera toxin B, nachgewiesen werden konnte. Durch Verwendung der beiden Inhibitoren Bafilomycin (Inhibitor der vakuolären Protonenpumpe, v-ATPasen) und Nocodazol (Mikrotubuligift) konnte des Weiteren eine Abhängigkeit des Endozytosemechanismus von einer ausreichenden Ansäuerung der endosomalen Kompartimente und von der Intaktheit des Mikrotubuli-Systems festgestellt werden. Kolokalisationsstudien mit Referenzproteinen verdeutlichten eine Ähnlichkeit des MIF-Endozytosewegs mit demjenigen von LDL. In frühen Phasen der Internalisierung, also vermutlich in den frühen, *sorting endosomes*, gleicht der MIF-Internalisierungsweg zusätzlich demjenigen von Transferrin. Bezüglich einer Beteiligung eines oder mehrerer der bekannten MIF-Rezeptoren am Vorgang der MIF-Endozytose zeigte sich eine Förderung der Endozytose in Anwesenheit von CD74, die sich in einer beschleunigten Aufnahme von MIF innerhalb der ersten 10 min äußerte. In CD74-defizienten Zelllinien wie beispielsweise HEK293- oder HeLa-Zellen konnte MIF allerdings ebenfalls internalisiert werden, wodurch verdeutlicht wurde, dass CD74 nicht essenziell für die MIF-Endozytose ist, sondern sich lediglich fördernd auswirkt. Auf der Suche nach einem zweiten wichtigen Rezeptor für die Internalisierung von MIF richtete sich die Aufmerksamkeit der Analyse auf den in diesen Zellen exprimierten MIF-Rezeptor CXCR4. Eine Blockierung des CXCR4-Rezeptors durch den CXCR4-spezifischen Inhibitor AMD3100 zeigte in HEK293-Zellen eine markante Inhibierung der MIF-Endozytose (40%), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Internalisierung von MIF in Abwesenheit von CD74 über CXCR4 reguliert wird. Eine Beteiligung beider Rezeptoren CD74 und CXCR4 am Endozytosevorgang des Zytokins MIF konnte zusätzlich dadurch untermauert werden, dass beide sowohl miteinander, als auch mit MIF an der Plasmamembran und innerhalb intrazellulärer endosomaler Kompartimente kolokalisieren. Eine Kolokalisierung von MIF und seinen Rezeptoren unabhängig voneinander mit den Lysosomen stützte weiterhin die Erkenntnis, dass die MIF-Endozytose über einen Clathrin-vermittelten Aufnahmeweg verläuft und mit demjenigen von LDL parallel läuft. Wie bereits für den MIF-Rezeptor CXCR2 bekannt war, kann auch CXCR4 mit CD74 funktionale Rezeptorkomplexe bilden, die außer für die MIF-vermittelte Aktivierung des JNK-Signaltransduktionswegs auch an der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs beteiligt sind, was durch eine Beeinträchtigung der Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) nach Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern gegen CD74 oder CXCR4 oder durch Verwendung des CXCR4-spezifischen Inhibitors AMD3100 verdeutlicht wurde. Eine Inhibierung der SDF-1 $\alpha$ /CXCL12-induzierten AKT-Aktivierung hingegen konnte nur durch Antikörper gegen CXCR4, nicht aber durch solche gegen CD74 beobachtet werden, sodass nur die MIF-induzierte Aktivierung des Signalwegs durch beide Rezeptoren vermittelt wird. Aufgrund der Kenntnis einer über CD74 und CXCR4-vermittelten MIF-induzierten Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs und daraus resultierend, dass Chemokine Signalkaskaden nicht ausschließlich von der Plasmamembran ausgehend initiieren können, sondern auch nach ihrer Endozytose aus dem Endosom heraus (*endosomal signaling*), entstand die Idee bezüglich einer endosomalen MIF-induzierten Aktivierung der Signaltransduktion. Studien in T-Zellen, HeLa-Zellen und humanen Dermalfibroblasten verdeutlichten eine teilweise signifikante Inhibierung der AKT-Aktivierung infolge einer Behandlung mit Endozytoseinhibitoren, wie z.B. CPZ, die auf eine zumindest partiell auf eine durch endosomale Signalweiterleitung zurückzuführende Aktivierung des PI3K/AKT-

Signalwegs durch MIF schlussfolgern lässt, die zudem zelltypabhängig ist. Auch durch den *in vitro*-Kinase-Assay in T-Zellen, bei dem phosphorylierte Proteinkinase B nach Zugabe von Endozytoseinhibitoren und nachfolgender MIF-Stimulation präzipitiert wurde und für den *in vitro*-Kinase-Assay des GSK3-Fusionsproteins eingesetzt wurde, konnte zusätzlich der Hinweis auf eine inhibitorische Wirkung der Endozytoseinhibitoren auf die AKT-Aktivierung bestätigt werden. Demzufolge scheint die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs durch MIF tatsächlich teilweise über einen endosomalen Signaltransduktionsmechanismus ausgelöst zu werden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation, bei der es sich um eine zellbiologische Studie mit Bezug zur molekularen Immunologie und der Entzündungsforschung handelt, konnten zahlreiche Anhaltspunkte zum Endozytosemechanismus des Zytokins MIF in Zielzellen herausgearbeitet werden und eine Korrelation dieses Vorgangs mit der Initiation des PI3K/AKT-Signaltransduktionswegs durch MIF verdeutlicht werden. Das Ziel zukünftiger Studien bezüglich einer weiteren mechanistischen Aufklärung der an der Endozytose von MIF beteiligten Faktoren wird u.a. darin bestehen, zu verstehen wie Faktoren wie beispielsweise  $\beta$ -Arrestin-1, AP-2, Eps15, Annexin-8 und Myosin II A in den Internalisierungsvorgang involviert sind und wie genau es z.B. zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs durch MIF von der Plasmamembran vs. post-endozytotisch aus dem Endosom heraus kommt. Des Weiteren wäre interessant zu untersuchen, ob noch weitere durch MIF-induzierte Signalkaskaden wie beispielsweise der JNK-Signaltransduktionsweg, an dem auch CD74 und CXCR4 beteiligt sind, ähnlich wie der PI3K/AKT-Signalweg auch partiell durch einen endosomalen Signalweiterleitungsmechanismus (*endosomal signaling*) aktiviert werden können oder ob sich die Art und Weise der Aktivierung zusätzlich zur Abhängigkeit vom Zelltyp auch zwischen den Signalwegen unterscheidet. Auch eine mögliche Korrelation zwischen der Endozytose von MIF und derjenigen des ihm sehr ähnlichen D-DTs wäre denkbar. Wichtige Fragestellungen diesbezüglich könnten sich u.a. damit beschäftigen, ob auch D-DT über einen Clathrin-vermittelten Endozytoseweg internalisiert wird, ob CD74 und/oder CXCR4 auch hierin involviert sind, inwiefern das Mikrotubuli-Netzwerk und die Ansäuerung der Endosomen eine Rolle spielen und ob auch D-DT-vermittelte Signaltransduktionswege teilweise über endosomale Signalweiterleitung initiiert werden. Zusammenfassend wird die Aufklärung des MIF-Endozytosewegs wesentliche Anhaltspunkte für die Analyse des D-DT-Endozytosewegs liefern. Mechanistische Kenntnisse der Endozytosemechanismen beider Zytokine könnten zukünftig entscheidend dazu beitragen, Abschaltungsmechanismen bestimmter MIF- oder D-DT-induzierter Signalwege zu entwickeln, die für die Therapie zahlreicher akuter und chronischer Erkrankungen hilfreich wären.

## 7 Literatur

1. Gould, G.W. & Lippincott-Schwartz, J. New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 287-292 (2009).
2. Carpenter, G. & Cohen, S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* **48**, 193-216 (1979).
3. Ghosh, R.N., Gelman, D.L. & Maxfield, F.R. Quantification of low density lipoprotein and transferrin endocytic sorting HEP2 cells using confocal microscopy. *J Cell Sci* **107 ( Pt 8)**, 2177-2189 (1994).
4. Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. & Brown, M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 333-337 (1979).
5. Goldstein, J.L., Brown, M.S., Anderson, R.G., Russell, D.W. & Schneider, W.J. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 1-39 (1985).
6. Wall, D.A., Wilson, G. & Hubbard, A.L. The galactose-specific recognition system of mammalian liver: the route of ligand internalization in rat hepatocytes. *Cell* **21**, 79-93 (1980).
7. Goldstein, J.L., Anderson, R.G. & Brown, M.S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* **279**, 679-685 (1979).
8. Montesano, R., Roth, J., Robert, A. & Orci, L. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* **296**, 651-653 (1982).
9. Tran, D., Carpentier, J.L., Sawano, F., Gordon, P. & Orci, L. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7957-7961 (1987).
10. Marchese, A., Chen, C., Kim, Y.M. & Benovic, J.L. The ins and outs of G protein-coupled receptor trafficking. *Trends Biochem Sci* **28**, 369-376 (2003).
11. Lakadamyali, M., Rust, M.J. & Zhuang, X. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell* **124**, 997-1009 (2006).
12. Miaczynska, M. & Bar-Sagi, D. Signaling endosomes: seeing is believing. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 535-540 (2010).
13. Miaczynska, M., Pelkmans, L. & Zerial, M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 400-406 (2004).
14. Sorkin, A. & Von Zastrow, M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 600-614 (2002).
15. von Zastrow, M. & Sorkin, A. Signaling on the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 436-445 (2007).
16. Dickson, R.B., Hanover, J.A., Willingham, M.C. & Pastan, I. Prelysosomal divergence of transferrin and epidermal growth factor during receptor-mediated endocytosis. *Biochemistry* **22**, 5667-5674 (1983).
17. Dunn, K.W., McGraw, T.E. & Maxfield, F.R. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J Cell Biol* **109**, 3303-3314 (1989).
18. Zhang, J., *et al.* Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* **274**, 10999-11006 (1999).
19. Bonifacino, J.S. & Traub, L.M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447 (2003).

20. Fan, G.H., Yang, W., Wang, X.J., Qian, Q. & Richmond, A. Identification of a motif in the carboxyl terminus of CXCR2 that is involved in adaptin 2 binding and receptor internalization. *Biochemistry* **40**, 791-800 (2001).
21. Orsini, M.J., Parent, J.L., Mundell, S.J., Marchese, A. & Benovic, J.L. Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4: role of arrestins and identification of residues in the C-terminal tail that mediate receptor internalization. *J Biol Chem* **275**, 25876 (2000).
22. Wolfe, B.L. & Trejo, J. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* **8**, 462-470 (2007).
23. Signoret, N., *et al.* Agonist-induced endocytosis of CC chemokine receptor 5 is clathrin dependent. *Mol Biol Cell* **16**, 902-917 (2005).
24. Garcia Lopez, M.A., Aguado Martinez, A., Lamaze, C., Martinez, A.C. & Fischer, T. Inhibition of dynamin prevents CCL2-mediated endocytosis of CCR2 and activation of ERK1/2. *Cell Signal* **21**, 1748-1757 (2009).
25. Ding, Y., *et al.* The 73-kDa heat shock cognate protein is a CXCR4 binding protein that regulates the receptor endocytosis and the receptor-mediated chemotaxis. *Mol Pharmacol* **69**, 1269-1279 (2006).
26. Lagaudriere-Gesbert, C., Newmyer, S.L., Gregers, T.F., Bakke, O. & Ploegh, H.L. Uncoating ATPase Hsc70 is recruited by invariant chain and controls the size of endocytic compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1515-1520 (2002).
27. Rodionov, D.G., *et al.* Structural requirements for interactions between leucine-sorting signals and clathrin-associated adaptor protein complex AP3. *J Biol Chem* **277**, 47436-47443 (2002).
28. Hofmann, M.W., *et al.* The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem* **274**, 36153-36158 (1999).
29. Kongsvik, T.L., Honing, S., Bakke, O. & Rodionov, D.G. Mechanism of interaction between leucine-based sorting signals from the invariant chain and clathrin-associated adaptor protein complexes AP1 and AP2. *J Biol Chem* **277**, 16484-16488 (2002).
30. Dugast, M., Toussaint, H., Dousset, C. & Benaroch, P. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J Biol Chem* **280**, 19656-19664 (2005).
31. McCormick, P.J., Martina, J.A. & Bonifacino, J.S. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7910-7915 (2005).
32. Walseng, E., Bakke, O. & Roche, P.A. Major histocompatibility complex class II-peptide complexes internalize using a clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway. *J Biol Chem* **283**, 14717-14727 (2008).
33. von Kleist, L., *et al.* Role of the clathrin terminal domain in regulating coated pit dynamics revealed by small molecule inhibition. *Cell* **146**, 471-484 (2011).
34. Antonescu, C.N., Aguet, F., Danuser, G. & Schmid, S.L. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol Biol Cell* **22**, 2588-2600 (2011).
35. Dudleenamjil, E., *et al.* Bovine parvovirus uses clathrin-mediated endocytosis for cell entry. *J Gen Virol* **91**, 3032-3041 (2010).
36. Bhattacharyya, S., *et al.* Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway. *Virology* **401**, 18-28 (2010).
37. Lau, D., Kwan, W. & Guatelli, J. Role of the endocytic pathway in the counteraction of BST-2 by human lentiviral pathogens. *J Virol* (2011).
38. Delom, F. & Fessart, D. Role of Phosphorylation in the Control of Clathrin-Mediated Internalization of GPCR. *Int J Cell Biol* **2011**, 246954 (2011).

39. Moore, C.A., Milano, S.K. & Benovic, J.L. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**, 451-482 (2007).
40. Johannes, L. & Lamaze, C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic* **3**, 443-451 (2002).
41. Howes, M.T., Mayor, S. & Parton, R.G. Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 519-527 (2010).
42. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572 (1997).
43. Palade, G.E. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* **1**, 188-211 (1953).
44. Rothberg, K.G., *et al.* Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682 (1992).
45. Kurzchalia, T.V. & Parton, R.G. Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* **11**, 424-431 (1999).
46. Fra, A.M., Williamson, E., Simons, K. & Parton, R.G. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. *J Biol Chem* **269**, 30745-30748 (1994).
47. Lobie, P.E., Sadir, R., Graichen, R., Mertani, H.C. & Morel, G. Caveolar internalization of growth hormone. *Exp Cell Res* **246**, 47-55 (1999).
48. Le, P.U., Guay, G., Altschuler, Y. & Nabi, I.R. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **277**, 3371-3379 (2002).
49. Sjogren, B. & Svenningsson, P. Caveolin-1 affects serotonin binding and cell surface levels of human 5-HT7(a) receptors. *FEBS Lett* **581**, 5115-5121 (2007).
50. Nishizuka, S., *et al.* Oligonucleotide microarray expression analysis of genes whose expression is correlated with tumorigenic and non-tumorigenic phenotype of HeLa x human fibroblast hybrid cells. *Cancer Lett* **165**, 201-209 (2001).
51. Salani, B., *et al.* Caveolin-1 is essential for metformin inhibitory effect on IGF1 action in non-small-cell lung cancer cells. *FASEB J* (2011).
52. Prinetti, A., *et al.* A glycosphingolipid/caveolin-1 signaling complex inhibits motility of human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* **286**, 40900-40910 (2011).
53. Fielding, C.J. & Fielding, P.E. Intracellular cholesterol transport. *J Lipid Res* **38**, 1503-1521 (1997).
54. Drab, M., *et al.* Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**, 2449-2452 (2001).
55. Parton, R.G., Joggerst, B. & Simons, K. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **127**, 1199-1215 (1994).
56. Pelkmans, L., Kartenbeck, J. & Helenius, A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**, 473-483 (2001).
57. Shin, J.S., Gao, Z. & Abraham, S.N. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* **289**, 785-788 (2000).
58. Gilbert, A., *et al.* Direct demonstration of the endocytic function of caveolae by a cell-free assay. *J Cell Sci* **112** ( Pt 7), 1101-1110 (1999).
59. Oh, P., McIntosh, D.P. & Schnitzer, J.E. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* **141**, 101-114 (1998).
60. Henley, J.R., Krueger, E.W., Oswald, B.J. & McNiven, M.A. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **141**, 85-99 (1998).

61. Kang, Y.S., Zhao, X., Lovaas, J., Eisenberg, E. & Greene, L.E. Clathrin-independent internalization of normal cellular prion protein in neuroblastoma cells is associated with the Arf6 pathway. *J Cell Sci* **122**, 4062-4069 (2009).
62. Enomoto, K. & Gill, D.M. Cholera toxin activation of adenylate cyclase. Roles of nucleoside triphosphates and a macromolecular factor in the ADP ribosylation of the GTP-dependent regulatory component. *J Biol Chem* **255**, 1252-1258 (1980).
63. Merritt, E.A., Sixma, T.K., Kalk, K.H., van Zanten, B.A. & Hol, W.G. Galactose-binding site in Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Mol Microbiol* **13**, 745-753 (1994).
64. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P. & Simons, K. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**, 929-942 (1998).
65. Janes, P.W., Ley, S.C. & Magee, A.I. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol* **147**, 447-461 (1999).
66. Sharma, D.K., *et al.* Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling. *J Biol Chem* **278**, 7564-7572 (2003).
67. Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M. & Helenius, A. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* **118**, 767-780 (2004).
68. Kirkham, M., *et al.* Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* **168**, 465-476 (2005).
69. Parton, R.G. & Simons, K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 185-194 (2007).
70. Brown, D.A. & Rose, J.K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544 (1992).
71. Sharom, F.J. & Lehto, M.T. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol* **80**, 535-549 (2002).
72. Paladino, S., Sarnataro, D. & Zurzolo, C. Detergent-resistant membrane microdomains and apical sorting of GPI-anchored proteins in polarized epithelial cells. *Int J Med Microbiol* **291**, 439-445 (2002).
73. Liu, J., Oh, P., Horner, T., Rogers, R.A. & Schnitzer, J.E. Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J Biol Chem* **272**, 7211-7222 (1997).
74. Sowa, G., Pypaert, M. & Sessa, W.C. Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14072-14077 (2001).
75. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39 (2000).
76. Rodal, S.K., *et al.* Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* **10**, 961-974 (1999).
77. Subtil, A., *et al.* Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6775-6780 (1999).
78. Lamaze, C., *et al.* Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* **7**, 661-671 (2001).
79. Benmerah, A., *et al.* AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **140**, 1055-1062 (1998).
80. Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E. & Schmid, S.L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127**, 915-934 (1994).

81. Watts, C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* **15**, 821-850 (1997).
82. Watarai, M., *et al.* Legionella pneumophila is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med* **194**, 1081-1096 (2001).
83. Marechal, V., *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* **75**, 11166-11177 (2001).
84. Jasanoff, A., Wagner, G. & Wiley, D.C. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J* **17**, 6812-6818 (1998).
85. Praefcke, G.J. & McMahon, H.T. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 133-147 (2004).
86. van der Bliek, A.M., *et al.* Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* **122**, 553-563 (1993).
87. Pelkmans, L., Puntener, D. & Helenius, A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**, 535-539 (2002).
88. Stowell, M.H., Marks, B., Wigge, P. & McMahon, H.T. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol* **1**, 27-32 (1999).
89. Pitts, K.R., McNiven, M.A. & Yoon, Y. Mitochondria-specific function of the dynamin family protein DLP1 is mediated by its C-terminal domains. *J Biol Chem* **279**, 50286-50294 (2004).
90. Martin, S.J. Mitochondrial fusion: bax to the fessure. *Dev Cell* **20**, 142-143.
91. Alexander, C., *et al.* OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* **26**, 211-215 (2000).
92. Fernandez-Trujillo, M.A., *et al.* Three Mx genes with differential response to VNNV infection have been identified in Gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol Immunol* **48**, 1216-1223.
93. Vestal, D.J. The guanylate-binding proteins (GBPs): proinflammatory cytokine-induced members of the dynamin superfamily with unique GTPase activity. *J Interferon Cytokine Res* **25**, 435-443 (2005).
94. Vestal, D.J. & Jeyaratnam, J.A. The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 89-97.
95. Sanderson, C.M., *et al.* Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Hum Mol Genet* **15**, 307-318 (2006).
96. Zhu, P.P., *et al.* Cellular localization, oligomerization, and membrane association of the hereditary spastic paraplegia 3A (SPG3A) protein atlastin. *J Biol Chem* **278**, 49063-49071 (2003).
97. Orso, G., *et al.* Homotypic fusion of ER membranes requires the dynamin-like GTPase atlastin. *Nature* **460**, 978-983 (2009).
98. Miller, K., Shipman, M., Trowbridge, I.S. & Hopkins, C.R. Transferrin receptors promote the formation of clathrin lattices. *Cell* **65**, 621-632 (1991).
99. Wang, L.H., Rothberg, K.G. & Anderson, R.G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* **123**, 1107-1117 (1993).
100. Cao, H., Chen, J., Krueger, E.W. & McNiven, M.A. SRC-mediated phosphorylation of dynamin and cortactin regulates the "constitutive" endocytosis of transferrin. *Mol Cell Biol* **30**, 781-792 (2010).

101. Kume, N., Cybulsky, M.I. & Gimbrone, M.A., Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* **90**, 1138-1144 (1992).
102. Sigismund, S., *et al.* Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* **15**, 209-219 (2008).
103. Goh, L.K., Huang, F., Kim, W., Gygi, S. & Sorkin, A. Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* **189**, 871-883 (2010).
104. Murphy, P.M., *et al.* International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**, 145-176 (2000).
105. von Andrian, U.H. & Mempel, T.R. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* **3**, 867-878 (2003).
106. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868-874 (2002).
107. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241 (2000).
108. Rossi, D. & Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-242 (2000).
109. Pagani, D., *et al.* Carbon Dioxide-enriched Water Inhalation in Patients with Allergic Rhinitis and its Relationship with Nasal Fluid Cytokine/Chemokine Release. *Arch Med Res* **42**, 329-333 (2011).
110. Holgate, S.T. Pathophysiology of asthma: What has our current understanding taught us about new therapeutic approaches? *J Allergy Clin Immunol* **128**, 495-505 (2011).
111. Degryse, B. & de Virgilio, M. The nuclear protein HMGB1, a new kind of chemokine? *FEBS Lett* **553**, 11-17 (2003).
112. Bernhagen, J., *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* **13**, 587-596 (2007).
113. Rohrl, J., Yang, D., Oppenheim, J.J. & Hehlhans, T. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2. *J Immunol* **184**, 6688-6694 (2010).
114. Zerneck, A., Bernhagen, J. & Weber, C. Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation* **117**, 1594-1602 (2008).
115. Yang, D., *et al.* Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**, 525-528 (1999).
116. Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R. & Lolis, E. Crystal structure at 2.6-A resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5191-5196 (1996).
117. Schwartz, V., *et al.* A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett* **583**, 2749-2757 (2009).
118. Leng, L., *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* **197**, 1467-1476 (2003).
119. Rich, A.R., Long, P.H., Brown, J.H., Bliss, E.A. & Holt, L.E., Jr. Experiments Upon the Cause of Whooping Cough. *Science* **76**, 330-331 (1932).
120. David, J.R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 72-77 (1966).
121. Bloom, B.R. & Bennett, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* **153**, 80-82 (1966).
122. Nathan, C.F., Karnovsky, M.L. & David, J.R. Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J Exp Med* **133**, 1356-1376 (1971).
123. Nathan, C.F., Remold, H.G. & David, J.R. Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. *J Exp Med* **137**, 275-290 (1973).

124. Weiser, W.Y., *et al.* Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7522-7526 (1989).
125. Thurman, G.B., Braude, I.A., Gray, P.W., Oldham, R.K. & Stevenson, H.C. MIF-like activity of natural and recombinant human interferon-gamma and their neutralization by monoclonal antibody. *J Immunol* **134**, 305-309 (1985).
126. McInnes, A. & Rennick, D.M. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J Exp Med* **167**, 598-611 (1988).
127. Bernhagen, J., *et al.* MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* **365**, 756-759 (1993).
128. Bernhagen, J., *et al.* Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* **33**, 14144-14155 (1994).
129. Sugimoto, H., Suzuki, M., Nakagawa, A., Tanaka, I. & Nishihira, J. Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett* **389**, 145-148 (1996).
130. Suzuki, M., *et al.* Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat Struct Biol* **3**, 259-266 (1996).
131. Muhlhahn, P., *et al.* NMR characterization of structure, backbone dynamics, and glutathione binding of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Protein Sci* **5**, 2095-2103 (1996).
132. Mischke, R., Kleemann, R., Brunner, H. & Bernhagen, J. Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Lett* **427**, 85-90 (1998).
133. Subramanya, H.S., *et al.* Enzymatic ketonization of 2-hydroxybutyrate: specificity and mechanism investigated by the crystal structures of two isomerases. *Biochemistry* **35**, 792-802 (1996).
134. Pastrana, D.V., *et al.* Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infect Immun* **66**, 5955-5963 (1998).
135. Sato, A., *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) of jawed and jawless fishes: implications for its evolutionary origin. *Dev Comp Immunol* **27**, 401-412 (2003).
136. Calandra, T. & Roger, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 791-800 (2003).
137. Swope, M.D. & Lolis, E. Macrophage migration inhibitory factor: cytokine, hormone, or enzyme? *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **139**, 1-32 (1999).
138. Sugimoto, H., *et al.* Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry* **38**, 3268-3279 (1999).
139. Kleemann, R., *et al.* Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol* **280**, 85-102 (1998).
140. Calandra, T., *et al.* Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* **6**, 164-170 (2000).
141. Bozza, M., *et al.* Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* **189**, 341-346 (1999).
142. Fukuyama, S., *et al.* Blockage of the macrophage migration inhibitory factor expression by short interference RNA inhibited the rejection of an allogeneic tracheal graft. *Transpl Int* **18**, 1203-1209 (2005).
143. Mikulowska, A., Metz, C.N., Bucala, R. & Holmdahl, R. Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced arthritis in mice. *J Immunol* **158**, 5514-5517 (1997).

144. Leech, M., *et al.* Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* **41**, 910-917 (1998).
145. Leech, M., *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* **42**, 1601-1608 (1999).
146. Santos, L., Hall, P., Metz, C., Bucala, R. & Morand, E.F. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* **123**, 309-314 (2001).
147. Morand, E.F., Bucala, R. & Leech, M. Macrophage migration inhibitory factor: an emerging therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **48**, 291-299 (2003).
148. Lan, H.Y., *et al.* De Novo renal expression of macrophage migration inhibitory factor during the development of rat crescentic glomerulonephritis. *Am J Pathol* **149**, 1119-1127 (1996).
149. Lan, H.Y., *et al.* The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med* **185**, 1455-1465 (1997).
150. Donnelly, S.C., *et al.* Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med* **3**, 320-323 (1997).
151. Martin, T.R. Cytokines and the acute respiratory distress syndrome (ARDS): a question of balance. *Nat Med* **3**, 272-273 (1997).
152. Burger-Kentischer, A., *et al.* Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1561-1566 (2002).
153. Bernhagen, J., *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature Medicine* **13**, 587-596 (2007).
154. Calandra, T., Froidevaux, C., Martin, C. & Roger, T. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune defenses against bacterial sepsis. *J Infect Dis* **187 Suppl 2**, S385-390 (2003).
155. Mitchell, R.A. & Bucala, R. Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol* **10**, 359-366 (2000).
156. Morand, E.F., Leech, M. & Bernhagen, J. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 399-410 (2006).
157. Bernhagen, J., Calandra, T., Cerami, A. & Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor is a neuroendocrine mediator of endotoxaemia. *Trends Microbiol* **2**, 198-201 (1994).
158. Tracey, K.J. & Cerami, A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* **21**, S415-422 (1993).
159. Dinarello, C.A. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol* **216**, 133-165 (1996).
160. Roger, T., David, J., Glauser, M.P. & Calandra, T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* **414**, 920-924 (2001).
161. Roger, T., Froidevaux, C., Martin, C. & Calandra, T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J Endotoxin Res* **9**, 119-123 (2003).
162. Juttner, S., *et al.* Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- $\alpha$ . *J Immunol* **161**, 2383-2390 (1998).
163. Kamir, D., *et al.* A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J Immunol* **180**, 8250-8261 (2008).
164. Onodera, S., *et al.* High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine* **11**, 163-167 (1999).

165. Onodera, S., *et al.* Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem* **275**, 444-450 (2000).
166. Rossi, A.G., *et al.* Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest* **101**, 2869-2874 (1998).
167. de Jong, Y.P., *et al.* Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* **2**, 1061-1066 (2001).
168. Lin, S.G., *et al.* De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits. *Circ Res* **87**, 1202-1208 (2000).
169. Schober, A., *et al.* Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **109**, 380-385 (2004).
170. Burger-Kentischer, A., *et al.* Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis* **184**, 28-38 (2006).
171. Pan, J.H., *et al.* Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* **109**, 3149-3153 (2004).
172. Kong, Y.Z., *et al.* Evidence for vascular macrophage migration inhibitory factor in destabilization of human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res* **65**, 272-282 (2005).
173. Schober, A., Bernhagen, J. & Weber, C. Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* **86**, 761-770 (2008).
174. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A. & Bucala, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* **179**, 1895-1902 (1994).
175. Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. & Bernhagen, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* **4**, 449-460 (2002).
176. Calandra, T., Spiegel, L.A., Metz, C.N. & Bucala, R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11383-11388 (1998).
177. Bernhagen, J., Calandra, T. & Bucala, R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J Mol Med* **76**, 151-161 (1998).
178. Merk, M., *et al.* The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* **182**, 6896-6906 (2009).
179. Onodera, S., *et al.* Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. *Immunology* **92**, 131-137 (1997).
180. Nishino, T., *et al.* Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med* **1**, 781-788 (1995).
181. Borghese, F. & Clanchy, F.I. CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. *Expert Opin Ther Targets* **15**, 237-251 (2011).
182. Busch, R., *et al.* Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol Rev* **207**, 242-260 (2005).
183. Stern, L.J., Potolicchio, I. & Santambrogio, L. MHC class II compartment subtypes: structure and function. *Curr Opin Immunol* **18**, 64-69 (2006).
184. Matza, D., Kerem, A. & Shachar, I. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol* **24**, 264-268 (2003).

185. Aroca, P., Solano, F., Garcia-Borron, J.C. & Lozano, J.A. Specificity of dopachrome tautomerase and inhibition by carboxylated indoles. Considerations on the enzyme active site. *Biochem J* **277** ( Pt 2), 393-397 (1991).
186. Odh, G., Hindemith, A., Rosengren, A.M., Rosengren, E. & Rorsman, H. Isolation of a new tautomerase monitored by the conversion of D-dopachrome to 5,6-dihydroxyindole. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 619-624 (1993).
187. Zhang, M., *et al.* Cloning and sequencing of a cDNA encoding rat D-dopachrome tautomerase. *FEBS Lett* **373**, 203-206 (1995).
188. Nishihira, J., *et al.* Molecular cloning of human D-dopachrome tautomerase cDNA: N-terminal proline is essential for enzyme activation. *Biochem Biophys Res Commun* **243**, 538-544 (1998).
189. Yoshida, H., Nishihira, J., Suzuki, M. & Hikichi, K. NMR characterization of physicochemical properties of rat D-dopachrome tautomerase. *Biochem Mol Biol Int* **42**, 891-899 (1997).
190. Esumi, N., *et al.* Conserved gene structure and genomic linkage for D-dopachrome tautomerase (DDT) and MIF. *Mamm Genome* **9**, 753-757 (1998).
191. Coggan, M., Whitbread, L., Whittington, A. & Board, P. Structure and organization of the human theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. *Biochem J* **334** ( Pt 3), 617-623 (1998).
192. Merk, M., *et al.* The D-dopachrome tautomerase (DDT) gene product is a cytokine and functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E577-585 (2011).
193. Sugimoto, H., *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of human D-dopachrome tautomerase. *J Struct Biol* **120**, 105-108 (1997).
194. Coleman, A.M., *et al.* Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma angiogenic potential by macrophage migration inhibitory factor and its homolog, D-dopachrome tautomerase. *J Immunol* **181**, 2330-2337 (2008).
195. Hiyoshi, M., *et al.* D-Dopachrome tautomerase is a candidate for key proteins to protect the rat liver damaged by carbon tetrachloride. *Toxicology* **255**, 6-14 (2009).
196. Xin, D., *et al.* The MIF homologue D-dopachrome tautomerase promotes COX-2 expression through beta-catenin-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cancer Res* **8**, 1601-1609 (2010).
197. Fernandez, E.J. & Lolis, E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**, 469-499 (2002).
198. Thelen, M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* **2**, 129-134 (2001).
199. Neubig, R.R. & Siderovski, D.P. Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 187-197 (2002).
200. Barbieri, F., Bajetto, A. & Florio, T. Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target. *J Oncol* **2010**, 426956 (2010).
201. Stein, J.V. & Nombela-Arrieta, C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* **116**, 1-12 (2005).
202. Rajagopalan, L. & Rajarathnam, K. Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Biosci Rep* **26**, 325-339 (2006).
203. Loetscher, P. & Clark-Lewis, I. Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J Leukoc Biol* **69**, 881-884 (2001).
204. Claesson-Welsh, L., Scheynius, A., Tjernlund, U. & Peterson, P.A. Cell surface expression of invariant gamma-chain of class II histocompatibility antigens in human skin. *J Immunol* **136**, 484-490 (1986).

205. Rahmsdorf, H.J., Koch, N., Mallick, U. & Herrlich, P. Regulation of MHC class II invariant chain expression: induction of synthesis in human and murine plasmocytoma cells by arresting replication. *Embo J* **2**, 811-816 (1983).
206. Koch, N., Moldenhauer, G., Hofmann, W.J. & Moller, P. Rapid intracellular pathway gives rise to cell surface expression of the MHC class II-associated invariant chain (CD74). *J Immunol* **147**, 2643-2651 (1991).
207. Koch, N., *et al.* MHC class II invariant chains in antigen processing and presentation. *Trends Biochem Sci* **14**, 383-386 (1989).
208. Claesson-Welsh, L. & Peterson, P.A. Implications of the invariant gamma-chain on the intracellular transport of class II histocompatibility antigens. *J Immunol* **135**, 3551-3557 (1985).
209. Long, E.O. Intracellular traffic and antigen processing. *Immunol Today* **10**, 232-234 (1989).
210. Peterson, M. & Miller, J. Invariant chain influences the immunological recognition of MHC class II molecules. *Nature* **345**, 172-174 (1990).
211. Lotteau, V., *et al.* Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* **348**, 600-605 (1990).
212. Layet, C. & Germain, R.N. Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex A alpha A beta dimers from the endoplasmic reticulum/cis-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2346-2350 (1991).
213. Roche, P.A., Teletski, C.L., Stang, E., Bakke, O. & Long, E.O. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8581-8585 (1993).
214. Kvist, S., Wiman, K., Claesson, L., Peterson, P.A. & Dobberstein, B. Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* **29**, 61-69 (1982).
215. Machamer, C.E. & Cresswell, P. Monensin prevents terminal glycosylation of the N- and O-linked oligosaccharides of the HLA-DR-associated invariant chain and inhibits its dissociation from the alpha-beta chain complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1287-1291 (1984).
216. Bakke, O. & Dobberstein, B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* **63**, 707-716 (1990).
217. Bremnes, B., Madsen, T., Gedde-Dahl, M. & Bakke, O. An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J Cell Sci* **107** ( Pt 7), 2021-2032 (1994).
218. Roche, P.A. & Cresswell, P. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345**, 615-618 (1990).
219. Long, E.O. Antigen processing for presentation to CD4+ T cells. *New Biol* **4**, 274-282 (1992).
220. Germain, R.N. & Margulies, D.H. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* **11**, 403-450 (1993).
221. Blum, J.S. & Cresswell, P. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3975-3979 (1988).
222. Arudchelvan, Y., *et al.* Identification and characterization of major histocompatibility complex class II compartments in cortical thymic epithelial cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **274**, 798-806 (2003).
223. Wraight, C.J., *et al.* Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J Biol Chem* **265**, 5787-5792 (1990).

224. Romagnoli, P., Layet, C., Yewdell, J., Bakke, O. & Germain, R.N. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J Exp Med* **177**, 583-596 (1993).
225. Stumptner-Cuvelette, P. & Benaroch, P. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim Biophys Acta* **1542**, 1-13 (2002).
226. Arneson, L.S. & Miller, J. The chondroitin sulfate form of invariant chain trimerizes with conventional invariant chain and these complexes are rapidly transported from the trans-Golgi network to the cell surface. *Biochem J* **406**, 97-103 (2007).
227. Henne, C., Schwenk, F., Koch, N. & Moller, P. Surface expression of the invariant chain (CD74) is independent of concomitant expression of major histocompatibility complex class II antigens. *Immunology* **84**, 177-182 (1995).
228. Freisewinkel, I.M., Schenck, K. & Koch, N. The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9703-9706 (1993).
229. Bijlmakers, M.J., Benaroch, P. & Ploegh, H.L. Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J Exp Med* **180**, 623-629 (1994).
230. Fineschi, B., Arneson, L.S., Naujokas, M.F. & Miller, J. Proteolysis of major histocompatibility complex class II-associated invariant chain is regulated by the alternatively spliced gene product, p41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10257-10261 (1995).
231. Shi, X., *et al.* CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* **25**, 595-606 (2006).
232. Beswick, E.J., *et al.* Helicobacter pylori-induced IL-8 production by gastric epithelial cells up-regulates CD74 expression. *J Immunol* **175**, 171-176 (2005).
233. Beswick, E.J., *et al.* Helicobacter pylori binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect Immun* **73**, 2736-2743 (2005).
234. Beswick, E.J., *et al.* The Helicobacter pylori urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect Immun* **74**, 1148-1155 (2006).
235. Becker-Herman, S., Arie, G., Medvedovsky, H., Kerem, A. & Shachar, I. CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Mol Biol Cell* **16**, 5061-5069 (2005).
236. Starlets, D., *et al.* Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* **107**, 4807-4816 (2006).
237. Binsky, I., *et al.* IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13408-13413 (2007).
238. Lue, H., *et al.* Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cell Signal* **18**, 688-703 (2006).
239. Lue, H., *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene* **26**, 5046-5059 (2007).
240. Meyer-Siegler, K.L., Iczkowski, K.A., Leng, L., Bucala, R. & Vera, P.L. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol* **177**, 8730-8739 (2006).
241. Lue, H., Dewor, M., Leng, L., Bucala, R. & Bernhagen, J. Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74. *Cell Signal* **23**, 135-144 (2011).

242. Burger, J.A. & Kipps, T.J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* **107**, 1761-1767 (2006).
243. Mohle, R., *et al.* 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**, 4523-4530 (1998).
244. Lu, M., Grove, E.A. & Miller, R.J. Abnormal development of the hippocampal dentate gyrus in mice lacking the CXCR4 chemokine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7090-7095 (2002).
245. Ma, Q., *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9448-9453 (1998).
246. Balabanian, K., *et al.* The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* **280**, 35760-35766 (2005).
247. Vera, P.L., Iczkowski, K.A., Wang, X. & Meyer-Siegler, K.L. Cyclophosphamide-induced cystitis increases bladder CXCR4 expression and CXCR4-macrophage migration inhibitory factor association. *PLoS One* **3**, e3898 (2008).
248. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. & Berger, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877 (1996).
249. Berger, E.A., Murphy, P.M. & Farber, J.M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**, 657-700 (1999).
250. Berson, J.F., *et al.* A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* **70**, 6288-6295 (1996).
251. Doms, R.W. Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology* **276**, 229-237 (2000).
252. Laudanna, C. & Alon, R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb Haemost* **95**, 5-11 (2006).
253. Sainz, J. & Sata, M. CXCR4, a key modulator of vascular progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 263-265 (2007).
254. Yopp, A.C., *et al.* FTY720-enhanced T cell homing is dependent on CCR2, CCR5, CCR7, and CXCR4: evidence for distinct chemokine compartments. *J Immunol* **173**, 855-865 (2004).
255. van den Berg, N.S., Buckle, T., Kuil, J., Wesseling, J. & van Leeuwen, F.W. Immunohistochemical Detection of the CXCR4 Expression in Tumor Tissue Using the Fluorescent Peptide Antagonist Ac-TZ14011-FITC. *Transl Oncol* **4**, 234-240.
256. Zlotnik, A. New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis. *J Pathol* **215**, 211-213 (2008).
257. Righi, E., *et al.* CXCL12/CXCR4 Blockade Induces Multimodal Antitumor Effects That Prolong Survival in an Immunocompetent Mouse Model of Ovarian Cancer. *Cancer Res* **71**, 5522-5534.
258. Otsuka, S., *et al.* CXCR4 Overexpression Is Associated with Poor Outcome in Females Diagnosed with Stage IV Non-small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*.
259. Yopp, A.C., *et al.* CXCR4 Expression Predicts Patient Outcome and Recurrence Patterns after Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases. *Ann Surg Oncol*.
260. Hamdan, F.F., Percherancier, Y., Breton, B. & Bouvier, M. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**, Unit 5 23 (2006).
261. Luker, K.E., Gupta, M. & Luker, G.D. Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation. *FASEB J* **23**, 823-834 (2009).

262. Percherancier, Y., *et al.* Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *J Biol Chem* **280**, 9895-9903 (2005).
263. See, H.B., Seeber, R.M., Kocan, M., Eidne, K.A. & Pflieger, K.D. Application of G protein-coupled receptor-heteromer identification technology to monitor beta-arrestin recruitment to G protein-coupled receptor heteromers. *Assay Drug Dev Technol* **9**, 21-30.
264. Sohy, D., Parmentier, M. & Springael, J.Y. Allosteric transinhibition by specific antagonists in CCR2/CXCR4 heterodimers. *J Biol Chem* **282**, 30062-30069 (2007).
265. Contento, R.L., *et al.* CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10101-10106 (2008).
266. Isik, N., Hereld, D. & Jin, T. Fluorescence resonance energy transfer imaging reveals that chemokine-binding modulates heterodimers of CXCR4 and CCR5 receptors. *PLoS One* **3**, e3424 (2008).
267. Decaillot, F.M., *et al.* CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits {beta}-arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem*.
268. Levoye, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelerie, F. & Lagane, B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* **113**, 6085-6093 (2009).
269. Ahuja, S.K. & Murphy, P.M. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J Biol Chem* **271**, 20545-20550 (1996).
270. Murphy, P.M. & Tiffany, H.L. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* **253**, 1280-1283 (1991).
271. Lee, Y.H. & Vacquier, V.D. Reusable cDNA libraries coupled to magnetic beads. *Anal Biochem* **206**, 206-207 (1992).
272. Trettel, F., *et al.* Ligand-independent CXCR2 dimerization. *J Biol Chem* **278**, 40980-40988 (2003).
273. Wilson, S., Wilkinson, G. & Milligan, G. The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities. *J Biol Chem* **280**, 28663-28674 (2005).
274. Milligan, G., Wilson, S. & Lopez-Gimenez, J.F. The specificity and molecular basis of alpha1-adrenoceptor and CXCR chemokine receptor dimerization. *J Mol Neurosci* **26**, 161-168 (2005).
275. Charo, I.F. & Ransohoff, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* **354**, 610-621 (2006).
276. Weber, C., *et al.* Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16278-16283 (2008).
277. Sreedharan, S.P., Robichon, A., Peterson, K.E. & Goetzl, E.J. Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4986-4990 (1991).
278. Kapas, S. & Clark, A.J. Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **217**, 832-838 (1995).
279. Joost, P. & Methner, A. Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0063 (2002).
280. Burns, J.M., *et al.* A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* **203**, 2201-2213 (2006).

281. Heesen, M., *et al.* Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1. *Immunogenetics* **47**, 364-370 (1998).
282. Moepps, B., Nuessler, E., Braun, M. & Gierschik, P. A homolog of the human chemokine receptor CXCR1 is expressed in the mouse. *Mol Immunol* **43**, 897-914 (2006).
283. Infantino, S., Moepps, B. & Thelen, M. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol* **176**, 2197-2207 (2006).
284. Hartmann, T.N., *et al.* A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *J Leukoc Biol* **84**, 1130-1140 (2008).
285. Kalatskaya, I., *et al.* AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol* **75**, 1240-1247 (2009).
286. Zabel, B.A., *et al.* Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *J Immunol* **183**, 3204-3211 (2009).
287. Boldajipour, B., *et al.* Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* **132**, 463-473 (2008).
288. Borroni, E.M., Mantovani, A., Locati, M. & Bonecchi, R. Chemokine receptors intracellular trafficking. *Pharmacol Ther* **127**, 1-8 (2010).
289. Pruenster, M. & Rot, A. Throwing light on DARC. *Biochem Soc Trans* **34**, 1005-1008 (2006).
290. Miao, Z., *et al.* CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15735-15740 (2007).
291. Wang, J., *et al.* The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem* **283**, 4283-4294 (2008).
292. Shimizu, N., *et al.* A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* **74**, 619-626 (2000).
293. Alkhatib, G., *et al.* CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958 (1996).
294. Chen, Z., Zhou, P., Ho, D.D., Landau, N.R. & Marx, P.A. Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry. *J Virol* **71**, 2705-2714 (1997).
295. Sierro, F., *et al.* Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14759-14764 (2007).
296. Lax, P., *et al.* Chemokine receptor CXCR2 regulates the functional properties of AMPA-type glutamate receptor GluR1 in HEK cells. *J Neuroimmunol* **129**, 66-73 (2002).
297. Limatola, C., *et al.* Expression of AMPA-type glutamate receptors in HEK cells and cerebellar granule neurons impairs CXCL2-mediated chemotaxis. *J Neuroimmunol* **134**, 61-71 (2003).
298. Parenty, G., Appelbe, S. & Milligan, G. CXCR2 chemokine receptor antagonism enhances DOP opioid receptor function via allosteric regulation of the CXCR2-DOP receptor heterodimer. *Biochem J* **412**, 245-256 (2008).
299. Wu, L., *et al.* CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-183 (1996).
300. Oravecz, T., *et al.* Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) by

- dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage. *J Exp Med* **186**, 1865-1872 (1997).
301. Hereld, D. & Jin, T. Slamming the DOR on chemokine receptor signaling: heterodimerization silences ligand-occupied CXCR4 and delta-opioid receptors. *Eur J Immunol* **38**, 334-337 (2008).
302. Finley, M.J., *et al.* Bi-directional heterologous desensitization between the major HIV-1 co-receptor CXCR4 and the kappa-opioid receptor. *J Neuroimmunol* **197**, 114-123 (2008).
303. Vischer, H.F., Nijmeijer, S., Smit, M.J. & Leurs, R. Viral hijacking of human receptors through heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 93-97 (2008).
304. Cho, Y., *et al.* Allosteric inhibition of macrophage migration inhibitory factor revealed by ibudilast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11313-11318 (2010).
305. Dessein, A.F., *et al.* Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells. *Cancer Res* **70**, 4644-4654 (2010).
306. Simons, D., *et al.* Hypoxia-induced endothelial secretion of macrophage migration inhibitory factor and role in endothelial progenitor cell recruitment. *J Cell Mol Med* **15**, 668-678 (2011).
307. Tarnowski, M., *et al.* Macrophage migration inhibitory factor is secreted by rhabdomyosarcoma cells, modulates tumor metastasis by binding to CXCR4 and CXCR7 receptors and inhibits recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Mol Cancer Res* **8**, 1328-1343 (2010).
308. Yam, C.H., *et al.* MDM2 and MDMX inhibit the transcriptional activity of ectopically expressed SMAD proteins. *Cancer Res* **59**, 5075-5078 (1999).
309. Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5547-5551 (1992).
310. Grampp, T., Sauter, K., Markovic, B. & Benke, D. Gamma-aminobutyric acid type B receptors are constitutively internalized via the clathrin-dependent pathway and targeted to lysosomes for degradation. *J Biol Chem* **282**, 24157-24165 (2007).
311. Bayer, N., *et al.* Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol* **72**, 9645-9655 (1998).
312. Bozec, A., *et al.* Response of endothelial cells to a dual tyrosine kinase receptor inhibition combined with irradiation. *Mol Cancer Ther* **4**, 1962-1971 (2005).
313. Eden, E.R., White, I.J. & Futter, C.E. Down-regulation of epidermal growth factor receptor signalling within multivesicular bodies. *Biochem Soc Trans* **37**, 173-177 (2009).
314. Ho, R., *et al.* Proliferation of human neuroblastomas mediated by the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* **65**, 9868-9875 (2005).
315. Kleemann, R., Grell, M., Mischke, R., Zimmermann, G. & Bernhagen, J. Receptor binding and cellular uptake studies of macrophage migration inhibitory factor (MIF): use of biologically active labeled MIF derivatives. *J Interferon Cytokine Res* **22**, 351-363 (2002).
316. Kleemann, R., *et al.* Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* **408**, 211-216 (2000).
317. Berndt, K., Kim, M., Meinhardt, A. & Klug, J. Macrophage migration inhibitory factor does not modulate co-activation of androgen receptor by Jab1/CSN5. *Mol Cell Biochem* **307**, 265-271 (2008).

318. Son, A., *et al.* Direct association of thioredoxin-1 (TRX) with macrophage migration inhibitory factor (MIF): regulatory role of TRX on MIF internalization and signaling. *Antioxid Redox Signal* **11**, 2595-2605 (2009).
319. Xie, L., Qiao, X., Wu, Y. & Tang, J. beta-Arrestin1 mediates the endocytosis and functions of macrophage migration inhibitory factor. *PLoS One* **6**, e16428 (2011).
320. Macia, E., *et al.* Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* **10**, 839-850 (2006).
321. Zhang, J., Ferguson, S.S., Barak, L.S., Menard, L. & Caron, M.G. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* **271**, 18302-18305 (1996).
322. Bottomley, M.J., Lo Surdo, P. & Driscoll, P.C. Endocytosis: How dynamin sets vesicles PHree! *Curr Biol* **9**, R301-304 (1999).
323. McGookey, D.J., Fagerberg, K. & Anderson, R.G. Filipin-cholesterol complexes form in uncoated vesicle membrane derived from coated vesicles during receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein. *J Cell Biol* **96**, 1273-1278 (1983).
324. Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E. & Allard, J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* **127**, 1217-1232 (1994).
325. Kharchenko, M.V., Kornilova, E.S. & Melikova, M.S. [Remodeling of microtubule system during EGF receptor endocytosis]. *Tsitologiya* **49**, 243-249 (2007).
326. Sakai, T., Yamashina, S. & Ohnishi, S. Microtubule-disrupting drugs blocked delivery of endocytosed transferrin to the cytocenter, but did not affect return of transferrin to plasma membrane. *J Biochem (Tokyo)* **109**, 528-533 (1991).
327. Gagliardi, S., Rees, M. & Farina, C. Chemistry and structure activity relationships of bafilomycin A1, a potent and selective inhibitor of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Curr Med Chem* **6**, 1197-1212 (1999).
328. Seglen, P.O. Inhibitors of lysosomal function. *Methods Enzymol* **96**, 737-764 (1983).
329. Signoret, N., *et al.* Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol* **139**, 651-664 (1997).
330. Ramel, D., *et al.* Shigella flexneri infection generates the lipid PI5P to alter endocytosis and prevent termination of EGFR signaling. *Sci Signal* **4**, ra61 (2011).
331. Mund, T. & Pelham, H.R. Regulation of PTEN/Akt and MAP kinase signaling pathways by the ubiquitin ligase activators Ndfip1 and Ndfip2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11429-11434 (2010).
332. Noels, H., Bernhagen, J. & Weber, C. Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* **19**, 76-86 (2009).
333. Luker, K.E., Steele, J.M., Mihalko, L.A., Ray, P. & Luker, G.D. Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene* **29**, 4599-4610 (2010).
334. Shurety, W., Pagan, J.K., Prins, J.B. & Stow, J.L. Endocytosis of uncleaved tumor necrosis factor-alpha in macrophages. *Lab Invest* **81**, 107-117 (2001).
335. Grenfell, S., Smithers, N., Miller, K. & Solari, R. Receptor-mediated endocytosis and nuclear transport of human interleukin 1 alpha. *Biochem J* **264**, 813-822 (1989).
336. Solari, R., Smithers, N., Kennard, N., Ray, K. & Grenfell, S. Receptor mediated endocytosis and intracellular fate of interleukin 1. *Biochem Pharmacol* **47**, 93-101 (1994).
337. Kushnaryov, V.M., MacDonald, H.S., Sedmak, J.J. & Grossberg, S.E. Murine interferon-beta receptor-mediated endocytosis and nuclear membrane binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 3281-3285 (1985).

338. Duprez, V. & Dautry-Varsat, A. Receptor-mediated endocytosis of interleukin 2 in a human tumor T cell line. Degradation of interleukin 2 and evidence for the absence of recycling of interleukin receptors. *J Biol Chem* **261**, 15450-15454 (1986).
339. Lowenthal, J.W., MacDonald, H.R. & Iacopetta, B.J. Intracellular pathway of interleukin 2 following receptor-mediated endocytosis. *Eur J Immunol* **16**, 1461-1463 (1986).
340. Chen, B.D. Interferon-induced inhibition of receptor-mediated endocytosis of colony-stimulating factor (CSF-1) by murine peritoneal exudate macrophages. *J Immunol* **136**, 174-180 (1986).
341. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO J* **30**, 3481-3500 (2011).
342. Vonderheit, A. & Helenius, A. Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. *PLoS Biol* **3**, e233 (2005).
343. Mesaki, K., Tanabe, K., Obayashi, M., Oe, N. & Takei, K. Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS One* **6**, e19764 (2011).
344. Hoepfner, S., *et al.* Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell* **121**, 437-450 (2005).
345. Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. & Gruenberg, J. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* **123**, 1373-1387 (1993).
346. Bananis, E., *et al.* Microtubule-dependent movement of late endocytic vesicles in vitro: requirements for Dynein and Kinesin. *Mol Biol Cell* **15**, 3688-3697 (2004).
347. Loubery, S., *et al.* Different microtubule motors move early and late endocytic compartments. *Traffic* **9**, 492-509 (2008).
348. Gruenberg, J., Griffiths, G. & Howell, K.E. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol* **108**, 1301-1316 (1989).
349. van Deurs, B., Holm, P.K., Kayser, L. & Sandvig, K. Delivery to lysosomes in the human carcinoma cell line HEp-2 involves an actin filament-facilitated fusion between mature endosomes and preexisting lysosomes. *Eur J Cell Biol* **66**, 309-323 (1995).
350. Weisz, O.A. Organelle acidification and disease. *Traffic* **4**, 57-64 (2003).
351. Clague, M.J., Urbe, S., Aniento, F. & Gruenberg, J. Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. *J Biol Chem* **269**, 21-24 (1994).
352. D'Arrigo, A., Bucci, C., Toh, B.H. & Stenmark, H. Microtubules are involved in bafilomycin A1-induced tubulation and Rab5-dependent vacuolation of early endosomes. *Eur J Cell Biol* **72**, 95-103 (1997).
353. Baravalle, G., *et al.* Transferrin recycling and dextran transport to lysosomes is differentially affected by bafilomycin, nocodazole, and low temperature. *Cell Tissue Res* **320**, 99-113 (2005).
354. van Weert, A.W., Dunn, K.W., Gueze, H.J., Maxfield, F.R. & Stoorvogel, W. Transport from late endosomes to lysosomes, but not sorting of integral membrane proteins in endosomes, depends on the vacuolar proton pump. *J Cell Biol* **130**, 821-834 (1995).
355. Gu, F. & Gruenberg, J. Biogenesis of transport intermediates in the endocytic pathway. *FEBS Lett* **452**, 61-66 (1999).
356. Maxfield, F.R. & Yamashiro, D.J. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv Exp Med Biol* **225**, 189-198 (1987).
357. Lafourcade, C., Sobo, K., Kieffer-Jaquinod, S., Garin, J. & van der Goot, F.G. Regulation of the V-ATPase along the endocytic pathway occurs through reversible subunit association and membrane localization. *PLoS One* **3**, e2758 (2008).

358. Kandimalla, K.K., Scott, O.G., Fulzele, S., Davidson, M.W. & Poduslo, J.F. Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein. *PLoS One* **4**, e4627 (2009).
359. LaFerla, F.M., Green, K.N. & Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **8**, 499-509 (2007).
360. Zernecke, A., Shagdarsuren, E. & Weber, C. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1897-1908 (2008).
361. Wetzker, R. & Bohmer, F.D. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 651-657 (2003).
362. Waters, C.M., Connell, M.C., Pyne, S. & Pyne, N.J. c-Src is involved in regulating signal transmission from PDGFbeta receptor-GPCR(s) complexes in mammalian cells. *Cell Signal* **17**, 263-277 (2005).
363. Akekawatchai, C., Holland, J.D., Kochetkova, M., Wallace, J.C. & McColl, S.R. Transactivation of CXCR4 by the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in human MDA-MB-231 breast cancer epithelial cells. *J Biol Chem* **280**, 39701-39708 (2005).
364. Szaszak, M., *et al.* Identification of the invariant chain (CD74) as an angiotensin AGTR1-interacting protein. *J Endocrinol* **199**, 165-176 (2008).
365. Weber, C. & Koenen, R.R. Fine-tuning leukocyte responses: towards a chemokine 'interactome'. *Trends Immunol* **27**, 268-273 (2006).
366. Cresswell, P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* **12**, 259-293 (1994).
367. Naujokas, M.F., Morin, M., Anderson, M.S., Peterson, M. & Miller, J. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* **74**, 257-268 (1993).
368. Nagasawa, T., Tachibana, K. & Kawabata, K. A CXC chemokine SDF-1/PBSF: a ligand for a HIV coreceptor, CXCR4. *Adv Immunol* **71**, 211-228 (1999).
369. Nagasawa, T., *et al.* Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**, 635-638 (1996).
370. Marsh, L.M., *et al.* Surface expression of CD74 by type II alveolar epithelial cells: a potential mechanism for macrophage migration inhibitory factor-induced epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **296**, L442-452 (2009).
371. Sallusto, F. & Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol* **9**, 949-952 (2008).
372. Moser, B. & Loetscher, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* **2**, 123-128 (2001).
373. Muller, A., *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50-56 (2001).
374. Ceradini, D.J., *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* **10**, 858-864 (2004).
375. DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J. & Shenoy, S.K. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* **69**, 483-510 (2007).
376. Moldenhauer, G., Henne, C., Karhausen, J. & Moller, P. Surface-expressed invariant chain (CD74) is required for internalization of human leucocyte antigen-DR molecules to early endosomal compartments. *Immunology* **96**, 473-484 (1999).
377. Lagane, B., *et al.* CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* **112**, 34-44 (2008).
378. Cheng, Z.J., *et al.* beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple

- interaction sites between beta-arrestin and CXCR4. *J Biol Chem* **275**, 2479-2485 (2000).
379. Futahashi, Y., *et al.* Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Sci* **98**, 373-379 (2007).
380. Zhang, Y., *et al.* Intracellular localization and constitutive endocytosis of CXCR4 in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* **22**, 1015-1029 (2004).
381. Marchese, A., Paing, M.M., Temple, B.R. & Trejo, J. G protein-coupled receptor sorting to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 601-629 (2008).

## 8 Anhang

### Sequenz von pEGFP-Rab5wt:

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAG  
TTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC  
CCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC  
TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTA  
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT  
GGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA  
GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACA  
TCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT  
TGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGT  
CGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAG  
GTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGT  
CGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGGTGGTGCCCATCCT  
GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG  
CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGC  
AAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAG  
TGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCA  
TGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACT  
ACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCG  
AGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG  
AGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACG  
GCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC  
TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC  
CGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA  
GCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGG  
CATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGATCTATGGCTAGTCGAGGGCGCAAC  
AAGACCCAACGGGCCAAATACTGGAAATAAAATATGCCAGTTCAAACCTAGTACT  
TCTGGGAGAGTCCGCTGTTGGCAAATCAAGCCTAGTGCTTCGTTTTGTGAAAGGC  
CAATTCATGAATTTCAAGAGAGTACCATTGGGGCTGCTTTTCTAACCCAAACTGT  
ATGTCTTGATGACACTACAGTAAAGTTTGAAATATGGGATACAGCTGGTCAAGAA  
CGATACCATAGCCTAGCACCAATGTACTIONTACAGAGGAGCACAAGCAGCCATAGTT  
GTATATGATATCACAAATGAGGAGTCCTTTGCAAGAGCAAAAAATTGGGTAAA  
GAACTTCAGAGGCAAGCAAGTCCTAACATTGTAATAGCTTTATCGGGAAACAAG  
GCCGACCTAGCAAATAAAAGAGCAGTAGATTTCCAGGAAGCACAGTCCTATGCA  
GATGACAATAGTTTATTATTCATGGAGACATCCGCTAAAACATCAATGAATGTAA  
ATGAAATATTCATGGCAATAGCTAAAAAATTGCCAAAGAATGAACCACAAAATC  
CAGGAGCAAATTCTGCCAGAGGAAGAGGAGTAGACCTTACCGAACCCACACAAC  
CAACCAGGAATCAGTGTGTAGTAACTAAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGAT  
CCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTT  
ACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAAT

GCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAA  
TAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTT  
TGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAACGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGT  
AAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAA  
TCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGT  
TCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGG  
GCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCA  
AGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCC  
CCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGA  
AGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGC  
GCGTAACCACACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGG  
CACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATT  
CAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTG  
AAAAGGAAGAGTCTTGAGGGCGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTA  
GGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCAT  
CTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGA  
AGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTC  
CGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGA  
CTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCA  
GAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGA  
GACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCT  
CCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATC  
GGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCCGGTTCTTT  
TGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCG  
GCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTC  
ACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC  
CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGC  
GGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACA  
TCGCATCGAGCGAGCACGTACTIONCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGAT  
CTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAG  
GCGAGCATGCCCAGCGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGC  
CGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCT  
GGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAA  
GAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTC  
CCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGA  
CTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACGAGATTT  
CGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGAC  
GCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACC  
CTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGC  
GCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCGTTTGTTC  
ATAAACGCGGGGTTCCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACC  
CCATTGGGGCCAATACGCCCGGCTTCTTCCTTTTCCCCACCCCAAGTT  
CGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTGGGGCGGCAGGCCCTGCCATAG  
CCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAA

AGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTG  
AGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG  
AGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTAC  
CAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC  
TGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTA  
GGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCT  
GTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCA  
AGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGC  
ACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGT  
GAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG  
GTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAA  
CGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGAT  
TTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGG  
CCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGT  
TATCCCCTG ATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

## 9 Curriculum Vitae

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Verena Schwartz  
Geburtsdatum: 22.01.1981  
Geburtsort: Erkelenz  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### SCHULBILDUNG

---

1987 – 1991 Katholische Grundschule Geilenkirchen-Würm  
1991 – 2000 Bischöfliches Gymnasium St.Ursula in Geilenkirchen  
2000 Schulabschluss: Abitur

### STUDIUM

---

10/2000 – 12/2007 Diplom-Studiengang Biologie an der RWTH Aachen  
02/2007 – 12/2007 Diplomarbeit zum Thema „Mechanismus der MIF-Endozytose und Rolle von CD74“ an der RWTH Aachen unter Leitung von Prof. Dr. J. Bernhagen  
12/2007 Erlangung des Grades Diplom-Biologin

### FORSCHUNG

---

02/2008 – 12/2011 Dissertation zum Thema „Zelluläre Transport- und Endozytosemechanismen des Zytokins MIF und seiner Rezeptoren“ am Institut für Biochemie und molekulare Zellbiologie an der RWTH Aachen unter Leitung von Prof. Dr. J. Bernhagen  
Seit 01/2012 wissenschaftliche Angestellte im Institut für Physiologie an der RWTH Aachen unter Leitung von Prof. Dr. S. Gründer