

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

Frauenklinik und Poliklinik

Fachgebiet Experimentelle Gynäkologie

Die Induktion von Cathepsin B durch CXCR3-Liganden –
Untersuchungen über CXCR3 in Mammakarzinomzelllinien

Anne Karge

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

1. Priv.-Doz. Dr. Holger Bronger
2. Prof. Dr. Jürgen Ruland

Die Dissertation wurde am 16.08.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 20.02.2019 angenommen.

Für Gertrud

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
1.1	Das invasive Mammakarzinom	1
1.2	Chemokine.....	4
1.2.1	Die CXC-Familie	7
1.2.2	CXCR3	7
1.2.3	CXCL9, CXCL10 und CXCL4 – Funktion und Regulation	10
1.2.4	Chemokine und ihre Rolle in der Tumormikroumgebung	12
1.3	Signaltransduktion in Zellen.....	14
1.3.1	ERK, AKT, Src und p38	15
1.3.2	Signalwege in Tumorzellen	16
1.3.3	Signalwege der Chemokine.....	17
1.4	Proteasen.....	18
1.4.1	Proteasen: Cathepsin B.....	18
1.4.2	Proteasen und ihre Rolle in der Tumormikroumgebung	20
1.4.3	Cathepsin B und das Mammakarzinom	21
1.5	Zielsetzung der Arbeit	23
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Materialien.....	25
2.1.1	Chemikalien	25
2.1.2	Antikörper	26
2.1.3	Proteine.....	27
2.1.4	Kits	28
2.1.5	Puffer und Lösungen	28
2.1.6	Laborzubehör	30
2.1.7	Geräte	31
2.2	Zelllinien und ihre Kultivierung	32
2.2.1	Kultivierung der MDA-MB-231, MCF-7 und T-47D Zelllinien	32
2.2.2	Stimulationen der Zelllinien.....	32
2.3	Proteinbiochemische Methoden	33
2.3.1	Proteinbestimmung nach Lowry	33
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34

2.3.3	Immunoblot-Analyse.....	34
2.3.4	ELISA.....	35
2.3.5	MTT-Assay	36
2.4	Statistische Auswertung	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Nachweis von CXCR3 mittels Western Blot in MDA-MB-231-, MCF-7- und T-47D-Zellen.....	38
3.2	Regulation von Procathepsin B und Cathepsin B nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231-Zellen	39
3.3.1	Regulation von Procathepsin B und Cathepsin B nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231-Zellen: Nachweis mittels Western Blot.....	39
3.3.2	Regulation von Procathepsin B und Cathepsin B nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231-Zellen: Nachweis mittels ELISA.....	41
3.3	Verantwortlicher Signalweg für die CXCR3-abhängige Regulation von Cathepsin B in MDA-MB-231-Zellen	42
3.3.1	Untersuchung des ERK-Signalwegs mittels ELISA	42
3.3.2	Weitere Signalwege mittels ELISA	45
3.3.3	Einfluss der Signalwegs-Inhibitoren auf das Zellwachstum	48
3.4	Aktivierung von Signalwegen durch CXCL9 und CXCL10 in MDA-MB-231-, MCF-7- und T-47D-Zellen.....	50
3.4.1	Regulation von p-ERK/ERK nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231-Zellen	52
3.4.2	Regulation von p-ERK/ERK nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MCF-7-Zellen	54
3.4.3	Regulation von p-ERK/ERK nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in T-47D-Zellen	56
3.4.4	Regulation von p-AKT/AKT nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen	58
4	Diskussion.....	60
4.1	Induktion von Cathepsin B durch CXCR3-Liganden im Mammakarzinom.....	60
4.1.1	Cathepsin B und seine Bedeutung als Immunevasionsmechanismus	60
4.1.2	Verantwortliche Signalwege für die chemokininduzierte Cathepsin B-Freisetzung	63
4.1.3	Verantwortliche Rezeptorspleißvariante für die chemokininduzierte Cathepsin B-Freisetzung	65
4.2	Die Aktivierung von Signalwegen durch CXCL9 und CXCL10	67
4.2.1	ERK und AKT.....	67

4.2.2	Methodisches Vorgehen	68
5	Zusammenfassung.....	70
6	Literaturverzeichnis	71
7	Abkürzungen.....	71
8	Danksagung.....	96

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Das invasive Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die weltweit häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau. In Deutschland wurde für das Jahr 2011 eine Inzidenz von etwa 117/100.000 Frauen angegeben. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 87% (2006) hat das Mammakarzinom eine vergleichsweise gute Prognose (Ovarialkarzinom zum Vergleich: 5-Jahres-Überlebensrate 42%) (Robert-Koch-Institut 2015). In den letzten Jahrzehnten konnte eine Steigerung der relativen Überlebensraten von 78,7 % (1988-97) auf 82,5% (2002-10) festgestellt werden, was mit verbesserten Präventions- und Therapiestrategien erklärt werden kann (Bauerfeind et al. 2009). Trotzdem starben 2012 knapp 18.000 Frauen an Brustkrebs (Robert-Koch-Institut 2015).

Die meisten Mammakarzinome treten sporadisch (also zufällig) auf, ursächlich können neben anderen Faktoren genetische Veränderungen sein (Kreienberg et al. 2013). Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2 sind häufig die Ursache für hereditäre Mammakarzinome (Casaubon et al. 2017). Weitere Risikofaktoren stellen unter anderem das Alter, Präkanzerosen der Brust, Adipositas und die verringerte körperliche Aktivität dar (Bauerfeind et al. 2009). Es gibt verschiedene Klassifikationssysteme zur Einordnung der Erkrankung, wobei im klinischen Alltag der TNM-Klassifikation die größte Bedeutung zufällt. Dabei wird der Tumor nach Tumorgröße (T), Nodalstatus (N) und Fernmetastasierung (M) eingeteilt. Anhand der TNM-Klassifikation kann dann eine weitere Stadiengruppierung nach UICC vorgenommen werden.

Zur Diagnosestellung des Mammakarzinoms ist eine histologische Gewebeprobe notwendig, meist in Form einer Biopsie (Heywang-Kobrunner et al. 2003, Bauerfeind et al. 2009). Nach Sicherung der Erkrankung erfolgt zum Ausschluss von Fernmetastasen ab einem UICC Stadium II eine Staginguntersuchung von Lunge, Leber und Knochen. Weitere bildgebende Verfahren, auch der Brust, können erforderlich werden. Anhand der Biopsie beurteilt man das vorliegende Karzinom nach histologischen und immunhistochemischen Kriterien. Der Tumor wird anhand der aktuellen WHO-Klassifikation von 2012 einem histologischen Typ zugeordnet. Der mit Abstand häufigste Typ ist das heterogene *Carcinoma of non specific type* (NST) mit einem Anteil von 50-80% aller Karzinome, gefolgt vom invasiv-lobulären Karzinom (5-15%) (Lebeau et al. 2014). Beim Grading nach Elston und Ellis wird der Tumor auf

Mitoserate, Kernpolymorphie und Tubulusausbildung untersucht und von G1 (wenig aggressiv) bis G3 (hoch aggressiv) eingeteilt (Elston et al. 1991). Weiterhin werden der Hormonrezeptorstatus, der HER2-Status und oft die Proliferationsrate bestimmt (Perou et al. 2000, Sorlie et al. 2001).

Nach Durchführung der genannten Untersuchungen kann der Patientin eine für sie optimale Therapie angeboten werden. Diese stützt sich auf Operation, Radiotherapie und systemische Therapie mittels Chemotherapeutika oder Hormontherapie (Bauerfeind et al. 2009). Ein leitliniengerechtes Vorgehen zeigt Abbildung 1.1.

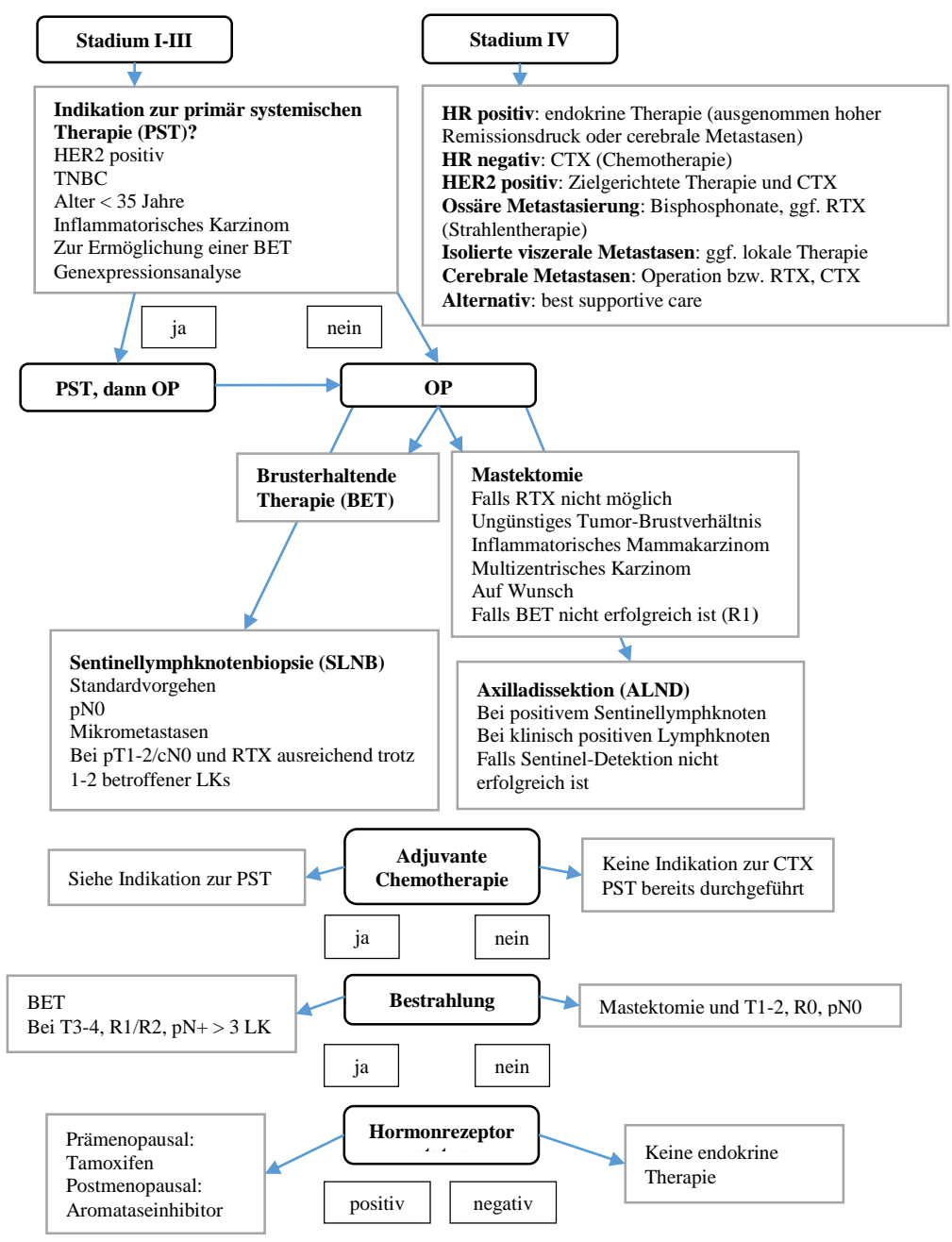


Abbildung 1.1: Therapeutisches Vorgehen beim primären Mammakarzinom (nach (Kreienberg et al. 2013)).

Wie dieser Abbildung zu entnehmen ist, werden alle Patientinnen bei kurativer Therapieintention operiert (Blichert-Toft et al. 1998). Wird eine brusterhaltende Therapie per Segmentexzision des Tumors gewählt, ist eine nachfolgende Strahlentherapie obligat, da hierdurch das Rezidivrisiko halbiert und die Gesamtmortalität gesenkt werden kann (Darby et al. 2011).

Eine Chemotherapie wird von vielen Frauen als einschneidendes Erlebnis wahrgenommen (Tiezzi et al. 2016). Sie ist mit Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen, neutropenem Fieber oder Alopezie vergesellschaftet (Shin et al. 2015, Bao et al. 2016, Jung et al. 2016, Shin et al. 2016). Es ist daher offensichtlich, dass nur die Frauen eine Chemotherapie erhalten sollten, die davon profitieren. Therapieindikationen können Abbildung 1.1 entnommen werden. Ziel der vergangenen Jahre war es, Patientinnen mit unklarer Therapieindikation anhand prädiktiver Marker weiter in aussagekräftige Subgruppen unterteilen zu können. Dies betrifft G2/N0-Tumoren, die hormonrezeptorpositiv und HER2 negativ sind. Es besteht die Möglichkeit der Konzentrationsbestimmung von uPA/PAI-1 (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp und Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1). Sie tragen zum Invasions- und Metastasierungspotential des Tumors bei und sind bei Überexpression als prognostisch ungünstig zu werten (Schmitt et al. 1991, Schmitt et al. 1992, Janicke et al. 1993). Durch die Konzentrationsbestimmung von uPA/PAI-1 können Patientinnen in eine Hoch- bzw. Niedrigrisikogruppe eingeordnet werden. Nur bei hohen Werten wird eine Empfehlung zur Chemotherapie ausgesprochen. Die prospektive Chemo-N0-Studie bestätigte auch nach einer 10-jährigen Nachbeobachtungsphase diese Einteilung, so dass uPA/PAI-1 außerhalb von Studien bestimmt werden kann (Harris et al. 2007, Harbeck et al. 2013, Duffy et al. 2014).

Mittlerweile besteht außerdem die Möglichkeit Genexpressionsanalysen wie den *EndoPredict*, *Mammaprint* oder *Oncotype* durchzuführen, welche bei allen Stufen des Gradings und bei positivem Lymphknotenstatus verwendet werden können (Buus et al. 2016). Der Versuch, dadurch die Indikation für eine Chemotherapie genauer zu definieren, kann in Zukunft Frauen vor einer Übertherapie bewahren, weshalb die *American Society of Clinical Oncology* seit 2016 neben dem *EndoPredict* und der Bestimmung von uPA/PAI-1 drei weitere Tests für den klinischen Gebrauch empfiehlt (Harris et al. 2016).

Neben der Chemotherapie besteht die Therapie des Mammakarzinoms auch aus der antihormonellen und zielgerichteten Therapie. Durch eine antihormonelle Therapie wird eine Stimulation der Tumorzellen (Östrogene wirken im Brustgewebe proliferativ (Gottardis et al. 1988)) unterbunden. Hierfür werden entweder selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) wie Tamoxifen (Jordan 1976) oder

Aromataseinhibitoren wie Anastrozol eingesetzt. Aromataseinhibitoren hemmen das gleichnamige Enzym und verhindern so die Umwandlung von Östrogenvorstufen zu aktivem Östrogen. Nach Verlust der Ovarialfunktion in der Postmenopause wird Östrogen vorwiegend durch die im Fettgewebe vorhandenen Aromatase produziert (Plourde et al. 1994), weshalb die Aromataseinhibitoren das Mittel der Wahl in der Postmenopause sind.

Zur Therapie von HER2 positiven Mammakarzinomen stehen *Biologicals* (=Biopharmazeutika) zur Verfügung. Damit werden Antikörper bezeichnet, die spezifische Oberflächenmoleküle von Tumoren markieren, woraufhin das Immunsystem diese Zellen erkennt und abtötet (Weiner 1999). Die Therapie mit Trastuzumab und Pertuzumab, Antikörper gegen HER2, hat in den letzten Jahren zur Mortalitätsreduktion dieser aggressiveren Tumorentität beigetragen (Slamon et al. 2001, Swain et al. 2013).

Wie bei den meisten soliden Tumoren führt das Auftreten von Fernmetastasen zu einem Umschwenken von kurativen auf palliative Therapieintentionen. Ein metastasiertes Mammakarzinom ist eine in der Regel nicht heilbare Systemerkrankung, während ein noch lokal begrenzter Tumor eine exzellente Prognose haben kann (Kreienberg et al. 2013). Das Mammakarzinom metastasiert vor allem lymphogen in axilläre Lymphknoten und häufig erst im Verlauf hämatogen in Lunge, Leber und Knochen. Zum besseren Verständnis der Erkrankung werden daher in dieser Arbeit einige Mechanismen, die zur Tumorprogression beitragen, untersucht.

1.2 Chemokine

Chemokine sind kleine Moleküle von etwa 14-18 kDa, deren Namen sich aus ihrer Funktion ableiten: *Chemotaktische Zytokine* (Vandercappellen et al. 2008). Ihre Hauptfunktion ist die chemotaktische Steuerung von Leukozyten im Körper.

Es wurden bisher knapp 50 unterschiedliche Chemokine beim Menschen beschrieben, die anhand ihres strukturellen Aufbaus in vier Gruppen eingeteilt werden. Alle Chemokine enthalten vier konservierte Cysteine (Ausnahmen: Lymphotactin/XCL1 und Fractalkine/CX3CL1, mit je zwei bzw. drei Cysteinen), die über Disulfidbrücken verbunden sind (Loetscher et al. 2001). Die Stellung der Cysteine ist dabei entscheidend für die Namensgebung: Bei CC-Chemokinen liegen beide Cysteine nebeneinander, bei CXC-Chemokinen sind die Cysteine durch eine Aminosäure getrennt und bei CX3C-Chemokinen finden sich je drei Aminosäuren zwischen den Cysteinen. XCL1 bildet die Gruppe der XC-

Chemokine (Murphy et al. 2000). Diese strukturelle Gegebenheit macht eine systematische Nomenklatur möglich: Liganden, also Chemokine, werden mit L bezeichnet und deren Rezeptoren mit R, beide werden durchnummeriert. Seit 2000 hat diese Nomenklatur die zuvor gebräuchlichen Eigennamen abgelöst (Murphy et al. 2000).

Die Sekundärstruktur von Chemokinen besteht aus einem ungeordneten N-Terminus. Darauf folgen die beschriebenen Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen. Der Bereich zwischen der zweiten Disulfidbrücke und der sich anschließenden Kernregion wird N-Schleife genannt und ist für die Rezeptorbindung der Chemokine verantwortlich. Es folgen drei β -Faltblattregionen, sowie eine C-terminale α -Helix. Während die Primärstruktur der verschiedenen Chemokine unterschiedlich aufgebaut ist, ist die Tertiärstruktur hoch konserviert (Fernandez et al. 2002, Trotta et al. 2009).

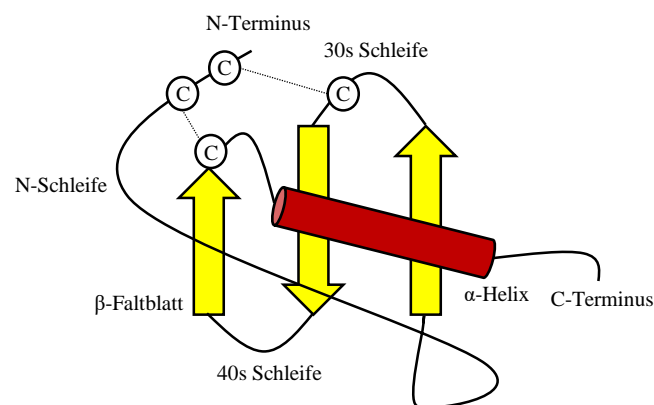


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau von Chemokinen (nach (Trotta et al. 2009)). C steht für Cystein, die Verbindung zwischen zwei Cysteinen stellt eine Disulfidbrücke dar.

Die Hauptfunktion von Chemokinen ist die Chemotaxis. Sie beschreibt die Fortbewegungsrichtung von Zellen entlang eines Konzentrationsgefälles (Taub 1996, Stahl 2016). Dieser Gradient wird durch Chemokine gebildet, die beispielsweise in inflammatorischen Prozessen freigesetzt werden (Liao et al. 1995, Loetscher et al. 1996, Loetscher et al. 1998). Die Inflammation führt unter anderem durch Zytokinfreisetzung zu Veränderungen der Endothelbarriere, sodass Leukozyten entlang der Gefäßoberfläche „rollen“, um an Geschwindigkeit zu verlieren und durch das Endothel in Richtung des entzündeten Gewebes migrieren zu können (Leukodiapedese (Taub 1996)). Für die Bindung der Leukozyten an Endothelzellen sind beispielsweise die Chemokine Interleukin-8 (IL-8, CXCL8) und CXCL4 verantwortlich (Baggiolini et al. 1997, Petersen et al. 1999).

Nach der Leukodiapedese werden die Leukozyten durch den Stoffgradienten der Chemokine zur Stelle des entzündlichen Prozesses geführt. Um einen stabilen Gradienten gewährleisten zu können, der nicht sofort ausgewaschen wird, binden einige Chemokine, unter anderem die Liganden von CXCR3, an Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix (Cox et al. 2008). Mittlerweile ist klar, dass Chemokine neben der Chemotaxis eine Vielzahl an weiteren Aufgaben erfüllen: So vermitteln sie beispielsweise Angiostase oder Angiogenese (Maione et al. 1990, Strieter et al. 1995), können apoptotisch oder proliferativ wirken (Lasagni et al. 2003), sind ein essentieller Bestandteil der fetalen Hirnentwicklung (Zou et al. 1998) und spielen eine Rolle in Prozessen der Blutgerinnung (Dumenco et al. 1988, Slungaard et al. 2003). Auch in pathologischen Vorgängen sind Chemokine involviert. So sind sie an der Entstehung von atherosklerotischen Plaques beteiligt (Li et al. 2015), vermitteln in Fällen von schwerer Malaria inflammatorische Prozesse im Gehirn (Ioannidis et al. 2014) und leisten einen wichtigen Anteil zur Proliferation und Metastasierung von malignen Tumoren (Keeley et al. 2010).

Chemokine binden an G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren und vermitteln so durch Aktivierung von intrazellulären Signalwegen ihre Wirkung. Insgesamt wurden fast 20 Rezeptoren identifiziert (Murphy 2002). An die meisten Rezeptoren können verschiedene Chemokine binden, die aber fast immer zur gleichen Subgruppe gehören (Murphy et al. 2000). Eine Übersicht ist der Tabelle 1.1. zu entnehmen.

Rezeptor	Liganden
CCR1	CCL3, 4, 5, 7, 14, 15, 16, 23
CCR10	CCL27, 28
CCR2	CCL2, 7, 8, 12, 13
CCR3	CCL5, 7, 11, 13, 15, 24, 26, 28
CCR4	CCL2, 3, 5, 7, 22
CCR5	CCL3, 4, 5, 8
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, 21
CCR8	CCL1, 4, 17
CCR9	CCL25
CCX-CKR	CCL19, 21, 25 CXCL13
CX3CR1	CX3CL1
CXCRI	CXCL6, 8
CXCR2	CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7, 8
CXCR3	CXCL4, 9, 10, 11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13

CXCR6	CXCL16
CXCR7	CXCL11, 12
D6	CCL2, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 14, 17, 22
DARC	CCL2, 5, 11, 12, 14
	CXCL1, 2, 3, 7, 8
XCR1	XCL1

Tabelle 1.1: Chemokinrezeptoren mit ihren Liganden (nach (Lazennec et al. 2010)).

1.2.1 Die CXC-Familie

CXC-Chemokine gehören zu den inflammatorischen Chemokinen, sie werden also erst bei Entzündungsvorgängen exprimiert (Murphy et al. 2000). Derzeit sind 17 verschiedene humane CXC-Chemokine beschrieben worden (Palomino et al. 2015).

Die CXC-Familie kann weiter in ELR-negative und ELR-positive Chemokine eingeteilt werden. „ELR positiv“ bezeichnet in diesem Zusammenhang das Vorhandensein eines Glutamat-Leucin-Arginin-Motivs, welches N-terminal des ersten Cysteins liegt (Murphy et al. 2000). Die Unterscheidung in ELR-positiv und -negativ hat eine funktionelle Bedeutung, da ELR-positive Chemokine Angiogenese vermitteln, ELR-negative hingegen angiostatisch wirken (Maione et al. 1990, Strieter et al. 1995). Zu den ELR-negativen Chemokinen gehören CXCL4, CXCL9 und CXCL10, sie binden alle an CXCR3 (Lasagni et al. 2003) und werden in dieser Arbeit genauer untersucht.

1.2.2 CXCR3

Derzeit sind drei Varianten von CXCR3 bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen: CXCR3-A, CXCR3-B und CXCR3-alt (Lasagni et al. 2003, Ehlert et al. 2004). Über die CXCR3-Achse können dadurch unterschiedliche und teilweise gegensätzliche Funktionen vermittelt werden. Die Liganden von CXCR3 sind CXCL4, CXCL9, CXCL10 und CXCL11. CXCR3 wird von vielen verschiedenen Zellen exprimiert. Dazu zählen Immunzellen wie natürliche Killerzellen (Wendel et al. 2008), B-Zellen (Qin et al. 1998) und aktivierte T-Zellen (Mulligan et al. 2013), aber auch Tumorzellen, wie beispielsweise Mammakarzinomzellen (Kapitel 3.1. und (Ma et al. 2009)).

CXCR3-A wird vor allem von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert und dient zu deren Rekrutierung in inflammatorisches Gewebe. Daher ist diese Spleißvariante essentiell für die Vermittlung von Chemotaxis (Loetscher et al. 1996).

CXCR3-B, 2003 erstmalig von Lasagni et al beschrieben, ist insbesondere auf Endothelzellen zu finden (Lasagni et al. 2003). Ligandenbindung an diese Spleißvariante wirkt bei Endothelzellen angiostatisch, indem die durch EGF-Bindung vermittelte Proliferation mittels einer Herunterregulation von p21CIP1/WAF1 antagonisiert wird (Gentilini et al. 1999). Besonders lässt sich in diesem Kontext die Rolle von CXCL4 betonen, welches in Thrombozytengranula gespeichert und daher bei Gerinnungsprozessen freigesetzt wird (Lasagni et al. 2003, Petrai et al. 2008).

Die Wirkung und Aufgabe von CXCR3-alt ist derzeit unklar. Von Ehlert et al. zum ersten Mal beschrieben, kann nur CXCL11 diesen Rezeptor aktivieren (Ehlert et al. 2004).

CXCR3 ist wie alle Chemokinrezeptoren G-Protein-gekoppelt. Er besteht aus sieben Transmembrandomänen, wobei das N-terminale Segment extrazellulär und das C-terminale Segment intrazellulär liegt. Weiterhin existieren drei extrazelluläre Schleifen, die der Ligand-Rezeptorbindung dienen (Trotta et al. 2009).

Die Bindung eines Chemokins erfolgt über dessen N-Schleifen-Region im Bereich des N-terminalen Segments des Rezeptors. Das bewegliche N-terminale Segment des Chemokins führt zu einer Rezeptoraktivierung. Abbildung 1.3 zeigt schematisch die unterschiedlichen Domänen des Rezeptors.

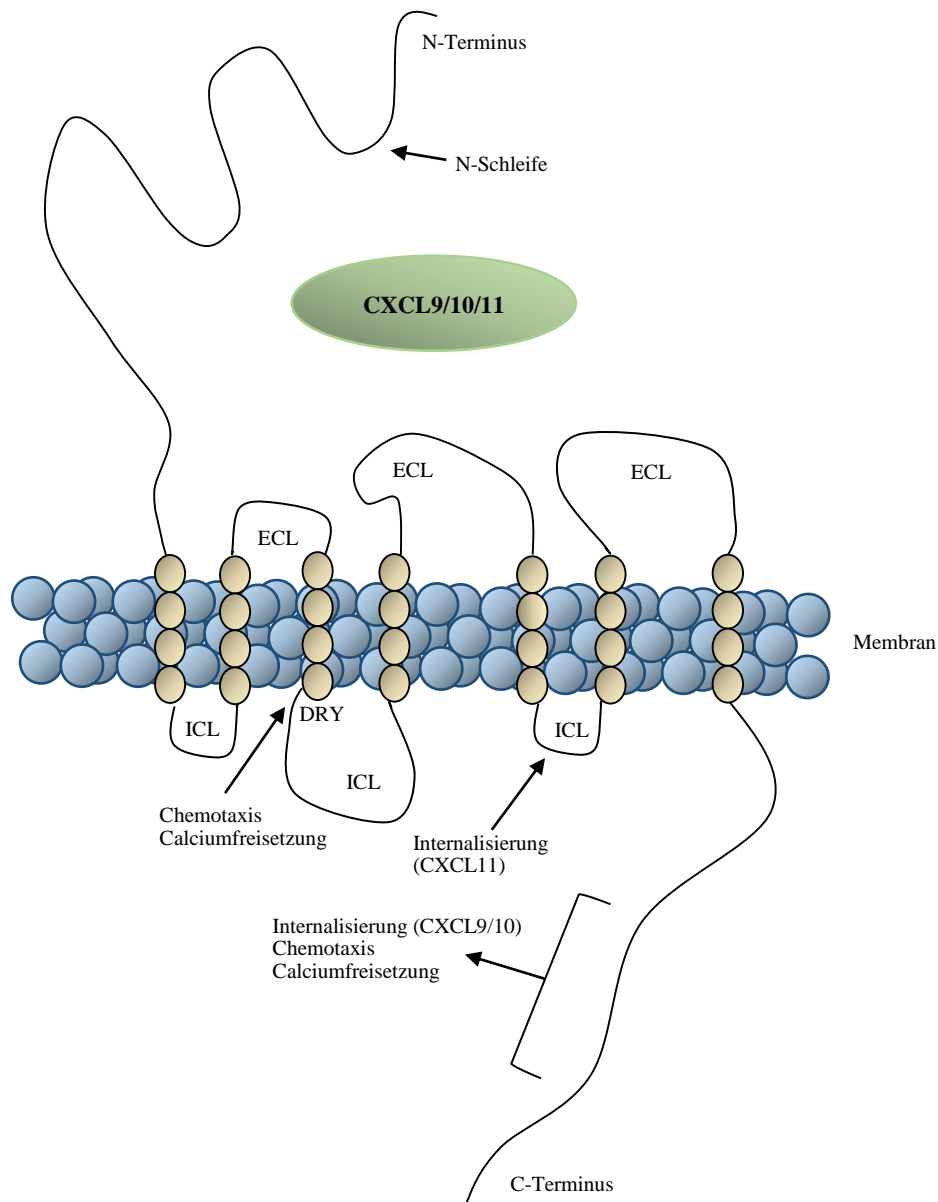


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Rezeptordomänen und deren Funktion (Colvin et al. 2004, Trotta et al. 2009).

Die Vermittlung von Chemotaxis ist abhängig vom C-Terminus und der DRY-Sequenz (Aspartat-Arginin-Tyrosin-Sequenz) im Bereich der dritten Transmembrandomäne. Zur Internalisierung des Rezeptors wird nach Bindung von CXCL9 und CXCL10 der C-Terminus benötigt, während die Funktion bei CXCL11-Bindung auf die dritte intrazelluläre Schleife angewiesen ist. ECL = extrazelluläre Schleife (von *extracellular loop*), ICL = intrazelluläre Schleife (von *intracellular loop*).

Nach Bindung an den Rezeptor werden intrazellulär G-Proteine aktiviert. Die Spleißvariante CXCR3-A, welche auch für Chemotaxis verantwortlich ist, führt über Koppelung mit einem G_i -Protein zu einer erhöhten Calciumfreisetzung innerhalb der Zelle. Bonacchi et al. konnten zeigen, dass über Bindung an CXCR3-A die Signalwege ERK, Src und PI3K/Akt aktiviert werden (Bonacchi et al. 2001). CXCR3-B hingegen hat keine chemotaktische Funktion. Im Gegensatz zu CXCR3-A führt eine Aktivierung des Rezeptors zu keiner Änderung des

intrazellulären Calciumspiegels, sondern zu einer Erhöhung von cAMP (Lasagni et al. 2003). Es ist bekannt, dass eine Aktivierung von G_s-gekoppelten Rezeptoren zu einer erhöhten Aktivität der Adenylatzyklase führt, welche Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischem AMP (cAMP) umwandelt (Cooper 2003).

Die Expression von CXCR3 wird durch einen negativen Feedbackmechanismus seiner Liganden reguliert. Inkubiert man Zellen mit diesem Rezeptor mit CXCL9, CXCL10 oder CXCL11 ist im Anschluss eine geringere Rezeptordichte auf der Zellmembran nachzuweisen. Der Grund hierfür ist die Aufnahme von CXCR3 in die Zelle mit anschließender de-novo-Synthese. CXCL11 ist der potenteste Vermittler dieser Internalisation (Meiser et al. 2008).

1.2.3 CXCL9, CXCL10 und CXCL4 – Funktion und Regulation

Die Liganden von CXCR3 können ihrer Funktion nach in zwei Gruppen eingeteilt werden: Sie können durch Interferon- γ induzierbar sein oder von Blutplättchen abstammen (*platelet-derived*). CXCL9, CXCL10 und CXCL11 gehören zu der ersten, während CXCL4 und seine Variante CXCL4L1 zur zweiten Gruppe gehören und Bestandteil von Thrombozytengranula sind (Youssef et al. 1968).

Die Funktion von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 ist vielseitig und geht über den bereits beschriebenen Vorgang der Chemotaxis hinaus. Man findet sie beispielsweise in pathologischen Prozessen wie Diabetes, Leukämie, Arthritis, systemischer Sklerose und Abstoßungsreaktionen von Transplantaten (Van Raemdonck et al. 2015). Die Rolle von Chemokinen in Tumoren ist komplex und wird im Kapitel 1.2.4 dargestellt.

Während CXCL9 und CXCL10 an beide Rezeptorspleißvarianten binden können, kann CXCL4 nur CXCR3-B aktivieren. Als Bestandteil von Thrombozytengranula spielt es eine wichtige Rolle in der Hämostase. CXCL4 kann mit hoher Affinität Heparin binden und fördert so die Blutgerinnung (Loscalzo et al. 1985). Zur Vermeidung einer überschießenden Fibroblastenproliferation nach Gefäßschäden kann CXCL4 deren Proliferation beeinflussen (Loscalzo et al. 1985). Eine physiologische Funktion von CXCL4 ist daher die Vermittlung von Angiostase (Lasagni et al. 2003).

Dass CXCR3-Liganden in ihrer Wirkweise teilweise divergieren, zeigen mittlerweile einige Veröffentlichungen (Khan et al. 2000, Groom et al. 2011). Dafür gibt es unterschiedliche Ursachen wie Rezeptoraffinität (CXCL11 > CXCL10 > CXCL9 (Cole et al. 1998, Xanthou et al. 2003)) und Dimerbildung bzw. Heterodimerbildung. CXCL4 kann beispielsweise mit IL-8 und CCR5/RANTES fusionieren, was den Effekt des jeweiligen Chemokins verändert. CCR5,

ebenfalls in Thrombozytengranula enthalten, vermittelt die Adhäsion von Monozyten am Endothel. CXCL4 wirkt dabei synergistisch, während es den gleichen Effekt bei IL-8 aufheben kann (von Hundelshausen et al. 2005). CXCL9, CXCL10 und CXCL11 können als Antagonisten von CCR5 wirken (Loetscher et al. 2001), CXCL11 aktiviert neben CXCR3-A und CXCR3-B auch CXCR3-alt (Ehlert et al. 2004) und CXCR7 (Burns et al. 2006). Weiterhin existieren unterschiedliche Regulationsmechanismen. Während die Freisetzung von CXCL10 durch TNF- α und Interferon- α/β stimuliert werden kann, ist CXCL9 nur durch Interferon- γ induzierbar (Ohmori et al. 1993, Groom et al. 2011), wobei die gleichzeitige Stimulation mit TNF- α die Freisetzung von CXCL9 potenziert. Endogene Stoffe wie Prostaglandin E2 können die Freisetzung wiederum hemmen (Bronger et al. 2012).

Einen weiteren Regulationsmechanismus stellt die posttranslationale Modifikation dar (also Veränderungen an Proteinen, die nach ihrer Translation durchgeführt werden). Durch proteolytische Spaltung können Chemokine inaktiviert und abgebaut werden. Identifiziert wurden dafür beispielsweise MMPs, Thrombin, Plasmin und Cathepsin G. Spalten Proteasen CXC-Chemokine N-terminal, sind ELR-positive Chemokine in der Lage, eine verstärkte Chemotaxis zu erzielen. Im Gegensatz dazu stellt man bei ELR-negativen Chemokinen eine verringerte Wirksamkeit fest (Repnik et al. 2015). CXCL11 verliert beispielsweise seine agonistische Wirkung nach Prozessierung durch MMPs und kann je nach Position der Modifikation als Antagonist von CXCR3 fungieren (Cox et al. 2008). Die Bedeutung von Chemokinen im Gewebe wird demnach von Proteasen entscheidend beeinflusst und moduliert. In Gefäßen kann das ubiquitär exprimierte Enzym CD26/DPP IV N-terminal ein Dipeptid von CXCL10 abspalten. Dadurch verliert CXCL10 die Fähigkeit zur Chemotaxis, die Vermittlung der Angiostase bleibt jedoch bestehen (Proost et al. 2001). Neben MMPs ist auch Cathepsin B befähigt, CXCL9 und CXCL10 am carboxyterminalen Ende zu spalten und damit zu inaktivieren (Van den Steen et al. 2003, Repnik et al. 2015). Die Bedeutung dieser Funktion im Tumorgewebe ist bisher nicht diskutiert worden.

Expression von...	Zellen
CXCL4	Megakaryozyten (Rabellino et al. 1981), Mastzellen (McLaren et al. 1980), Monozyten und T-Zellen (Schaffner et al. 2005)
CXCL9	Monozyten (Heise et al. 2005), Endothelzellen und Fibroblasten (Loos et al. 2006), Astrozyten (Cole et al. 1998), Bronchialepithel (Sauty et al. 1999), Tumorzellen (z. B. Mammakarzinom (Bronger et al. 2012)), Neutrophile (Gasperini et al. 1999)

CXCL10	Endothelzellen und Fibroblasten (Loos et al. 2006), Hepatozyten (Xu et al. 2016), glatte Muskulatur (Brightling et al. 2005), Monozyten (Heise et al. 2005), Neutrophile (Cassatella et al. 1997), Keratinozyten (Luster et al. 1987), β -Zellen, Tumorzellen (z.B. Mammakarzinom (Bronger et al. 2012)), Bronchialepithel (Sauty et al. 1999)
CXCL11	Endothelzellen, Perizyten und Fibroblasten (Kistner et al. 2017), Bronchialepithel (Sauty et al. 1999), Monozyten und Astrozyten (Cole et al. 1998), Neutrophile (Gasperini et al. 1999)
CXCR3	Th1 > Th2 (Bonecchi et al. 1998), tumorinfiltrierende Lymphozyten (Yang et al. 2006), Killerzellen (Wendel et al. 2008), B-Zellen (Qin et al. 1998), Endothelzellen (Lasagni et al. 2003), Epithelzellen und Pneumozyten (Ji et al. 2008), Mastzellen (Brightling et al. 2005), dendritische Zellen (Garcia-Lopez et al. 2001), β -Zellen (Morimoto et al. 2004), Tumorzellen (z.B. Mammakarzinom, siehe Kapitel 3.1.)

Tabelle 1.2: Beispiele von Zellen, die CXCR3 bzw. seine Liganden exprimieren.

1.2.4 Chemokine und ihre Rolle in der Tumormikroumgebung

Zu Beginn der molekularbiologischen wissenschaftlichen Forschung an Tumoren lag das Hauptaugenmerk auf den neoplastischen Zellen selbst. Mittlerweile weiß man, dass auch die restlichen Zellen, die einen Tumor umgeben, ganz erheblich zur Tumorprogression beitragen können. Hierzu zählen Fibroblasten, Endothelzellen und Immunzellen. Dabei kann der Tumor beispielsweise von sezernierten Proteasen, Chemokinen oder Wachstumsfaktoren beeinflusst werden. Da Tumorzellen einen erhöhten Stoffwechsel aufweisen, sind sie auf externe Energiequellen angewiesen. Dazu zählen Laktat und Fettsäuren, die von peritumoralen Adipozyten und Fibroblasten zur Verfügung gestellt werden (Romero et al. 2015). Das komplexe Zusammenspiel aus Tumorzellen, die sie umgebenden Zellen und extrazellulärer Matrix mit löslichen Komponenten nennt man Tumormikroumgebung (Leibovici et al. 2011). CXCL9 und CXCL10 sind wichtige Bestandteile der Tumormikroumgebung. Die Rolle dieser Chemokine im Tumor wird kontrovers diskutiert – auf der einen Seite können viele Veröffentlichungen eine protektive Funktion der Chemokine belegen (Kondo et al. 2004). Auf der anderen Seite kann CXCR3 und seine Liganden die Entstehung von Metastasen fördern und zwar dann, wenn Tumorzellen selbst den Rezeptor exprimieren (s. Kapitel 3.1 & (Walser et al. 2006, Kawada et al. 2007, Ma et al. 2009)). Im nodalnegativen Mammakarzinom ist beispielsweise die Überexpression von CXCR3 mit einem schlechteren Gesamtüberleben des betroffenen Patientenkollektivs assoziiert (Ma et al. 2009).

Betrachtet man die Wirkungen von CXCL9 und CXCL10 im Tumor, zeigt sich, dass diese zu einer ausgeprägten lymphozytären Infiltration des Tumorgewebes führen (Hirano et al. 2007). Dies betrifft die CD4⁺ und CD8⁺ positiven Zellen, nicht jedoch B-Lymphozyten (Mulligan et

al. 2013). Kondo et al. konnten für das Nierenzellkarzinom eine positive Korrelation zwischen CXCL9/CXCL10 und einer lymphozytären Infiltration zeigen, die mit einem verlängertem rezidivfreien Überleben einher ging (Kondo et al. 2004). Auch im Mausmodell dämpft CXCL9 das Tumorwachstum und die Bildung von Metastasen (Walser et al. 2007).

Matkowski et al. beschrieben eine Assoziation von durch CD4+ und CD8+ infiltriertem Tumorgewebe und positivem Lymphknotenstatus. In dieser Studie ging eine Lymphozyteninfiltration mit einer verschlechterten Prognose einher (Matkowski et al. 2009). Daher wird der Einfluss der lymphozytären Infiltration auf Tumoren kontrovers diskutiert (Rathore et al. 2014).

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Der schwedische Immunologe Kärre prägte die *Missing-self-Hypothese*, die besagt, dass NK-Zellen durch Molekülpräsentation über MHC-I viral infizierte oder Tumorzellen erkennen und abtöten können (Ljunggren et al. 1990, Kärre 2008). Sie spielt auch bei der Bekämpfung von Metastasen eine wichtige Rolle (Smyth et al. 1999). Um an ihren Wirkort zu gelangen, müssen NK-Zellen chemotaktisch durch Chemokine geleitet werden (Loetscher et al. 1996). Neben CC-Chemokinen wirken auch die Liganden von CXCR3 chemotaktisch. So wird eine schnelle Rekrutierung der NK-Zellen in Lymphknoten durch CXCL9/CXCL10 vermittelt, wo sie eine korrekte Th1-Antwort ermöglichen (Martin-Fontecha et al. 2004).

CXCR3 wird von einer Vielzahl an Zellen, besonders aber von NK-Zellen und Th1-Lymphozyten exprimiert. Deren Infiltration ins Tumorgewebe wird durch CXCL10 und Stimulation von Interferon- γ erzielt (Wendel et al. 2008, Wennerberg et al. 2015). Sind viele NK-Zellen im Tumor vorhanden, geht das mit einer verbesserten Prognose einher (Coca et al. 1997). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Liganden von CXCR3 Immunzellen chemotaktisch in Tumorgewebe locken, wo dann die entarteten Zellen angegriffen und eingedämmt werden können.

Generell unterscheidet man zwischen drei Arten der Metastasierung: lymphogen, hämatogen und per continuitatem. Untersuchungen über das kolorektale Karzinom zeigten, dass über CXCR3 die Metastasierung in Lymphknoten vermittelt werden kann (Kawada et al. 2007). Im Mausmodell verringerten CXCR3-Antagonisten eine Lungenmetastasierung von Mammakarzinomen (Walser et al. 2006). Unsere Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass Ovarialkarzinomzellen in Aszites vor allem durch CXCR3 migrieren (Windmüller et al. 2017). Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung von CXCR3 bei allen Typen der Metastasierung hin.

Auf zellulärer Ebene wird dieses erhöhte Metastasierungspotential vor allem mit Veränderungen in Zellmigration, Adhäsion und Invasion erklärt. *In vitro* führt eine verringerte Aktivierung von CXCR3 zu einer reduzierten Migration von Tumorzellen (Pu et al. 2015, Wightman et al. 2015). Daraus lässt sich schließen, dass im Tumor über CXCR3 solche Funktionen vermittelt werden, die sonst zur Chemotaxis benötigt werden.

Abgesehen von den beschriebenen direkten Wirkungen auf Tumorzellen kann auch eine vermehrte Proteasenbildung zur Metastasierung führen (siehe 1.4).

1.3 Signaltransduktion in Zellen

CXCR3 und seine Liganden vermitteln unter anderem Chemotaxis, Proliferation oder Angiostase und spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumoren. Wie genau diese Funktionen innerhalb der Zelle vermittelt werden, soll im folgenden Kapitel beschrieben werden.

Damit Zellen in einem Gewebe auf Veränderungen reagieren können, benötigen sie Rezeptoren, an die extrazelluläre Botenstoffe binden können. Dadurch kann sich die einzelne Zelle an Entzündungsvorgänge anpassen und mit anderen Zellen kommunizieren. Die Rezeptoren, die für diese Kommunikation verantwortlich sind, befinden sich entweder intrazellulär oder membrangebunden mit einem extrazellulären Anteil. Um an intrazelluläre Rezeptoren binden zu können, muss der Ligand in der Lage sein, passiv in die Zelle zu gelangen. Diese Voraussetzung erfüllen lipophile Moleküle wie Steroidhormone. Hydrophile Moleküle können nur aktiv in Zellen gelangen, weshalb deren Rezeptoren meistens membrangebunden sind (Deutzmann 2012).

Für die „Entdeckung der Zellkommunikation und im Speziellen der Entdeckung der G-Proteine“ wurden *Alfred G. Gilman* und *Martin Rodbell* 1994 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet (Raju 2000). Auch CXCR3 ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor (Isberg et al. 2016). Dabei kann die intrazelluläre Domäne über Bindung eines G-Proteins eine intrazelluläre Signalkaskade hervorrufen, die schlussendlich die Genexpression der Zelle verändern kann. Andere membrangebundene Rezeptoren sind an Enzyme gekoppelt, die nach Ligandenbindung an den Rezeptor Signalkaskaden aktivieren können (z. B. Rezeptortyrosinkinasen).

1.3.1 ERK, AKT, Src und p38

Signalaufnahme und -weiterverarbeitung innerhalb von Zellen werden durch ein komplexes System von Signalkaskaden, also Enzymketten, die sich gegenseitig aktivieren, reguliert. Dabei gibt es einige besonders häufig aktivierten Signalwege, darunter „ERK“, „AKT“, „Src“ und „p38“, die in dieser Arbeit genauer charakterisiert werden sollen. Namensgeber der Signalwege sind dabei oft die Schlüsselproteine der jeweiligen Ketten.

Die G-Proteine, die zur Aktivierung des ERK-Signalwegs führen, gehören zur Ras-Familie. Es sind mittlerweile viele Proteine bekannt, die im ERK-Signalweg eine Rolle spielen. Das Herzstück stellen jedoch drei MAP-Kinasen („mitogen-aktiviertes Protein“) dar (Alberts B 2002), die zur Aktivierung nacheinander phosphoryliert werden.

Die Aktivierung von ERK kann schnell und kurzfristig sein, wie beispielsweise durch EGF: Die höchste Aktivität wird hier nach 5 Minuten gemessen und fällt dann schnell wieder ab. Dies führt zur Teilung einer Zelle. Nach NGF-Bindung hingegen kann eine für Stunden andauernde höhere Aktivität gemessen werden, die dann zu einem Proliferationsstopp und zu einer Differenzierung von Neuronen führt (Guerrero et al. 1986, Alberts B 2002). Während des Zellzyklus kommt es zu einer biphasischen Aktivierung von ERK nach 2-6 Stunden und erneut nach 14-20 Stunden (Tamemoto et al. 1992). Diese Beispiele zeigen, dass der Effekt einer Signalkaskade zeitabhängig ist.

Neben Zellteilung sind Signalwege auch für antiapoptotische und wachstumsfördernde Signale, sowie für Zellmotilität verantwortlich. Eine wichtige Kaskade hierfür stellt der AKT-Signalweg dar. AKT, auch Proteinkinase B genannt, wird durch PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) aktiviert. (Brazil et al. 2001, Cantley 2002)

Unter Tyrosinkinase-assoziierten Rezeptoren versteht man Rezeptoren, die nach Ligandenbindung zyttoplasmatische Tyrosinkinasen aktivieren. Diese wiederum phosphorylieren Zielproteine (oft auch den Rezeptor selbst). Davon abzugrenzen sind die Rezeptortyrosinkinasen, die eine in den Rezeptor integrierte Kinase besitzen. Die bekannteste und als erste entdeckte Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase ist Src (auch c-Src, Akronym aus *cellular* und *Sarcoma*). Wie bei anderen Tyrosinkinasen auch findet sich bei Src eine SH2 und SH3 Domäne (Src-homologe Region), die Bindungsstellen für Rezeptor und intrazelluläre Proteine darstellen. Src kann viele verschiedene Signalwege aktivieren (beispielsweise ERK) und führt daher unter anderem zur Zellproliferation.

Neben ERK befinden sich in Zellen noch weitere MAP-Kinasen, darunter p38. Es sind vier Isoformen bekannt, die durch Stress- und proinflammatorische Stimuli aktiviert werden (Rouse et al. 1994, Raingeaud et al. 1995, Cargnello et al. 2011). Zu den vielfältigen Aufgaben gehört

beispielsweise die Expression von Transkriptionsfaktoren, die wiederum zu einer Produktion von Zytokinen führen (Kim et al. 2008). Weiterhin kann in Zellen die Apoptose aktiviert werden (Cargnello et al. 2011).

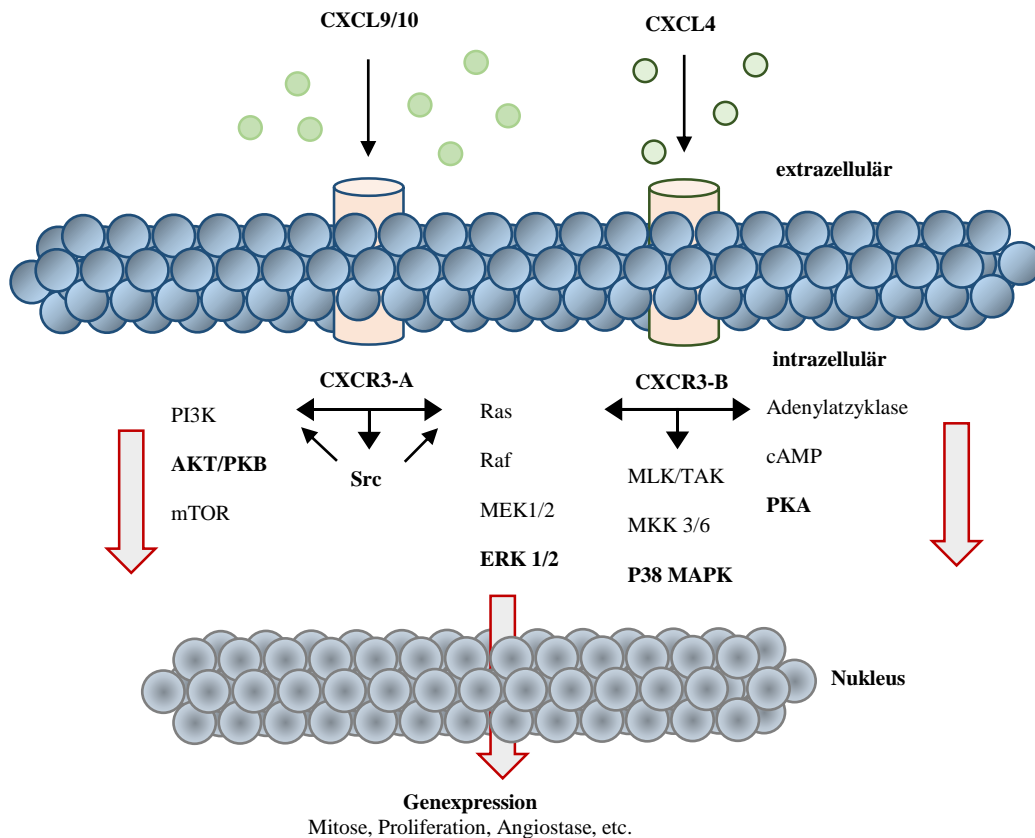


Abbildung 1.4: Signalwege ERK, AKT, p38 und Src schematisch dargestellt (Lasagni et al. 2003, Petrai et al. 2008, Bjorge et al. 2011, Liu et al. 2011).

1.3.2 Signalwege in Tumorzellen

Tumorzellen wachsen invasiv und reagieren nicht auf regelrechte Induktion von Apoptose. Sie gelten als immortalisiert und zeichnen sich häufig durch ihre stark erhöhte proliferative Aktivität aus. Je nach Lebensalter der Krebsentstehung finden sich hunderte Mutationen im Genom der Zelle, allerdings führen nur wenige davon zu einem Wachstumsvorteil und damit zur Tumorprogression (Vogelstein et al. 2013). Derzeit geht man von nur etwa 140 Genen aus, die letztendlich zur Malignität einer Zelle führen, und diese Mutationen lassen sich allesamt auf Veränderungen von 12 verschiedenen intrazellulären Prozessen zurückführen. Neben p53 und Genreparatur- bzw. Transkriptionsmechanismen gehören auch MAP-Kinasen, Ras und PI3K zu dieser Gruppe (Wood et al. 2007, Vogelstein et al. 2013, Wang et al. 2015).

Ras wurde von *Robert Allen Weinberg* in den 80er Jahren als eines der ersten Protoonkogene beschrieben (Parada et al. 1982). Eine Überaktivität des Enzyms führt zur vermehrten Expression von Proteinen, die an der Reparatur und Replikation von DNA, aber auch am Zellwachstum beteiligt sind (Vasseur et al. 2003) und trägt damit zum unkontrollierten Wachstum einer Tumorzelle bei.

Auch für AKT, Src und p38 sind protoonkogene Funktionen beschrieben worden. Src wird beispielsweise von HER2 positiven Karzinomen vermehrt gebildet, im Gegenzug mindert die Hemmung von Src das Metastasierungspotential dieser Tumore (Tan et al. 2005). Src vermittelt weiterhin das durch Östrogen verursachte Zellwachstum hormonrezeptorpositiver Mammakarzinome (Herynk et al. 2006). Im hormonrezeptornegativen, HER2 negativen Mammakarzinom ist der PI3K/Akt-Signalweg häufig konstitutiv aktiviert, was zu der erhöhten Invasivität und Metastasierungstendenz von dieser Tumorentität beiträgt (Cossu-Rocca et al. 2015, Massihnia et al. 2016). Resistenzentstehungen gegen Tamoxifen in der Behandlung des Mammakarzinoms sind mit p38 assoziiert (Haagensohn et al. 2010).

1.3.3 Signalwege der Chemokine

Wie in Kapitel 1.2 erläutert, binden CXCL9, CXCL10 und CXCL4 an CXCR3 und vermitteln darüber ihre Hauptwirkung in Zellen. Die Spleißvariante CXCR3-A ist ein G-Proteingekoppelter Rezeptor. Blockierbar durch Pertussistoxin handelt es sich um einen G_i-Rezeptor (Neptune et al. 1997, Colvin et al. 2004, Datta et al. 2006). Bonacchi et al. konnten zeigen, dass die Ligandenbindung an CXCR3-A AKT, ERK und Src aktiviert und dass die Hemmung von ERK und AKT mit einer Reduktion der CXCR3-induzierten Chemotaxis von Makrophagen einhergeht (Bonacchi et al. 2001, Petrai et al. 2008). Die Ligandenbindung bewirkt eine intrazelluläre Calciumfreisetzung (Colvin et al. 2004) und wachstumsfördernde Signale (Sidahmed et al. 2012).

Die Aktivierung von Ras führt über einen positiven Feedbackmechanismus zu einer vermehrten Bildung von CXCL10, während die Expression von CXCR3-B abnimmt (Datta et al. 2006).

In der aktuellen Literatur wird die Vermittlung von Angiostase als Hauptfunktion von CXCR3-B betrachtet. Dies erfolgt über eine Aktivierung von p38 (Petrai et al. 2008). Auch ERK oder JNK können über CXCR3-B aktiviert werden, allerdings in deutlich abgeschwächter Form, weshalb die Bedeutung *in vivo* bisher unklar ist (Petrai et al. 2008).

Die Bindung von CXCL10 an CXCR3-B auf der Oberfläche von T-Lymphozyten löst über p38 deren Apoptose aus (Sidahmed et al. 2012).

1.4 Proteasen

CXCR3 und seine Liganden sind in Bezug auf Tumorerkrankungen ambivalent zu sehen (siehe Kapitel 1.2.4). Einerseits führt eine vermehrte Chemokinexpression in Tumoren zu einer vermehrten Leukozyteninfiltration und damit zu einer verbesserten Tumorabwehr, andererseits geht die Expression von CXCR3 auf Tumorzellen mit einer verschlechterten Prognose einher. Dies legt nahe, dass CXCR3 auch an der Entstehung von proonkogenen Mechanismen beteiligt ist. Für MMPs wurde bereits gezeigt, dass Ligandenbindung an CXCR3 zu deren Freisetzung führen kann (Zhou et al. 2016). Cathepsin B ist eine Protease, die häufig in Mammatumoren überexprimiert wird, was mit einer verschlechterten Prognose einhergeht (Sun et al. 2016). Ob ein Zusammenhang zu CXCR3 und seinen Liganden besteht, ist bisher nicht untersucht worden.

1.4.1 Proteasen: Cathepsin B

Proteasen sind Enzyme, die in der Lage sind, Proteine zu spalten. Sie können nach dem Aufbau ihres aktiven Zentrums in fünf Familien eingeordnet werden (Asparaginsäure, Cystein, Metallo, Serin und Threonin). Das Wort Cathepsin leitet sich von dem griechischen Wort kathepsin („verdauen“) ab und soll Proteasen charakterisieren, die im leicht sauren Milieu aktiv sind (Willstätter et al. 1929, Turk et al. 2012). Derzeit sind elf humane Cathepsine der Cysteingruppe bekannt: Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X und W (Rossi et al. 2004).

Wie die anderen Cathepsine (außer Cathepsin X und C) ist Cathepsin B eine Endopeptidase, es fungiert jedoch im sauren Niveau durch Strukturänderungen als Carboxydipeptidase (Endopeptidasen spalten Peptidbindungen innerhalb eines Proteins, Exopeptidasen Peptidbindungen am Ende eines Proteins (Musil et al. 1991, Illy et al. 1997, Quraishi et al. 1999)).

Cathepsin B ist ein Zymogen. Als Präprocathepsin gebildet, erfolgt die erste Prozessierung im endoplasmatischen Retikulum, um dann über den Mannose-6-Phosphat-Weg als Procathepsin in die Lysosomen transferiert zu werden (Saftig et al. 2009, Turk et al. 2012). Die inaktive Vorstufe Procathepsin B kann durch Autokatalysation aktiviert werden, wobei das Vorhandensein von negativ geladenen Glykosaminoglykanen diesen Vorgang erheblich beschleunigt (Caglic et al. 2007). Gleichzeitig sind auch Proteasen in der Lage Cathepsin B zu aktivieren, dazu zählen unter anderen Cathepsin D, Elastase und uPA (Dalet-Fumeron et al. 1993, Dalet-Fumeron et al. 1996, van der Stappen et al. 1996).

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass die einzige Aufgabe von Cathepsinen die Proteolyse in Lysosomen ist (Fonovic et al. 2014). In lysosomalen Prozessen findet sich fast immer eine Beteiligung von Cathepsinen: Das proapoptische Protein Bid, Mitglied der Bcl-2-Familie, kann beispielsweise durch Cathepsine gespalten und damit aktiviert werden (Stoka et al. 2001, Droga-Mazovec et al. 2008). Cathepsine sind auch in der Prozessierung des Haupthistokompatibilitätskomplexes („MHC“) beteiligt (Sadegh-Nasseri et al. 2015).

Mittlerweile ist klar, dass sie eine Vielzahl an weiteren Funktionen erfüllen und auch außerhalb von Lysosomen lokalisiert sind: Beispielsweise im Nucleus, wo sie mit Histonen interagieren (Ceru et al. 2010) oder in Caveolae, Einbuchtungen in der Plasmamembran von Zellen, deren Funktion unter anderem Signaltransduktion und mechanische Zellstabilisierung beinhaltet (Cheng et al. 2016). Dort befindet sich aktives Cathepsin B, welches durch lysosomale Exozytose nach extrazellulär gelangt (Haka et al. 2009, Eding et al. 2015) und an der Degradation von extrazellulärer Matrix beteiligt ist (Cavallo-Medved et al. 2009). Bei zytotoxischen T-Zellen kann Cathepsin B die Selbstzerstörung der Zellen nach Degranulation verhindern (Balaji et al. 2002).

Wie alle Proteasen unterliegt auch Cathepsin B der Kontrolle durch Inhibitoren, die das Enzym ausschalten und dadurch eine überschießende Aktivierung vermeiden können. Physiologischerweise werden zu dieser Gruppe die Cystatine gezählt (Frlan et al. 2006). Gehemmt wird Cathepsin B beispielsweise durch Cystatin A, Cystatin B und Cystatin C (Pavlova et al. 2000, Aggarwal et al. 2014). Einen weiteren Einfluss auf die Aktivität von Cathepsin B hat der pH-Wert: Ab einem Wert über 7 wird Cathepsin B irreversibel gehemmt (Turk et al. 1994). Um daher auch in alkalischer Umgebung wirken zu können, kann Cathepsin B an Glykosaminoglykane binden, die zu einer Stabilisierung der Protease im nicht sauren Milieu führen (Almeida et al. 2001).

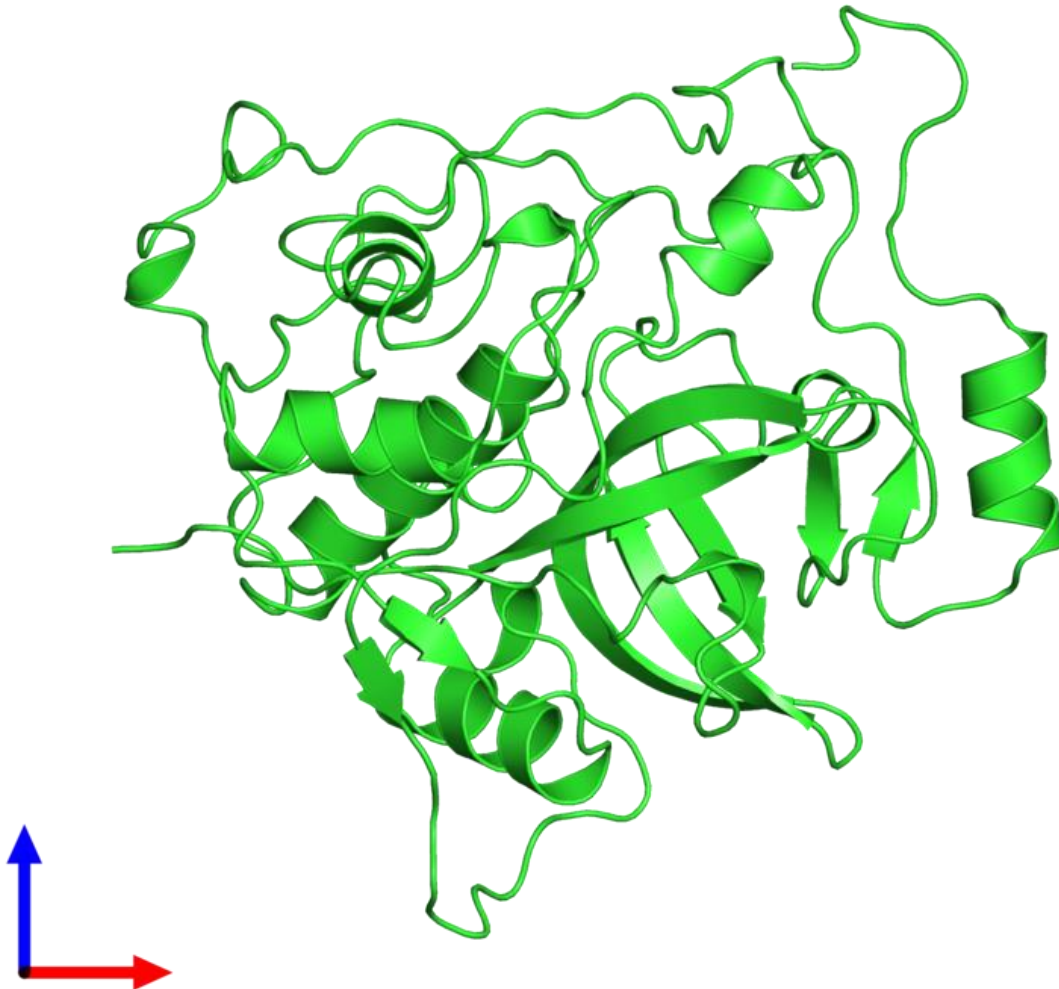


Abbildung 1.5: 3D-Modell von humanem Procathepsin B. Quelle: <http://www.ebi.ac.uk>

1.4.2 Proteasen und ihre Rolle in der Tumormikroumgebung

Zellen sind von einer komplexen Proteinstruktur umgeben, die extrazelluläre Matrix (EZM) (siehe Kapitel 1.2.4), zu der Kollagene und Glykoproteine gehören (Ayad et al. 1986). Damit diese Matrix keine statische, unveränderliche Struktur darstellt, sind extrazelluläre Proteasen zum Umbau notwendig. Dafür sind vor allem Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) verantwortlich, aber auch ADAMs („A Disintegrin And Metalloproteinase“, Unterklasse der Metalloproteinasen), Meprine und Cathepsine (Kuno et al. 1999, Victor et al. 2011). Einen Gegenpol und damit einen Regulationsmechanismus bieten Proteaseinhibitoren, die eine

überschießende Aktivität der Proteasen verhindern und damit die Integrität der EZM bewahren (Bonnans et al. 2014).

Bei der Metastasenentstehung von Krebszellen wird zwischen zwei Mechanismen unterschieden. Ein Weg geht ausschließlich mit der Verformung von Zellen bei der Wanderung durch die EZM einher und ist proteasenunabhängig. Der andere Mechanismus beschreibt eine Degradierung von extrazellulären Strukturen, was eine Migration von Tumorzellen durch die aufgelockerte EZM möglich macht. Hierbei spielen Proteasen die entscheidende Rolle (Wolf et al. 2011). Eine dichte EZM wird daher als protektiver Faktor gegen die Entstehung von Metastasen gesehen (Tian et al. 2013). Histopathologische Untersuchungen an Mammatumoren konnten zeigen, dass die Zusammensetzung der EZM prognostisch relevant ist. Nach Unterteilung in vier Subgruppen hatten die Patientinnen mit einer hohen Expression von Proteasen eine besonders schlechte Prognose, wohingegen Tumoren mit einer hohen Dichte an Proteaseinhibitoren mit einer deutlich besseren Prognose einhergingen (Bergamaschi et al. 2008).

Proteasen können die Metastasenentstehung durch eine Vielzahl an weiteren Funktionen unterstützen: Sie können Wachstumsfaktoren (Du et al. 2008), Chemokine (Van den Steen et al. 2003), intrazelluläre Signalkaskaden (Bruchard et al. 2013) und Zell-Zell-Kontakte beeinflussen (Sobotic et al. 2015) und so zu einem selektiven Überlebensvorteil des Tumors führen.

Daher konnte schon in einer Vielzahl an Arbeiten belegt werden, dass eine Überexpression von Proteasen bei Tumorerkrankungen mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Janicke et al. 1993, Nouh et al. 2011, Zhou et al. 2015, Yang et al. 2016).

1.4.3 Cathepsin B und das Mammakarzinom

Sloane et al. konnten 1981 erstmalig eine Assoziation zwischen Cathepsin B und dem Metastasierungspotential eines Tumors aufzeigen (Sloane et al. 1981). Seitdem wurde in vielen Studien bestätigt, dass eine Überexpression von Cathepsinen mit einer Prognoseverschlechterung einhergeht und das nicht nur in Tumoren der Mamma, sondern in weiteren Entitäten wie dem Bronchialkarzinom, kolorektalem Karzinom oder malignen Melanom (Gormley et al. 2011, Zhang et al. 2011, Gong et al. 2013). Im Magenkarzinom korreliert sowohl die Invasionstiefe als auch eine lymphatische Metastasierung mit der Expression von Cathepsin B (Dohchin et al. 2000). Für das inflammatorische Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass ein hoher Cathepsin B-Spiegel mit einem positiven

Lymphknotenstatus korreliert (Nouh et al. 2011). Die Inhibierung des Enzyms führte zu einer abgeschwächten extrazellulären Matrix-Degradierung und Invasion von Tumoren *in vitro* (Victor et al. 2011, Bengsch et al. 2014). Im Mausmodell ist die Hochregulation von Cathepsin B mit einem verstärkten Tumorwachstum assoziiert (Sevenich et al. 2011, Bengsch et al. 2014). Weiterhin konnte bei HER2 positiven Mammakarzinomen Cathepsin B als eine der Proteasen identifiziert werden, die für die Invasivität dieses Tumortyps verantwortlich ist (Rafn et al. 2012).

Im Mausmodell reduziert ein *knockdown* von Cathepsin B im Tumor sowohl die Kollagen-Degradation *in vitro*, als auch die Knochenmetastasierung *in vivo*. Durch die Gabe des Inhibitors von Cathepsin B, CA-074, kann die Rate der Knochenmetastasierung gesenkt werden (Withana et al. 2012).

Die Resultate dieser Beobachtungen, also vermehrte Proliferation und Invasion von malignen Zellen, sowie die Degradation der EZM, führen zu einer verstärkten Metastasierungstendenz des Tumors und erklären damit die Prognoseverschlechterung von Patienten mit Cathepsin B-Überexpression.

Ziel medizinischer Forschung ist neben dem genauen Verständnis physiologischer Vorgänge eine neue Strategieentwicklung zur Therapie von Krankheiten. In Studien ist evaluiert worden, ob sich Cathepsin B als prognostischer Marker bezüglich des Für und Wider einer Chemotherapie bei nodalnegativen Brustkrebspatientinnen mit G2-Tumoren eignen würde: Im Vergleich zu normalem Brustgewebe fand sich in Mammakarzinomgewebe ein bis zu 8fach erhöhter Spiegel von Cathepsin B. Außerdem korrelierte die Überexpression von Cathepsin B bei nodal negativen Brustkrebspatientinnen mit einem reduzierten krankheitsfreien Überleben (Levicar et al. 2002). Nach Auswertung der vorhandenen Daten hat sich allerdings die Bestimmung von uPA/PAI-1 durchgesetzt (siehe Kapitel 1.1 und (Schmidt 2008, Harbeck et al. 2013, Duffy et al. 2014)). Cathepsin B kann das Zymogen pro-uPA in seine aktive Form uPA umwandeln (Ikeda et al. 2000), korrelierte jedoch nicht mit dem Vorhandensein von uPA und PAI-1 im Mammakarzinom, was für einen unabhängigen Effekt der Protease spricht (Levicar et al. 2002).

Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt Cathepsin B ein interessantes Target der spezifischen systemischen Therapie von Brustkrebs dar: Aktuell wird ein Chemotherapeutikum entwickelt, welches erst spezifisch in der Umgebung des zu therapierenden Tumors aktiviert werden soll, um systemische Nebenwirkungen zu vermeiden. Hierfür wurde Paclitaxel, ein Taxan zur *first-line* Therapie beim Mammakarzinom, an ein hydrophiles Molekül gebunden. Erst durch die durch Cathepsin B vermittelte Spaltung der Moleküle entfaltet Paclitaxel seine zytotoxische

Wirkung speziell im Tumorgewebe, wodurch eine systemische Toxizität vermindert, die Toxizität in Bezug auf den Tumor jedoch maximiert werden soll (Satsangi et al. 2014, Satsangi et al. 2015). In der Zusammenschau wird deutlich, dass Cathepsin B eine Protease ist, die zur Invasivität und zum Metastasierungspotential des Mammakarzinoms beiträgt.

Welche Signale führen auf zellulärer Ebene zu einer Überexpression von Cathepsin B? Es konnte in der Brustkrebszelllinie MCF-10 gezeigt werden, dass eine Mutation von ras zu einer Umverteilung von Cathepsin B in Richtung Zellmembran und damit zu einer vermehrten Aktivität führt (Rozhin et al. 1994, Sloane et al. 1994). Welche Mechanismen jedoch genau zu der viel beschriebenen Expression von Cathepsin B führen, ist weiterhin unklar.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

CXCR3-Chemokine spielen eine wichtige Rolle zur Erkennung und Abtötung entarteter Zellen. Sie vermitteln Angiostase und können Immunzellen in Tumorgewebe locken, weshalb ihre Expression in vielen Tumoren mit einer verbesserten Prognose einhergeht. Gleichzeitig ist eine Überexpression von CXCR3 auf Krebszellen mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. Ziel dieser Arbeit ist es, einen der hierfür verantwortlichen Mechanismen zu beschreiben und zu diskutieren.

Cathepsin B ist eine Protease, die in Mammatumoren häufig überexprimiert ist, was mit einer verschlechterten Prognose einhergeht. Es konnte gezeigt werden, dass Cathepsin B zu den Proteasen gehört, die CXCR3-Liganden spalten kann. Eine Hypothese dieser Arbeit lautet, dass dieser Vorgang Teil eines physiologischen Feedback-Mechanismus darstellt. Die Ausschüttung von Chemokinen und Gradientenbildung in inflammatorischen Gewebe muss immer auch mit einem Abbau der CXCR3-Liganden einhergehen, damit eine überschießende Immunantwort verhindert werden kann. CXCR3-Liganden induzieren deswegen über Rezeptoraktivierung Cathepsin B, welches den Chemokingradienten wieder abbaut.

Geschieht dieser Vorgang in Tumorzellen entsteht ein Immunevasionsmechanismus, da sich der Tumor einen selektiven Überlebensvorteil verschaffen kann (Abbau der Chemokine und damit eine verringerte lymphozytäre Infiltration, sowie eine vermehrte Expression von Cathepsin B). Daher ist das Ziel dieser Arbeit, die Induktion von Cathepsin B durch CXCR3-Liganden zu untersuchen. Dabei werden sowohl die vermehrte Freisetzung, als auch die

vermehrte Genexpression von Cathepsin B durch CXCR3-Liganden gezeigt. Die für diesen Effekt verantwortlichen Signalwege werden beschrieben. Weiterhin wird die Bedeutung der beiden Rezeptorspleißvarianten CXCR3-A und CXCR3-B auf den genannten Immunevasionsmechanismus diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Verwendung	Firma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	SDS-Page	eBioscience, San Diego, CA, USA
Bromphenolblau	Puffer	Serva, Heidelberg, Deutschland
BSA (Rinderalbumin)	ELISA, Zellkultur, Rekonstitution von Chemikalien	Sigma, St. Louis, MN, USA
C&L Entwickler Typ E	Filmentwicklerlösung	C&L GmbH, Planegg, Deutschland
Complete + EDTA	Zellyse	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Proteaseninhibitormischung		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Zellkultur	Sigma, St. Louis, MN, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	ELISA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (1x) + Gluta MAXTM_1	Zellkultur	Sigma, St. Louis, MN, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium [+] 4.5 g/l D-Glucose [-] Pyruvate		
EC-Fixierer F 1000	Filmentwickler-Fixierlösung	Ernst Christiansen GmbH, Planegg, Deutschland
Ethanol (70%)	Desinfektion	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (99,9%)	Western Blot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Versen) 1% in PBS, w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Zellkultur	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
FCS (fetales Kalbserum)	Zellkultur	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Geneticin® G 418 Sulfat, 708 µg/mg	Zellkultur	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Glycin	Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES-Puffer (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Zellkultur	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Isopropylalkohol	Western Blot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	ELISA	RdH Laborchemikalien, Seelze, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	ELISA	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Arginin	Zellkultur	Sigma, St. Louis, MN, USA
L-Asparagin	Zellkultur	Sigma, St. Louis, MN, USA
Milchpulver	Western Blot	Sigma, St. Louis, MN, USA
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	MTT-Assay	Sigma, St. Louis, MN, USA

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Western Blot	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Zellyse	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxidlösung	pH-Adjustierung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Western Blot	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat	Zellyse	Sigma, St. Louis, MN, USA
Natriumpyrophosphat	Zellyse	Sigma, St. Louis, MN, USA
PageRuler™ Prestained Proteinmarker	SDS-PAGE	Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA
PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline)	Zellkultur	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Penicillin-Streptomycin (10000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin per ml)	Zellkultur	Sigma, St. Louis, MN, USA
Ponceau S	Western Blot	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese 40 (Acrylamid)	SDS-PAGE	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	pH-Adjustierung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure	ELISA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris (Ultrarein)	Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris Hydrochlorid	Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Zellyse, Puffer	Sigma, St. Louis, MN, USA
Trypanblau 0,4%	Zellkultur	Sigma, St. Louis, MN, USA
Trypsin/EDTA (10x) 0,5%/0,2% (w/v) in PBS, w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Zellkultur	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tween®-20	Puffer	Sigma, St. Louis, MN, USA
β-Glycerolphosphat	Zellyse	Sigma, St. Louis, MN, USA
β-Mercaptoethanol	Puffer / Western Blot	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien

2.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Firma, Produktnummer	Konzentration
Anti-Cathepsin B	Polyklonal, Ziege, IgG	R&D Systems	1:1000 in 5% BSA/PBST
Anti-CXCR3	Monoklonal, Maus, IgG1	R&D Systems, MAB160	5 x 10 ⁻⁵ mg/ml in 5% Milch/PBST
Anti-GAPDH	Monoklonal, Maus, IgG1	Merck Millipore, MAB374	1 x 10 ⁻⁵ mg/ml, Dilution je nach zuerst verwendetem Antikörper

Anti-Phospho-AKT (Ser473)	Monoklonal, Kaninchen	Cell Signaling, #4060	1:1000 in 5% BSA/TBST
Anti-Phospho-p44/42 (ERK1/2)	Monoklonal, Maus IgG1	Cell Signaling, #5726	1:1000 in 5% BSA/TBST
Anti-AKT (pan)	Monoklonal, Kaninchen	Cell Signaling, #4691	1:2000 in 5% BSA/TBST
Anti-p44/42 (ERK1/2)	Polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling, #9102	1:1000 in 5% BSA/TBST

Sekundäre Antikörper	Spezies	Firma, Bestellnummer	Verdünnung
Maus-anti-Ziege	Polyklonal, IgG (H+L)	R&D	1:10000
Ziege-anti-Kaninchen	Polyklonal, IgG (H+L)	Invitrogen, G-21234	1 x 10 ⁻⁵ mg/ml
Ziege-anti-Maus	Polyklonal, IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, 115-035-003	8 x 10 ⁻⁶ mg/ml

Tabelle 2.2: Verwendete Antikörper

2.1.3 Proteine

Protein	Verwendung	Firma
Rekombinantes humanes CXCL4	Stimulationsexperimente	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
Rekombinantes humanes CXCL9	Stimulationsexperimente	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA
Rekombinantes humanes CXCL10	Stimulationsexperimente	Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA

Tabelle 2.3: Verwendete Proteine

2.1.4 Hemmstoffe

Hemmstoff	Verwendung	Firma
LY294002	ELISA, MTT	R&D, Minneapolis, MN, USA
PD98059	ELISA, MTT, Western Blot	R&D, Minneapolis, MN, USA
PP1	ELISA, MTT	R&D, Minneapolis, MN, USA
SB203580	ELISA, MTT	R&D, Minneapolis, MN, USA
U0126	ELISA, MTT, Western Blot	R&D, Minneapolis, MN, USA

Tabelle 2.4: Verwendete Hemmstoffe

2.1.5 Kits

Kit	Verwendung	Firma
Human Total Cathepsin B DuoSet ELISA	ELISA	R&D, Minneapolis, MN USA
Pierce® ECL Western Blotting Substrate	Western Blot	Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Proteinbestimmung nach Lowry	Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL USA

Tabelle 2.5: Verwendete Kits

2.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Verwendung	Zusammensetzung
Blocklösung	Western Blot	TBS 1x pH 7.4 5% (w/v) Milchpulver 0.1% Tween®-20
Blocklösung	ELISA	PBS 1x pH 7.4 1% BSA
Gelelektrophoresepuffer 10x	SDS-Page	1.6 M Glycin 0.25 M Tris 1% (w/v) SDS
Laemmli Buffer 3x	SDS-Page	150 mM 1 M Tris/HCl pH 6,8 45% Glycerin 17% β-Mercaptoethanol

Lysepuffer Cathepsin B	Western Blot	15% SDS 0.01% Bromphenolblau 50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ 0,2 M NaCl 5 mM EDTA 1% Triton X-100
Lysepuffer MTT	MTT	End-pH 6,0 350 mMol SDS 10 mMol HCL
Lysepuffer Signalwege	Zellkultur, Stimulationen	TBS 1x pH 7.4 1% Triton X-100 0.1% (w/v) Complete™ + EDTA 50 mM NaF 10 mM Natriumpyrophosphat 1 mM Natrium Orthovanadate 1 mM β-Glycerinphosphat
PBS 10x (pH 7,4)	ELISA Zelllyse Zellkultur	1.4 M NaCl 61.8 mM·Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 26.83 mM KCl 14.7 mM KH ₂ PO ₄
PBST	ELISA	PBS 1x pH 7.4 0.05% (v/v) Tween®-20
Ponceau S	Western Blot	5% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Ponceau S
Probenauftragungspuffer	Western Blot	150 mM Tris-HCl 1 M pH 6,8 45% (/) Glycerin 17% (v/v) β-Mercaptoethanol 15% (w/v) SDS 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Sammelgel (4%)	SDS-Page	129 mM Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 5% (v/v) Acrylamid 0.1% (w/v) SDS 0.1% (w/v) APS 0.1% (v/v) TEMED
Semi-Dry Puffer	Western Blot	50 mM Tris 30 mM Glycin 20% (v/v) Ethanol 4‰ (w/v) SDS
Stopplösung	ELISA	1 N H ₂ SO ₄
Strip-Lösung nach Bernatz, pH 2,2	Western Blot	160 mM Glycin 1% (v/v) Tween®-20 0.1% (w/v) SDS
Substratlösung	ELISA	1:1 H ₂ O ₂ und Tetramethylbenzidin
TBS 10x (pH 7.4)	Western Blot	1.4 M NaCl

TBST	Western Blot	0.1 M Tris-HCl TBS 1x pH 7.4 0.1% (v/v) Tween-20
TBSTT	Proteinbestimmung	TBS 1x pH 7.4 0.1% (v/v) Triton X-100 0.05% (v/v) Tween®-20
Trenngel 12%	SDS-Page	375 mM Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 12% (v/v) Acrylamid 0.1% (w/v) SDS 0.05% (w/v) APS 0.05% (v/v) TEMED

Tabelle 2.6: Puffer und Lösungen

2.1.7 Laborzubehör

Zubehör	Verwendung	Firma
Blottingpapier MN 8273	Western Blot	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
96-Loch ELISA Platten, PS, F-Boden, MICROLON® 200, med. binding	ELISA	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Combitips® plus 2.5/5 ml		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Deckplatten	Zellkultur	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Entwicklerfilme CEA RP-new		Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgium
Minisart® sterile Filter 0.1/0.2 µm	Pufferherstellung	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Zellkultur	LO Laboroptik, Lancing, UK
Nitrocellulose Blotmembran Protran BA 85, Porengröße 0.45 µm	Western Blot	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Nunc-immuno™ 96-Lochplatten	Proteinbestimmung	Nunc, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Objektträger	Zellkultur	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pasteur-Glaspipetten	Zellkultur	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PVDF Transfermembran ROTI®-PVDF, Porengröße 0.45 µm	Western Blot	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Reaktionsgefäße ("Eppendorfreaktionsgefäß")		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße ("Falcons", 15/50 ml)		Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten (2/5/10/25/50 ml)		Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflaschen	Zellkultur	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturplatten	Zellkultur, MTT	Becton Dickinson Labware, Franklin

Zellschaber	Zellyse	Lakes, NJ, USA Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
-------------	---------	--

Tabelle 2.7: Verwendetes Laborzubehör**2.1.8 Geräte**

Gerät	Verwendung	Firma
Bandelin Sonopuls	Ultraschall-Homogenisator	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Cawomat 2000 IR	Filmentwickler	Cawo, Schrobenhausen, Deutschland
EV231	Stromversorgungsgerät	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Fast Blot	Elektrophorese	
	Semi-dry Western Blot	Biometra, Göttingen, Deutschland
	Kammer	
HERACELL 150i	Zellinkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Herasafe	Werkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IKA MAG® REO	Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Inkubator	Zellinkubator	Memmert GmbH, Schwabach, Germany
Mini-Protean® 3 Cell	SDS-PAGE Kammer	Biorad, Hercules, CA, USA
MS1 Minimixer	Vortexmixer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Multiskan FC	ELISA Messgerät	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Olympus CK30	Phasenkontrastmikroskop,	Olympus, Tokyo, Japan
	Zellkultur	
pH-Meter Lab 850	pH-Messgerät	Schott, Mainz, Deutschland
Polymax 2040	Schütteltisch	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Power Pac 300	Stromversorgungsgerät,	Biorad, Hercules, CA, USA
	Elektrophorese	
Purelab classic	Vollentsalztes Wasser	Elga GmbH, Wien, Österreich
Rotina 48 R	Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
SLT Spectra ELISA Reader, Software	ELISA Messgerät	SLT, Crailsheim, Deutschland
easyWIN fitting E 5.0 a		
Vortex Genie 2™	Vortexmixer	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge 54 24 R	Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.8: Verwendete Geräte

2.2 Zelllinien und ihre Kultivierung

Für diese Arbeit wurden die humanen Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T-47D verwendet, diese wurden von der American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA erworben.

Zelllinie	Ursprung	Expressionsmuster (Neve et al. 2006)
MCF-7	Invasiv duktales Karzinom, Pleurapunktat nach Chemotherapie	ER+, PR+, HER2-
MDA-MB-231	Adenokarzinom, Pleurapunktat nach Strahlentherapie	ER-, PR-, HER2-
T-47D	Invasiv duktales Karzinom, Pleurapunktat	ER+, PR+, HER2-

Tabelle 2.9: Verwendete Zelllinien. ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor, HER2 = *human epidermal growth factor receptor 2*

2.2.1 Kultivierung der MDA-MB-231, MCF-7 und T-47D Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C unter 5% CO₂ in einem Inkubator kultiviert. Als Kulturmedium diente DMEM (DMEM (1x) + Gluta MAXTM-I Dulbecco's Modified Eagle Medium [+] 4.5 g/l D-Glucose [-] Pyruvate, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), welches mit 10% FCS (w/v) (fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert bei 57 °C für 30 Minuten), 10 mM HEPES, 0,55 mM L-Arginin und 0,272 mM L-Asparagin versetzt wurde. Das Kulturmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt, wobei die Zellen dann eine Dichte von etwa 90% erreicht hatten. Zum Ablösen der Zellen aus den Zellkulturflaschen wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und für 5 Minuten mit 0,05% EDTA behandelt, um anschließend in Kulturmedium gelöst und zentrifugiert zu werden (330 g für 3 Minuten). Das Zellpellet wurde in Kulturmedium suspensiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Je nach Dichte wurde ein Anteil in eine neue Zellkulturflasche gegeben. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in 5% DMSO/FCS gelöst und in sterilen Gefäßen bei -80 °C aufbewahrt, zur längerfristigen Einlagerung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

2.2.2 Stimulationen der Zelllinien

Für Stimulationsexperimente und anschließender Auswertung per Western Blot wurden die Zellen wie in 2.2.1 beschrieben vorbehandelt. Mit Hilfe der Zählkammer wurde die Anzahl der

Zellen bestimmt. Es wurden je 5×10^5 Zellen in 2000 μl Kulturmedium auf eine 6 cm Platte ausgesät, für 2 Tage bis zur 70 %igen Konfluenz bei 37 °C bebrütet, um anschließend das Kulturmedium zu entfernen, die Zellen dreimal mit PBS zu waschen und dann mit serumfreiem Medium (DMEM (DMEM (1x) + Gluta MAXTM-I Dulbecco's Modified Eagle Medium [+]) 4.5 g/l D-Glucose [-] Pyruvate, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA mit 10 mM HEPES, 0,55 mM L-Arginin und 0,272 mM L-Asparagin) für erneute 24 Stunden inkubiert zu werden. 30 Minuten vor Stimulationsbeginn wurde das serumfreie Medium erneuert. Zur Stimulation wurden die Zellen mit 10 ng/ μl Chemokin inkubiert und dann zeitabhängig mit Lysepuffer (siehe 2.1.5) lysiert. Dazu wurden die Platten auf Eis gelegt, das Medium entfernt, zweimal mit PBS gewaschen und in Folge mit 250 μl Lysepuffer versetzt. Nach Abschaben mit einem Zellschaber wurden die Zellen in ein Eppendorfgefäß transferiert und 20 Minuten auf Eis gekühlt. Vor dem Einfrieren bei -20 °C wurden die Proben für 3 Sekunden mit Ultraschall behandelt.

Für die ELISA-Experimente wurden die Zellen ebenfalls wie in 2.2.1 beschrieben kultiviert. Nach Zählung der Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurden je 10^5 Zellen in 500 μl Kulturmedium auf eine 12-Lochplatte ausgesät, für 24 Stunden bis zur 70%igen Konfluenz bei 37 °C bebrütet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Am Folgetag wurde das hinzugegebene serumfreie Medium entfernt und je nach Experiment 30 Minuten vor Stimulationsbeginn 450 μl serumfreies Medium (siehe 3.2.2) oder 450 μl serumfreies Medium plus Hemmstoff/DMSO (siehe 3.3) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit den Chemokinen CXCL4, CXCL9 oder CXCL10 stimuliert (zur Kontrolle diente 5% BSA/PBS, Lösungsmedium der Chemokine). Die 12-Lochplatten wurden für 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt, danach wurde 400 μl des Überstands in Eppendorfgefäße transferiert, 20 Minuten auf Eis gekühlt und dann bei -20 °C tiefgefroren.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts eines Zelllysats wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt. Diese Methode basiert auf dem Nachweis von Peptidbindungen mittels der Biuretreaktion, bei der die Peptidbindungen einen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen eingehen, was zu einem blau-violetten Farbumschlag führt. In einem zweiten Schritt wird das zweiwertige Kupfer zu einwertigen Kupfer reduziert. Nach Zugabe der gelben

Folin-Ciocalteu-Reagenz erfolgt ein Farbumschlag von gelb zu blau, da das Reagenz vom Kupfer reduziert wird. Dieser Farbumschlag kann photometrisch bei 562 nm gemessen werden (Gornall et al. 1949, Lowry et al. 1951, Smith et al. 1985).

Zur Durchführung der Proteinbestimmung wurden die Proben langsam auf 4°C erwärmt und gemäß den Herstellerangaben des Assays weiterverarbeitet. Die Proben wurden 1:100 und 1:50 mit TBSTT verdünnt, gemischt und auf eine 96-Lochplatte aufgetragen. Anschließend wurden die Proben mit 200 µl der „Lowry“ Reagenz versetzt und abgedeckt für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 20 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz (abgedeckt über Nacht bei Raumtemperatur). Der Farbumschlag wurde am Folgetag bei 562 nm gemessen. Zur Berechnung des absoluten Proteingehalts wurde eine Standardkurve mit bekannter BSA-Konzentration in TBSTT verwendet.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um in einer Zelle ein spezielles Protein qualitativ und quantitativ bestimmen zu können, wird ein Zelllysate entlang eines Spannungsgradienten aufgetrennt. Dabei werden die Moleküle durch ein Acrylamidgel geleitet. Aufgrund ihrer Morphologie diffundieren große Moleküle deutlich langsamer als kleine Moleküle. Auch die Ladung der Proteine beeinflusst die Geschwindigkeit der diffundierenden Teilchen, da nur Anionen zur positiv geladenen Anode wandern. Um diesen Effekt zu minimieren, wird die Probe zuvor mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) inkubiert, was zu einer negativen Ladung aller Proteine führt. Um zu wissen, auf welcher Höhe das gesuchte Protein läuft, können Moleküle bekannter Größe parallel aufgetragen werden, die dann farbig zu sehen sind.

Zur Trennung der Proteine wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970). Die Proben wurden mit 3x Laemmli-Puffer und PBS auf einen Proteingehalt zwischen 7 µg/µl und 40 µg/µl angepasst und für 5 Minuten bei einer Zieltemperatur von etwa 95,3 °C denaturiert. Nach Zentrifugieren für 10 Sekunden mit einer Tischzentrifuge bei 200 g wurden 35 µl der Probe pro Geltasche aufgetragen. Die Proteine wurden in 4%igen Sammelgel bei 100 Volt für 1 Stunde konzentriert und im Anschluss in 12,5%igem Trenngel bei 100 Volt für etwa 2 Stunden aufgetrennt.

2.3.3 Immunoblot-Analyse

Zur Proteindetektion werden die der Größe nach aufgetrennten Moleküle auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) transferiert (außer der Cathepsin B-Immunoblot: hier

wurde eine Nitrocellulosemembran verwendet). Dieser Transfer erfolgt mit Hilfe eines elektrischen Felds, wobei die negativ geladenen Proteine entlang ihres elektrochemischen Gradienten in Richtung der Anode wandern. Für die Immundetektion einzelner Proteine können die Membranen mit Antikörpern inkubiert werden, die an ein Epitop des gesuchten Proteins binden. Um diese Bindungen nachzuweisen, erfolgt eine Inkubation mit einem Zweitantikörper, der an den ersten Antikörper bindet und selbst mit einem Enzym gekoppelt ist (meist Meerrettichperoxidase, kurz HRP von „*horseradish peroxidase*“). HRP wiederum katalysiert die Umsetzung von Luminol, was mit Lumineszenz verbunden ist. Diese kann per Film detektiert werden (Renart et al. 1979, Towbin et al. 1979).

Nach Benetzung mit 99%igem Ethanol wurde die Membran auf das Gel gelegt, mit in Semi-Dry-Puffer getränkten Filterpapieren beidseitig bedeckt und bei 75 mA pro Membran für 2 Stunden in eine Blotkammer gelegt. Zur Ladekontrolle erfolgte nach Waschen mit PBS die reversible Färbung mit Ponceau S.

Zur Blockierung von freien Proteinstellen der Membran wurde diese für eine Stunde mit 5% Milchpulver in PBST oder 5% BSA in PBST inkubiert (siehe unter Tabelle 2.2). Nach dreimaligem Waschen mit PBST für jeweils 5 Minuten erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern über Nacht bei 4 °C unter ständiger Durchmischung mittels eines Schütteltisches. Nach erneutem Waschen mit PBST (dreimalig für 5 Minuten) wurde die Membran mit dem jeweiligen Zweitantikörper versehen (1:10000 in 5% Milchpulver/PBST oder 5% BSA/PBST, je nach Erstantikörper, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch) und wieder wie vorbeschrieben gewaschen. Die Antikörperbindung wurde im nächsten Schritt mittels dem Pierce™ ECL Western Blotting Substrat (Anwendung gemäß Herstellerangaben) und des Cawomat 2000 IR Filmentwicklers auf einem Film nachgewiesen.

2.3.4 ELISA

Ein „enzymgekoppelter Immunadsorbtionstest“ (ELISA) basiert auf dem Nachweis eines Proteins mit Hilfe eines enzymatisch vermittelnden Farbumschlags. Hierfür wird eine 96-Lochplatte zunächst über 24 Stunden mit einem Antikörper („coating“ bzw. „capture“-Antikörper) inkubiert, welcher sowohl an die Platte, als auch an ein spezielles Epitop des gesuchten Proteins binden kann. Nach Waschen mit PBS wird die Platte zur Vermeidung unspezifischer Proteinbindungen für eine Stunde mit 1% BSA/PBS (Blocken) inkubiert. Nun erfolgt die Inkubation mit dem gesuchten Protein, bzw. mit der Lösung, in der das spezielle Protein nachgewiesen werden soll. Der „coating“-Antikörper bindet dabei an das gesuchte

Protein. Nach 2 Stunden kann die Platte gewaschen und erneut mit einem Antikörper inkubiert werden („detection“-Antikörper), welcher an ein anderes Epitop des Proteins bindet. Dabei entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Der „detection“-Antikörper ist mit einem Reporterenzym (häufig Meerrettichperoxidase) gekoppelt, welches ein chromogenes (farbgebendes) Substrat umsetzen kann. Nach Auswaschen von nicht-gebundenem Antikörper wird das Chromogen hinzugegeben, es erfolgt ein Farbumschlag. Dabei korreliert die Intensität der Farbe mit der Menge an nachgewiesenem Protein, sodass ein ELISA sowohl für eine qualitative als auch für eine quantitative Proteinbestimmung verwendet werden kann (Engvall et al. 1971, Van Weemen et al. 1971).

Zur Bestimmung der Cathepsin B-Freisetzung nach Stimulation mit Chemokinen wurden die Überstände, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, gewonnen. Im Anschluss erfolgte die Cathepsin B-Bestimmung mittels „Human Total Cathepsin B DuoSet ELISA“ gemäß den Angaben des Herstellers. Hierfür wurde eine 96-Lochplatte mit je 100 µl PBS/„*capture antibody*“ (Verdünnung 1:180) über Nacht bei Raumtemperatur (alle folgenden Schritte ebenfalls bei Raumtemperatur) inkubiert. Nach den nun folgenden Schritten wurde die Platte jeweils mindestens dreimal mit PBST gewaschen.

Zunächst wurde die Lochplatte mit je 250 µl für mindestens eine Stunde geblockt (1% BSA/PBS). Danach erfolgte die Inkubation von je 100 µl Probe bzw. eines BSA-Standards für mindestens 2 Stunden, sowie mit 100 µl des Erstantikörpers für ebenfalls 2 Stunden (Verdünnung: 1:180). Jeweils für 20 Minuten wurde die Platte mit je 100 µl Streptavidin-HRP (Verdünnung 1:200) bei Dunkelheit und im Anschluss mit je 100 µl Substratlösung (1:1 H₂O₂ und Tetramethylbenzidin, R&D Systems, DY999) inkubiert. Ohne erneutes Waschen wurde 20 µl Stopplösung (1 N H₂SO₄) hinzugegeben und die Proteinkonzentration bei 450 nm photometrisch und mit Hilfe eines ELISA-Readers (SLT-Spectra) ausgewertet. Zur Berechnung des absoluten Proteingehalts wurde eine Standardkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen in PBS erstellt.

2.3.5 MTT-Assay

Zur Evaluierung, ob Zellen nach Behandlung mit einem Signalkaskadeninhibitor in ihrer Zellvitalität und -teilung eingeschränkt wurden, wurde ein MTT-Assay verwendet (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid). Ein MTT-Assay basiert auf einem Farbumschlag von MTT, welcher durch Reduktion von NADH und NADPH entsteht. Damit spiegelt die Intensität des Farbumschlags die Glykolyse der verwendeten Zellen wider und kann

daher verwendet werden, um die Viabilität von einer Zellpopulation nachzuweisen (Mosmann 1983).

Um festzustellen, ob die verwendeten Hemmstoffe von Signalkaskaden die Viabilität von MDA-MB-231-Zellen signifikant beeinflussen, wurden je 5000 Zellen in drei 96-Lochplatten ausgesät und für 24 Stunden in DMEM bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, es erfolgte die Inkubation in Hungermedium für weitere 24 Stunden. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit den Signalweginhibitoren (Konzentration 10 mM, verwendete Hemmstoffe: U0126, LY294002, PP1, SB203580, PD98059) bzw. zur Kontrolle mit DMSO (Lösungssubstanz der Inhibitoren) für 24, 48 oder 72 Stunden stimuliert. Die Zellen wurden nach der angegebenen Zeit mit MTT versehen (Konzentration 0,2 mg/ml), zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend mit MTT-Lysepuffer lysiert. Nach erneuter Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde die Lochplatte am Folgetag bei 590 nm in einem ELISA-Reader (SLT-Spectra) photometrisch ausgemessen.

2.4 Statistische Auswertung

Zur Signifikanzberechnung wurde der Mann-Whitney-Test verwendet, ein parameterfreier statistischer Test (Mann et al. 1947). Der Signifikanzwert wurde als „p“ definiert. Dabei gibt „p“ die Wahrscheinlichkeit an, dieses Testergebnis zu erhalten, wenn die Nullhypothese wahr ist. Die Nullhypothese wurde ab einem $p < 0,05$ abgelehnt, ein Ergebnis von $p < 0,01$ wurde als sehr signifikant, ein Ergebnis von $p < 0,001$ als hoch signifikant eingestuft. In den Diagrammen wurden die Signifikanzniveaus folgendermaßen dargestellt: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$. Alle Gruppenpaare wurden mittels des Levenetests auf die Gleichheit der Varianzen überprüft. Dabei war $p < 0,05$ als signifikante Varianzunterschied definiert, sodass die Nullhypothese einer gleichen Varianzverteilung abgelehnt wurde (Levene 1960). In den Diagrammen wurden diese Gruppenpaare mit „x“ markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von CXCR3 mittels Western Blot in MDA-MB-231-, MCF-7- und T-47D-Zellen

Um Aussagen über den Effekt von Chemokinen auf Brustkrebszellen treffen zu können, müssen die verwendeten Zellen CXCR3 exprimieren. Daher wurden Zellen der Linien MCF-7, MDA-MB-231 und T-47D mittels Immunoblot untersucht. Es wurden 25 µg Gesamtprotein von zuvor lysierten Zellen durch SDS-Page aufgetrennt (siehe Kapitel 2), auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Hilfe des monoklonalen CXCR3-Antikörpers gefärbt. Als Referenz wurde eine Färbung mit GAPDH durchgeführt. In der Abbildung 3.1 sind Doppelbanden zu sehen, die den beiden Spleißvarianten CXCR3-A (ungefähr 41 kDa) und CXCR3-B (ungefähr 46 kDa) entsprechen. Alle untersuchten Zelllinien exprimieren vermehrt CXCR3-B.

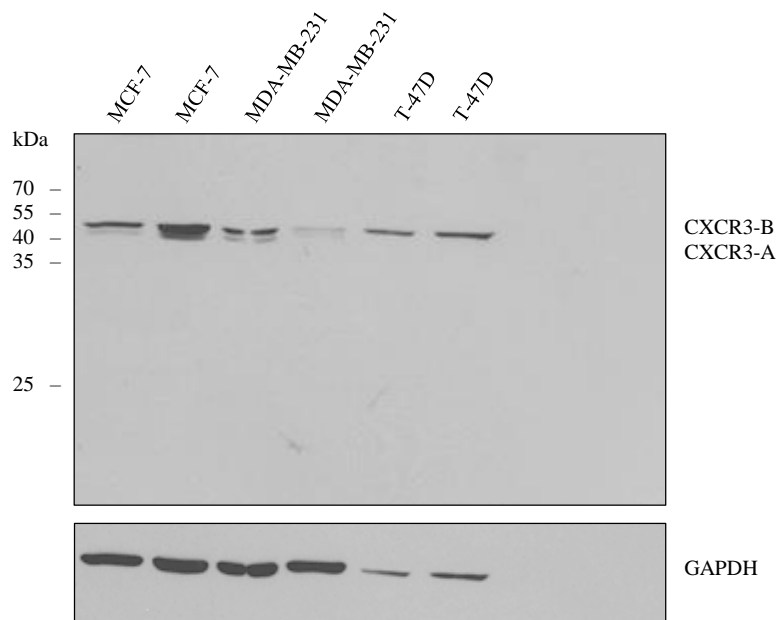


Abbildung 3.1: Nachweis der Expression von CXCR3 in den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T-47D.

Die Doppelbanden entsprechen den Spleißvarianten CXCR3-A und CXCR3-B.

3.2 Regulation von Procathepsin B und Cathepsin B nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231-Zellen

3.3.1 Regulation von Procathepsin B und Cathepsin B nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231-Zellen: Nachweis mittels Western Blot

Die vermehrte Expression von CXCR3 in Tumorzellen führt zu einem erhöhten Metastasierungspotential sowohl von Mammakarzinomzellen (Ma et al. 2009), als auch von anderen Tumorentitäten (Utsumi et al. 2014, Yang et al. 2016). Als eine Ursache konnte im Magenkarzinom die CXCR3-abhängige MMP-Produktion identifiziert werden (Zhou et al. 2016). Zur Klärung der Frage, ob auch in Mammakarzinomzellen die Stimulation mit CXCR3-Liganden zu einer vermehrten Proteasenexpression führt, wurde deren Effekt auf MDA-MB-231 und MCF-7-Zellen untersucht. Dafür wurden MDA-MB-231 und MCF-7 in 6 cm-Schalen ausgesät, bei 70%iger Konfluenz für 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert und anschließend mit CXCL4, CXCL9 oder CXCL10 (100 ng/ml) für 48 Stunden stimuliert. Dabei diente 1% BSA/PBS (Lösungsmedium der verwendeten Chemokine) als Kontrollstimulanz. Nach Lyse der Zellen wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein per SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. Dabei zeigt Abbildung 3.2, dass bei den Zellen der Zelllinie MDA-MB-231, die mit CXCL9 oder CXCL10 stimuliert wurden, Cathepsin B (31 kDa) und Procathepsin B (43 kDa) nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrollstimulation mit 1% BSA/PBS vermehrt exprimiert wurde. CXCL4 führte zu keiner wesentlichen Änderung der Cathepsin-B-Expression. Im Gegensatz zu CXCL9 und CXCL10, die beide Rezeptorspleißvarianten aktivieren, bindet CXCL4 selektiv an CXCR3-B (Lasagni et al. 2003). Nach densitometrischer Auswertung konnte die nach Stimulation mit CXCL9 oder CXCL10 signifikant gesteigerte Expression von Procathepsin B um etwa 50% quantitativ bestätigt werden. Die verwendeten MCF-7-Zellen exprimierten entgegen Literaturangaben kein Cathepsin B und wurden daher nicht weiter untersucht.

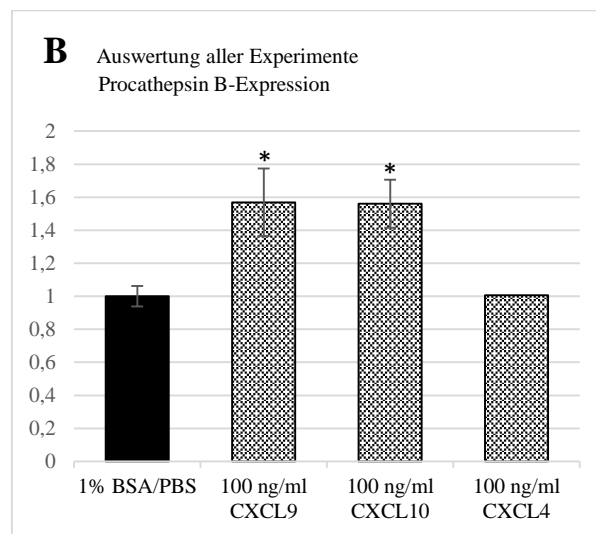
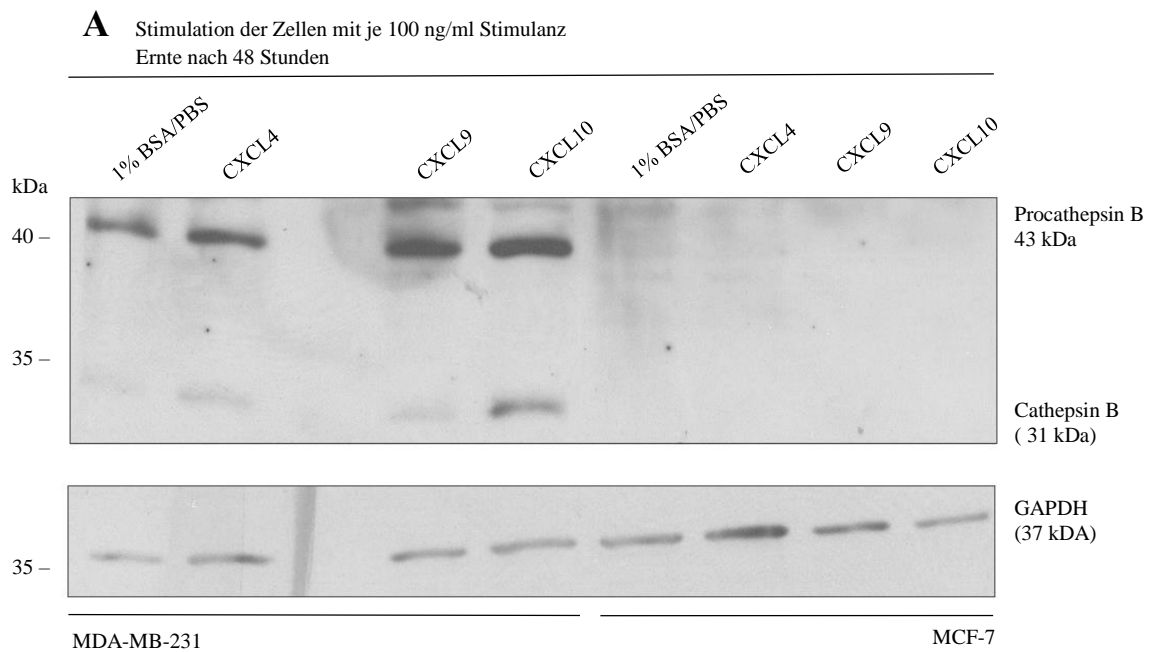


Abbildung 3.2: CXCL9 und CXCL10 induzieren die Expression von Cathepsin B.

MDA-MB-231 und MCF-7 wurden mit CXCL9, CXCL10 oder CXCL4 (100 ng/ml) stimuliert, als Kontrolle diente 1% BSA/PBS. Nach Lyse nach 48 Stunden wurde die Cathepsin B- und Procathepsin B-Expression per Western Blot ausgewertet. Der Versuch wurde mindestens drei Mal durchgeführt. **A** In MDA-MB-231 waren CXCL9 und CXCL10 potente Induktoren sowohl von Procathepsin B als auch von Cathepsin B (n=4). CXCL4, nur Induktor von CXCR3-B, führte zu keiner Signaländerung (n=1). Die verwendeten MCF-7 exprimierten kein Cathepsin B (n=1). **A** zeigt einen repräsentativen Western Blot. **B** Densiometrische Auswertung aller durchgeführten Versuche mit Scion Image. Aufgrund der schwachen Bandenfärbung von Cathepsin B wurde nur Procathepsin B ausgewertet. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich zur BSA/PBS-Kontrolle.

3.3.2 Regulation von Procathepsin B und Cathepsin B nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231-Zellen: Nachweis mittels ELISA

Die Induktion von Cathepsin B durch CXCL9 und CXCL10 konnte in Kapitel 3.3.1 per Western Blot gezeigt werden. Im Metastasierungsprozess *in vivo* spielen extrazelluläre Proteasen eine tragende Rolle. Es wurde daher überprüft, ob die vermehrte Expression von Cathepsin B nach Stimulation mit CXCL9 oder CXCL10 auch mit einer vermehrten Freisetzung nach extrazellulär einhergeht. Hierfür wurden MDA-MB-231 in 12-Lochplatten ausgesät, bei 70%iger Konfluenz für 24 Stunden mit serumfreien Medium inkubiert und anschließend mit CXCL9, CXCL10 oder CXCL4 für 48 Stunden stimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und mittels Cathepsin-B-ELISA untersucht. CXCL9 und CXCL10 erhöhten auch die Freisetzung von extrazellulärem Cathepsin B um etwa 20-40%. Diese Effekte waren sowohl nach einer Stimulationszeit von 24 als auch nach 48 Stunden nachweisbar (Abbildung 3.3). Die Stimulation mit CXCL4 führte zu keiner signifikanten Zunahme von Cathepsin B im Vergleich zur Kontrollstimulation mit 1 % BSA/PBS (selektive Bindung an CXCR3-B).

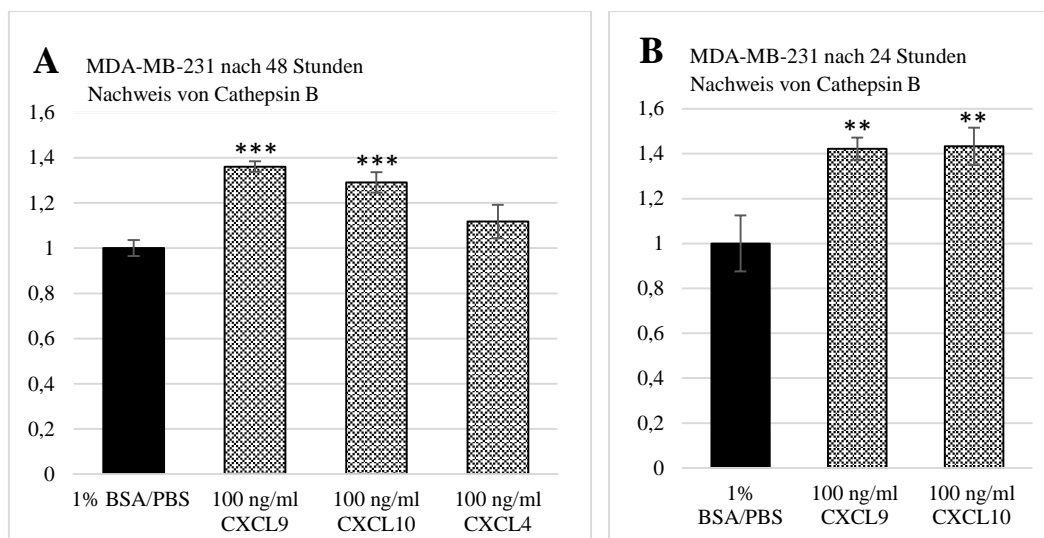


Abbildung 3.3: CXCL9 und CXCL10 induzieren die extrazelluläre Freisetzung von Cathepsin B.

MDA-MB-231 wurden für 48 bzw. 24 Stunden mit CXCL9, CXCL10 oder CXCL4 (100 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle diente 1% BSA/PBS (Lösungsmedium der Chemokine). Nach Stimulation der Zellen mit CXCL9 oder CXCL10 konnte sehr bis hoch signifikant mehr Cathepsin B im Überstand nachgewiesen werden, während die Stimulation mit CXCL4 nur einen geringen, nicht signifikanten Effekt auf die Cathepsin B-Freisetzung hat. **A** zeigt die Induktion nach 48 stündiger Stimulation (n=3), **B** nach 24 Stunden (n=2). Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich zur BSA/PBS-Kontrolle.

3.3 Verantwortlicher Signalweg für die CXCR3-abhängige Regulation von Cathepsin B in MDA-MB-231-Zellen

3.3.1 Untersuchung des ERK-Signalwegs mittels ELISA

In Kapitel 3.2 konnte gezeigt werden, dass CXCL9 und CXCL10 Cathepsin B in MDA-MB-231-Zellen induzieren können. CXCL4 führte zu keiner signifikanten Expressionsänderung. Während CXCL9 und CXCL10 beide Rezeptorspleißvarianten von CXCR3 aktivieren, bindet CXCL4 selektiv an CXCR3-B. Dies weist auf eine divergierende Rolle der beiden Rezeptorspleißvarianten bei der chemokininduzierten Cathepsin B-Freisetzung hin. Die Ligandenbindung an CXCR3-A kann zu einer Aktivierung der Signalwege ERK, AKT und Src führen (Bonacchi et al. 2001), während über eine Bindung an CXCR3-B vorwiegend p38 aktiviert wird (Petrai et al. 2008). Daher stellt sich die Frage, welcher Signalweg für die Expression von Cathepsin B nach CXCR3-Aktivierung verantwortlich ist. Es wurden MDA-MB-231 in 12-Lochplatten ausgesät, für 24 Stunden mit serumfreien Medium inkubiert und anschließend für 48 Stunden mit CXCL9 oder CXCL10 stimuliert. Es konnte eine vermehrte Freisetzung von Cathepsin B im Vergleich zur Kontrollstimulation beobachtet werden. Nach Inkubation der Zellen mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 (10 μ M, Hemmung des ERK-Signalwegs) hatte die Chemokinstimulation keinen Effekt mehr auf die Cathepsin-B-Ausschüttung. Um die basale Cathepsin B-Ausschüttung als Grundwert bestimmen zu können, wurden einige Zellen als Kontrolle mit 1% BSA/PBS (Lösungsmedium der Chemokine) und DMSO (Lösungsmedium der Signalweginhibitoren) behandelt. Dadurch ließ sich beobachten, dass die basale Cathepsin-B-Ausschüttung durch Hemmung der ERK-Signalkaskade um etwa 50% verringert wurde.

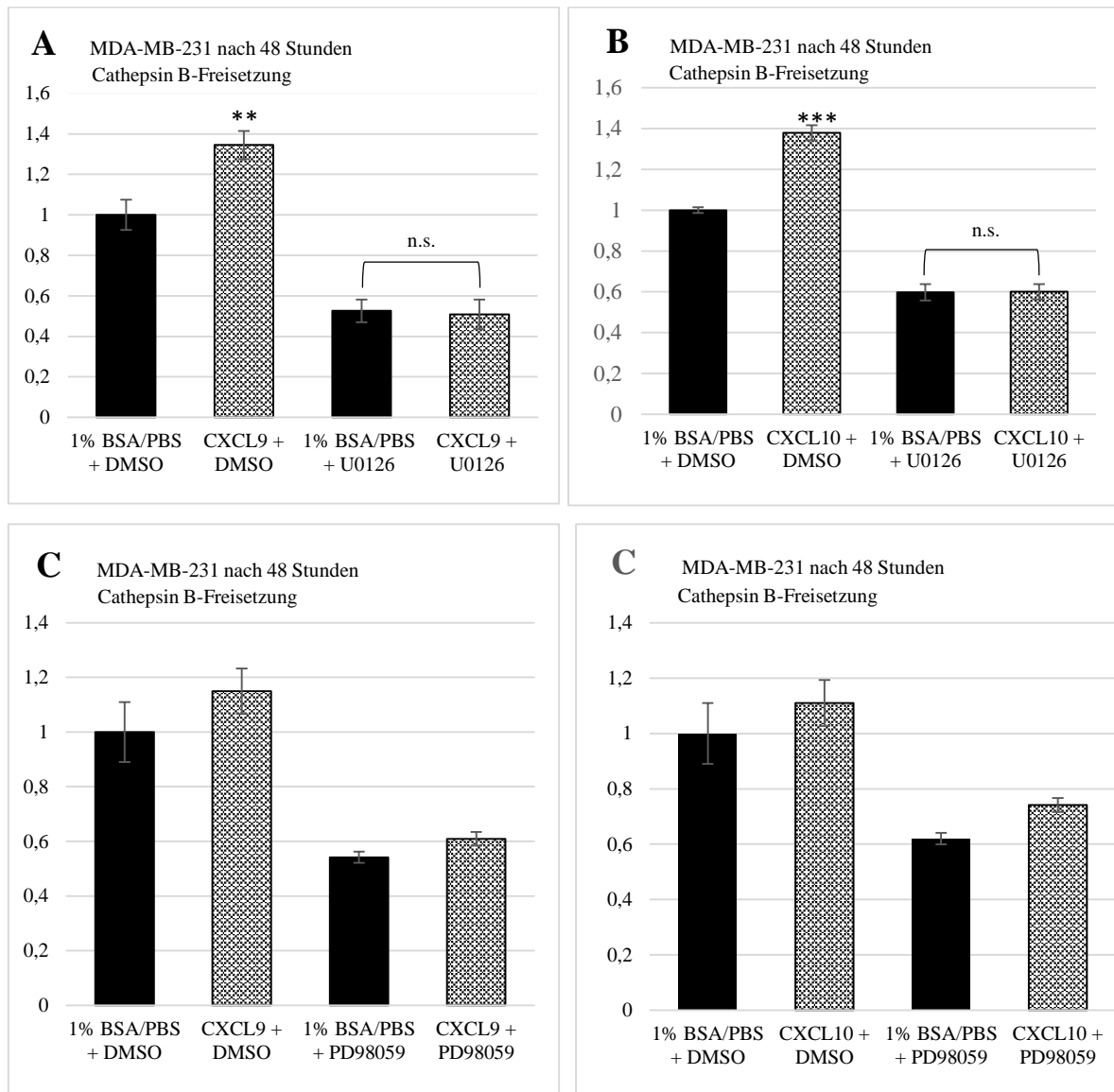


Abbildung 3.4: Der ERK-Signalweg ist an der chemokininduzierten Cathepsin B-Freisetzung beteiligt.

MDA-MB-231 wurden für 48 Stunden mit CXCL9 oder CXCL10 stimuliert. 1% BSA/PBS diente als Kontrolle. Weitere Zellen wurden vor der Stimulation mit U0126 oder PD98059 (MEK1/2-Inhibitoren) inkubiert, um die entsprechende MAPK auszuschalten. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA hinsichtlich der Cathepsin B-Freisetzung untersucht. Die Stimulation mit CXCL9 (**A**) und CXCL10 (**B**) hatte keinen Effekt auf die Cathepsin B-Ausschüttung, wenn die Zellen zuvor durch U0126 inkubiert wurden. Zusätzlich führte die Hemmung von ERK zu einer reduzierten basalen Cathepsin B-Freisetzung (n=3). **Abbildung C** und **D** zeigen, dass die Hemmung mit PD98059 den Chemokineffekt auf die Cathepsin B-Freisetzung nicht unterdrücken konnte (n=1). Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich zur BSA/PBS + DMSO-Kontrolle.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Versuche zu überprüfen, wurde neben U0126 auch der MEK1/2-Inhibitor PD98059 verwendet. Bei dem einmalig durchgeführten Experiment konnten die Chemokine CXCL9 bzw. CXCL10 auch bei den per PD98059 gehemmten Zellen eine gesteigerte Cathepsin-B-Expression bewirken, es zeigte sich eine Verringerung der basalen Cathepsin B-Freisetzung um 50%. Um dieses zunächst widersprüchliche Ergebnis erklären zu können, wurden die verwendeten Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit überprüft. Wie oben beschrieben wurden die Zellen in 12-Lochplatten ausgesät. Dabei wurden die Zellen jedoch nur mit U0126 und PD98059 in den Konzentrationen von 1 μM und 10 μM inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit DMSO, nicht aber mit einem Hemmstoff versetzt wurden. Die für 24 Stunden stimulierten Zellen wurden nach Abnahme der Überstände gewaschen und mit Hilfe eines Puffers lysiert und geerntet. Nach einer Proteinbestimmung wurden 35 μg Gesamtprotein per SDS-Page aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Phospho-p42/44 (ERK1/2) und Total-p42/44 (ERK1/2) gefärbt. Dabei zeigte sich, dass 10 μM von U0126 in der Lage sind, ERK potent zu hemmen, da kein phosphoryliertes ERK mehr nachweisbar war. Durch die Hemmung mit U0126 wurde auch die Menge an Total-p42/44 (ERK1/2) reduziert. Werden nur 1 μM verwendet, ist eine Restphosphorylierung von ERK zu erkennen. Im Gegensatz dazu lässt sich bei Verwendung von PD98059 auch bei 10 μM eine zwar verringerte, aber noch deutlich erkennbare aktive Form von ERK beobachten. 1 μM PD98059 hat kaum einen Effekt auf ERK. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine inkomplette Hemmung von ERK bereits die basale Freisetzung von Cathepsin B beeinflusst, für den Chemokineffekt allerdings eine suffiziente Hemmung des Signalwegs vorliegen muss.

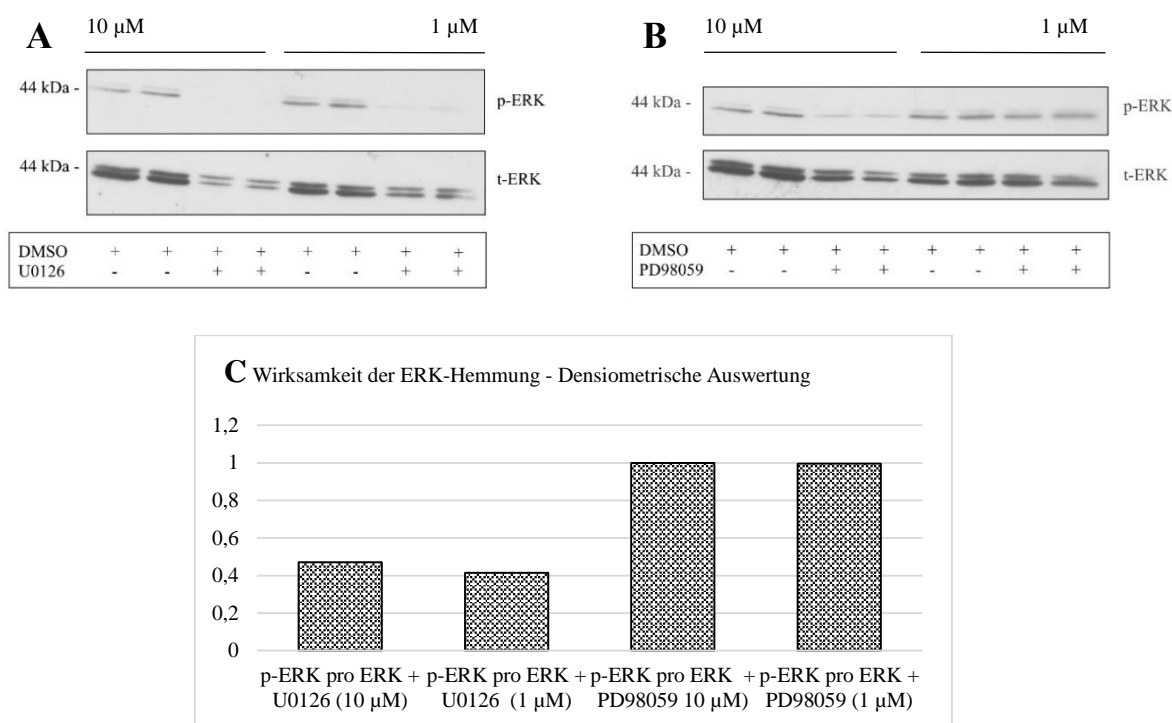


Abbildung 3.5: Wirksamkeit der ERK-Hemmung durch U0126 und PD98059.

MDA-MB-231-Zellen wurden mit den MEK1/2-Hemmstoffen U0126 oder PD98059 für 24 Stunden inkubiert, lysiert und mittels Western Blot analysiert. DMSO wurde als Kontrolle verwendet (Lösungsmedium der Hemmstoffe) (n=1). **A** zeigt, dass bei Verwendung von 10 µM U0126 kein Phospho-p42/44 mehr nachweisbar war, während 1 µM von U0126 eine geringe Restaktivierung von ERK zuließ. PD98059 übte bei gleicher Konzentration eine geringere Hemmung aus (**B**), sowohl bei 10 µM als auch bei 1 µM war ein Nachweis von Phospho-p42/44 möglich. (**C**) zeigt die densitometrische Auswertung der ERK-Hemmung.

3.3.2 Weitere Signalwege mittels ELISA

In 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass der ERK-Signalweg eine Rolle in der chemokininduzierten Cathepsin B-Freisetzung spielt. Durch die Aktivierung von CXCR3 können neben ERK auch AKT, Src und p38 aktiviert werden (Bonacchi et al. 2001, Petrai et al. 2008). Daher wurde das oben beschriebene Experiment ebenfalls mit den Inhibitoren PP1 (Src-Hemmstoff), SB203580 (Hemmstoff von p38) und LY294002 (Hemmstoff der Phosphoinositid-3-Kinase, aktiviert AKT) durchgeführt. In Vorversuchen zeigten sich vergleichbare Ergebnisse bei der Stimulation mit CXCL9 bzw. CXCL10, sodass bei den weiteren Versuchen nur CXCL10 als Stimulanz verwendet wurde. Als Inkubationszeit wurden 24 oder 48 Stunden gewählt. Im beschriebenen Versuchsaufbau konnte festgestellt werden, dass der Inhibitor LY294001 (Hemmstoff der Phosphoinositid-3-Kinase, aktiviert AKT) und der Src-Inhibitor PP1 ebenfalls in der Lage waren, den Effekt von CXCL10 auf die Cathepsin-B-Freisetzung zu unterdrücken. Es zeigte sich, dass LY294001 die basale Cathepsin-B-Expression um etwa 70% unterdrückt, PP1 um

40-50%. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stand die Hemmung des Signalwegs p38 durch SB203580. Hier war der Inhibitor nicht in der Lage, die chemokininduzierte Cathepsin B-Freisetzung zu blockieren. In zwei Versuchen führte die Verwendung von SB203580 zu einer Unterdrückung der basalen Chemokinsekretion, im dritten Versuch war die basale Freisetzung erhöht. Worauf dieser Effekt beruhte, ist unklar. Da die erhöhte Freisetzung von Cathepsin B in allen drei Versuchen nachweisbar war, wurde zur Signifikanzberechnung nur die Zellen verglichen, die jeweils mit Hemmstoff inkubiert waren.

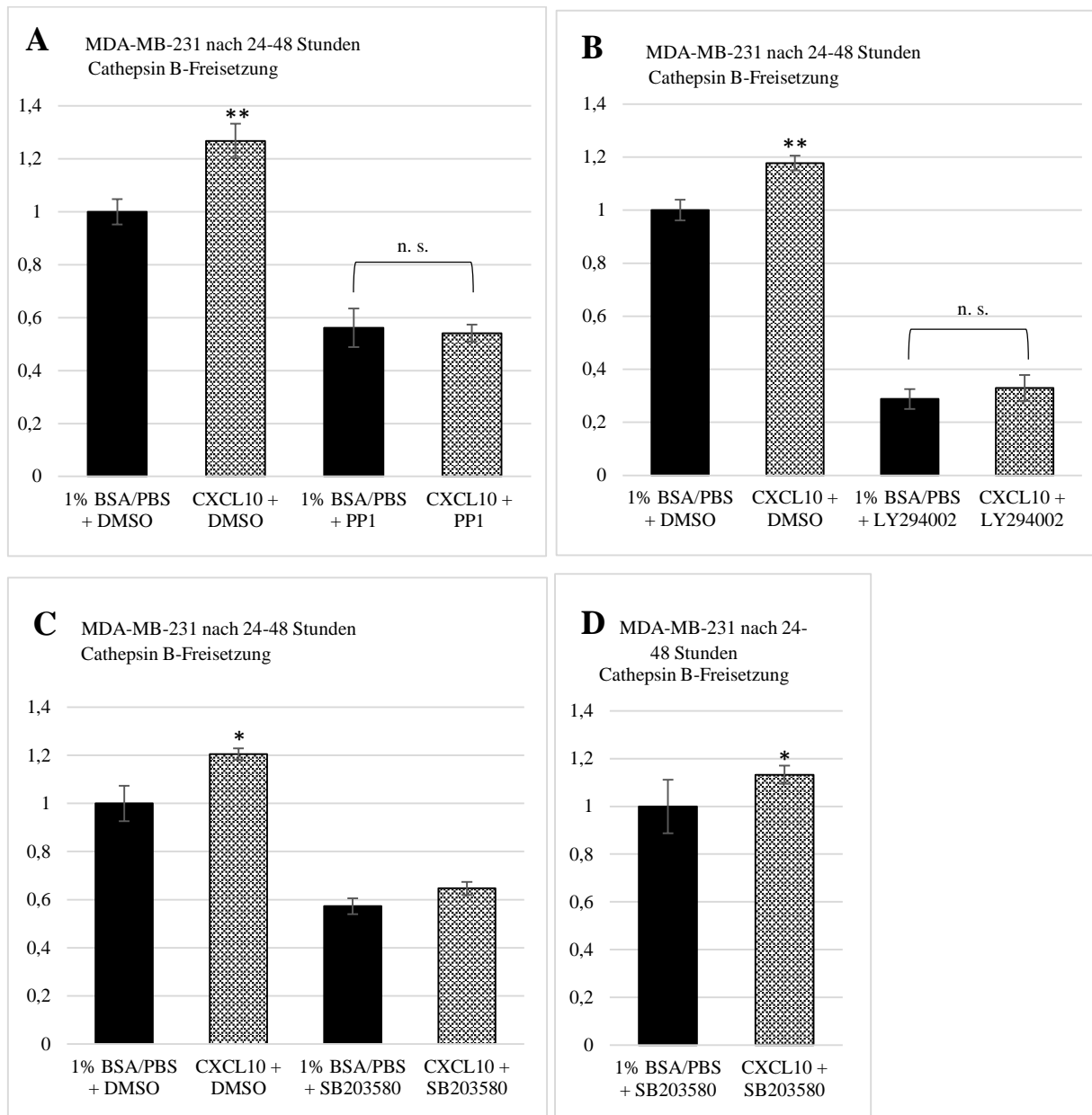


Abbildung 3.6: Src und AKT spielen eine Rolle in der chemokininduzierten Cathepsin B-Freisetzung, p38 jedoch nicht. MDA-MB-231 wurden mit den Hemmstoffen PP1 (Src-Signalweg), LY294002 (AKT-Signalweg) oder SB203580 (p38-Signalweg) für 24 oder 48 Stunden inkubiert, lysiert und mittels ELISA analysiert. DMSO wurde als Kontrolle verwendet (Lösungsmedium der Hemmstoffe) (n= jeweils 3). **A** und **B** zeigen, dass eine Hemmung von Src und AKT den Effekt von CXCL10 auf die Chemokinfreisetzung unterbinden konnte, während die Hemmung von SB203580 weiterhin einen Chemokinwirkung zuließ (**C**). Zur besseren Darstellbarkeit sind nur zwei Versuche abgebildet. (**D**) zeigt alle drei Versuche mit 1% BSA/PBS + Hemmstoff als Kontrolle, dabei führt die Stimulation mit CXCL10 zu einer signifikanten Änderung der Cathepsin B-Freisetzung.

3.3.3 Einfluss der Signalwegs-Inhibitoren auf das Zellwachstum

Für die veränderte basale Cathepsin B-Freisetzung durch die verwendeten Hemmstoffe gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Einmal weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Expression von Cathepsin über AKT, Src und ERK reguliert wird. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre ein verringertes Wachstum der behandelten Zellen. Es ist bekannt, dass die genannten Signalwege proliferativ stimulierend wirken. Werden nun die Zellen in ihrer Proliferation gehemmt, kann es im Vergleich zu normal wachsenden Zellen zur verringerten Freisetzung von Proteinen kommen, da insgesamt weniger Zellen vorhanden sind. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dabei wurden MDA-MB-231 in 96-Lochplatten ausgesät, 24 Stunden in serumfreien Medium und anschließend mit DMEM, DMSO (Trägersubstanz der Hemmstoffe), LY294002, U0126, PP1, SB203580 und PD98059 inkubiert. Nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen mit MTT für zwei Stunden inkubiert und anschließend über Nacht lysiert (jeweils bei 37°C). Am nächsten Tag erfolgte die photometrische Auswertung bei 590 nm. DMSO alleine führte bereits zu einer signifikanten Wachstumsminde rung nach 24 und 48 Stunden. Zu allen Zeitpunkten führte weder SB203580 (p38-Inhibitor) noch PD98059 (ERK-Inhibitor) zu einer Änderung des Zellwachstums. LY294002 (Hemmstoff der Phosphoinositid-3-Kinase, aktiviert AKT) senkte das Zellwachstum nach 24 Stunden um etwa 20%, nach 48 Stunden war das Wachstum um etwa 10% erhöht und nach 72 Stunden war kein Effekt mehr zu messen. Nach Inkubation mit U0126 (ERK-Inhibitor) zeigten die Zellen nach 48 und 72 Stunden ein signifikant vermindertes Wachstum um etwa 20%. Die Hemmung des Src-Signalwegs mittels PP1 führte stets zu einer hoch signifikanten Wachstumsminde rung, nach 24 und 48 Stunden um 20% und nach 72 Stunden um 40%.

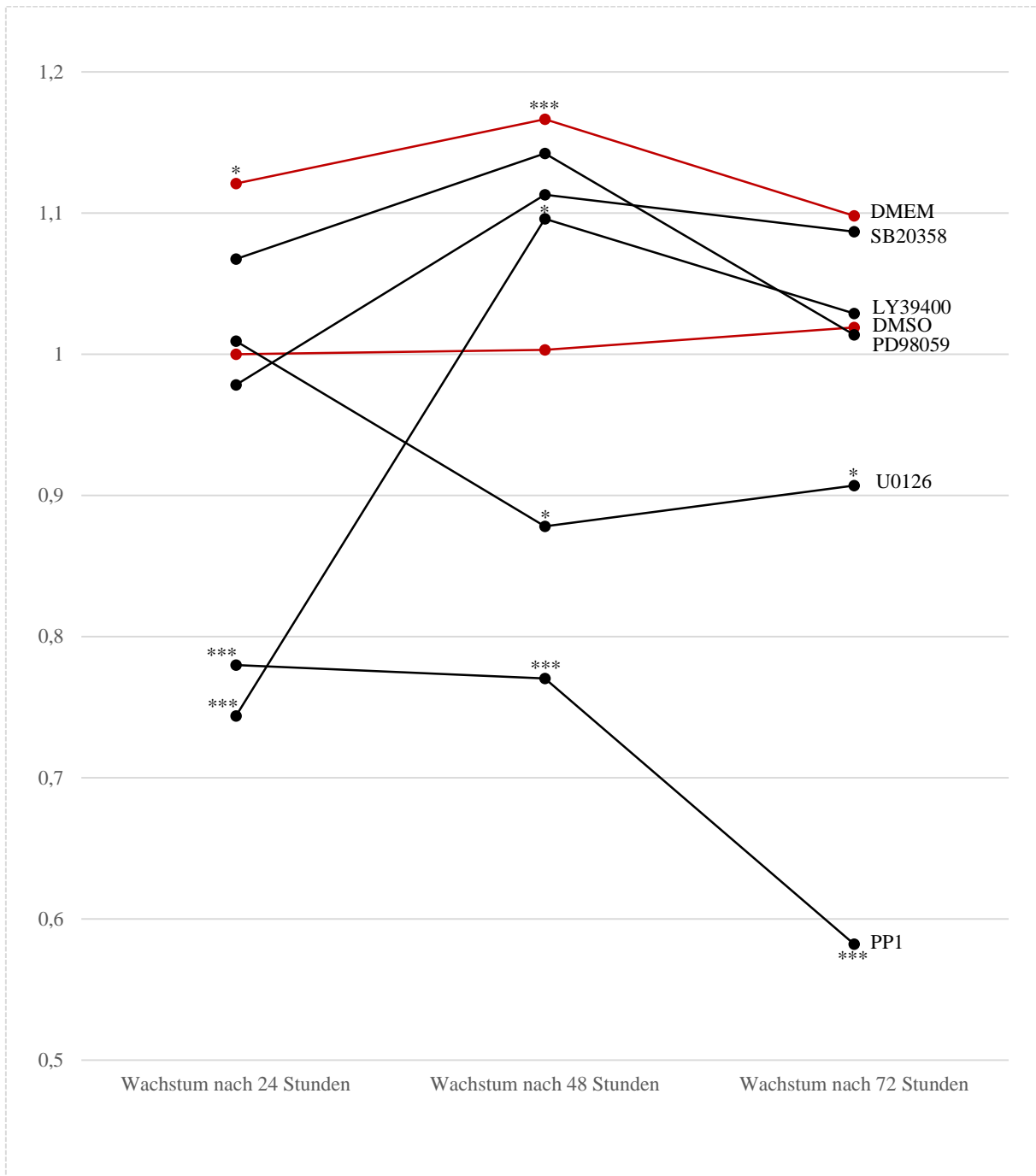


Abbildung 3.7: Überprüfung einer antiproliferativen Wirkung von Signalweginhibitoren auf MDA-MB-231-Zellen.

Die Zellen wurden mit den angegebenen Signalweginhibitoren inkubiert (10 μ M). Die Auswertung der Zellproliferation wurde mittels MTT-Assay durchgeführt. Dafür wurden die Zellen nach 24 Stunden, nach 48 Stunden und nach 72 Stunden mit MTT für 24 Stunden inkubiert und anschließend densitometrisch ausgemessen (n=3). Dabei bewirkte PP1 zu allen Zeitpunkten eine signifikante Wachstumshemmung, U0126 hemmte das Wachstum nach 48 und 72 Stunden signifikant und LY294002 führte zunächst zu einer Inhibition nach 24 Stunden bzw. zu einem vermehrten Zellwachstum nach 48 Stunden. Signifikanzniveaus: $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$, $p < 0,001 = ***$. Die Signifikanzangaben beziehen sich auf den Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

3.4 Aktivierung von Signalwegen durch CXCL9 und CXCL10 in MDA-MB-231-, MCF-7- und T-47D-Zellen

Die Ergebnisse in 3.2 und 3.3 legen nahe, dass durch die Stimulation der Zellen mit Chemokinen eine Beeinflussung des ERK-Signalwegs erfolgt. Die Regulation von Signalkaskaden ist zeitabhängig und sollte daher zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen werden (Sidahmed et al. 2012). Es wurden die Zelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und T-47D auf die zeitabhängige Phosphorylierung von ERK nach Chemokinstimulation untersucht. Dazu wurden die Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät, für 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert und anschließend mit 100 ng/ml Chemokin stimuliert. Nach 0 bzw. 2, 5, 10, 15, 30, 60, 120 Minuten und 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und lysiert. Nach einer Proteinbestimmung wurden jeweils gleiche Mengen (zwischen 10 µg und 40 µg) an Gesamtprotein per SDS-Page aufgetrennt. Durch den Übertrag der Proteine auf eine PVDF-Membran konnten die Banden anschließend mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes p42/44 (folgend p-ERK genannt) oder mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes p42/44 (folgend t-ERK genannt) gefärbt werden. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit 1% BSA/PBS ebenfalls zeitabhängig stimuliert (Lösungsmedium der Chemokine). Nach Stimulation von MDA-MB-231 mit CXCL9 konnte innerhalb der ersten Stunde eine Aktivierung von ERK festgestellt werden, welche nach 2 Stunden in eine Inaktivierung überging. Nach 24 Stunden war nur noch eine 70%ige Aktivierung festzustellen (verglichen mit Zeitpunkt 0). CXCL10 hingegen führte zu keiner Änderung der Grundaktivität. Nach 24 Stunden konnte in einem Versuch eine Inaktivierung, in einem zweiten eine Aktivierung beobachtet werden. Nach Inkubation mit 1% BSA/PBS konnten unspezifische Aktivierungen und Inaktivierungen nach allen Zeitpunkten beobachtet werden.

Bei Zellen der Zelllinie MCF-7 führte die Stimulation mit CXCL9 zunächst nach 2 Minuten zu einer Inaktivierung von ERK, die etwa 30 Minuten anhielt. Nach 2 Stunden konnte eine über 24 Stunden anhaltende, fast verdoppelte Aktivierung von ERK festgestellt werden. Auch CXCL10 verursachte zunächst eine Inaktivierung des Signalwegs mit einem *Punctum maximum* nach 10 Minuten. Nach 24 Stunden war die ERK-Aktivität im Vergleich zum Ausgangswert um 50% gesteigert. Nach Stimulation der Zellen mit 1% BSA/PBS (Lösungsmedium der Chemokine) kam es ebenfalls zu unspezifischen Aktivierungen und Deaktivierungen von ERK.

Die Stimulation von T-47D mit CXCL9 führte nach 24 Stunden zu einer starken ERK-Aktivierung, nach Stimulation mit CXCL10 ließ sich kein relevanter Effekt feststellen. Am stärksten war die ERK-Aktivierung jedoch nach Stimulation mit 1% BSA/PBS (Kontrolle) ausgeprägt.

Um einen etwaigen Effekt von BSA/PBS (Lösungsmedium der Chemokine) auf die ERK-Phosphorylierung nicht als Chemokineffekt zu interpretieren, wurde bei der densitometrischen Auswertung die Werte der Kontrolle von den Stimulationswerten mit CXCL9 bzw. CXCL10 abgezogen.

3.4.1 Regulation von p-ERK/ERK nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231-Zellen

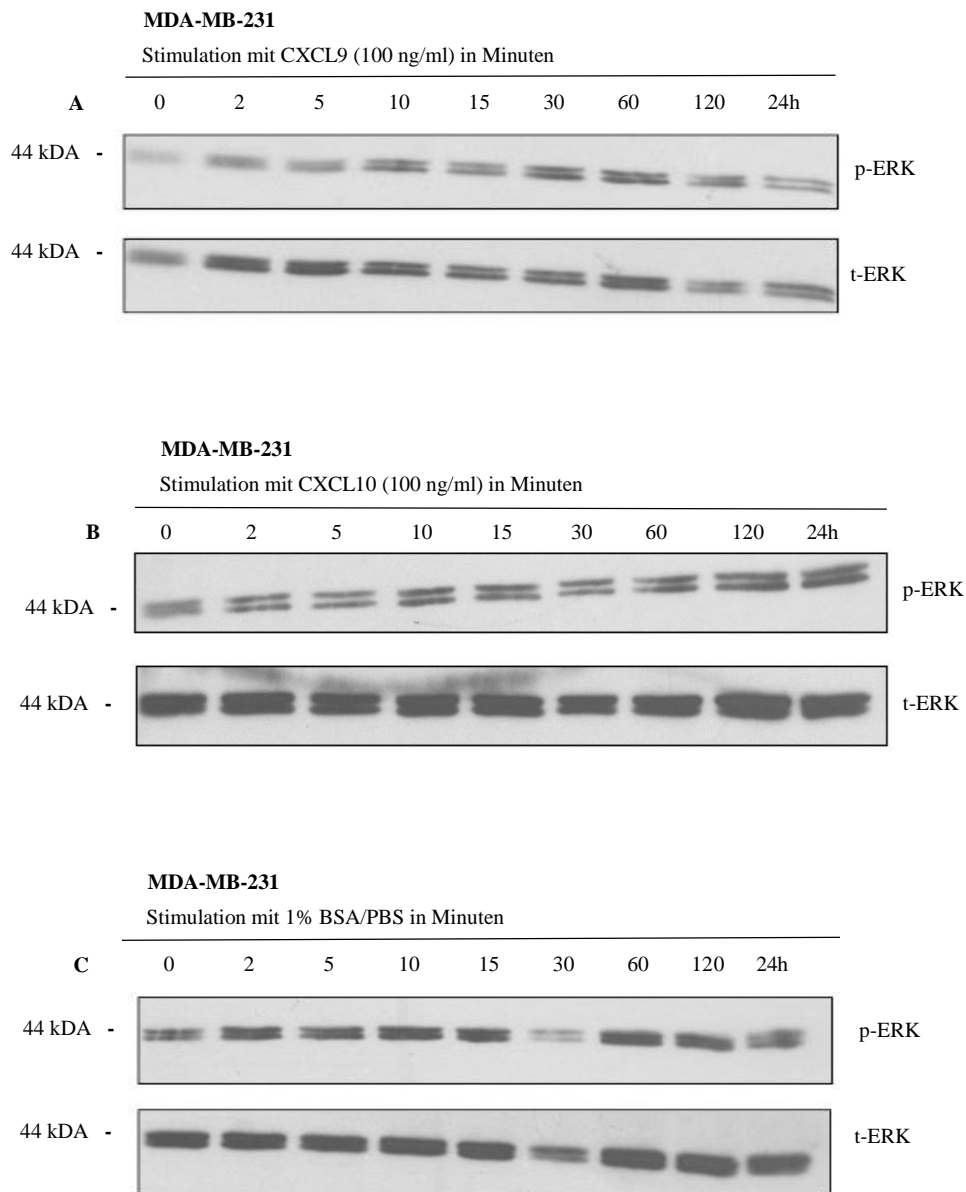


Abbildung 3.8: Induktion des ERK-Signalwegs durch CXCR3-Liganden in MDA-MB-231.

Die Zellen wurden 24 Stunden gehungert und anschließend mit 100 ng/ml CXCL9 (**A**) oder CXCL10 (**B**) stimuliert. Als Kontrolle diente 1% BSA/PBS (Lösungsmedium von CXCL9 und 10) (**C**). Anschließend wurden die Zellen nach der angegebenen Zeit lysiert, geerntet und per Western Blot ausgewertet (n=3). Nach Stimulation mit CXCL9 war nach 24 Stunden weniger p-ERK nachweisbar. CXCL10 führte nach 24 Stunden zu einer vermehrten p-ERK-Expression. In der Kontrolle mit 1% BSA/PBS sind ebenfalls unspezifische Aktivierungen zu sehen, die nicht reproduzierbar waren.

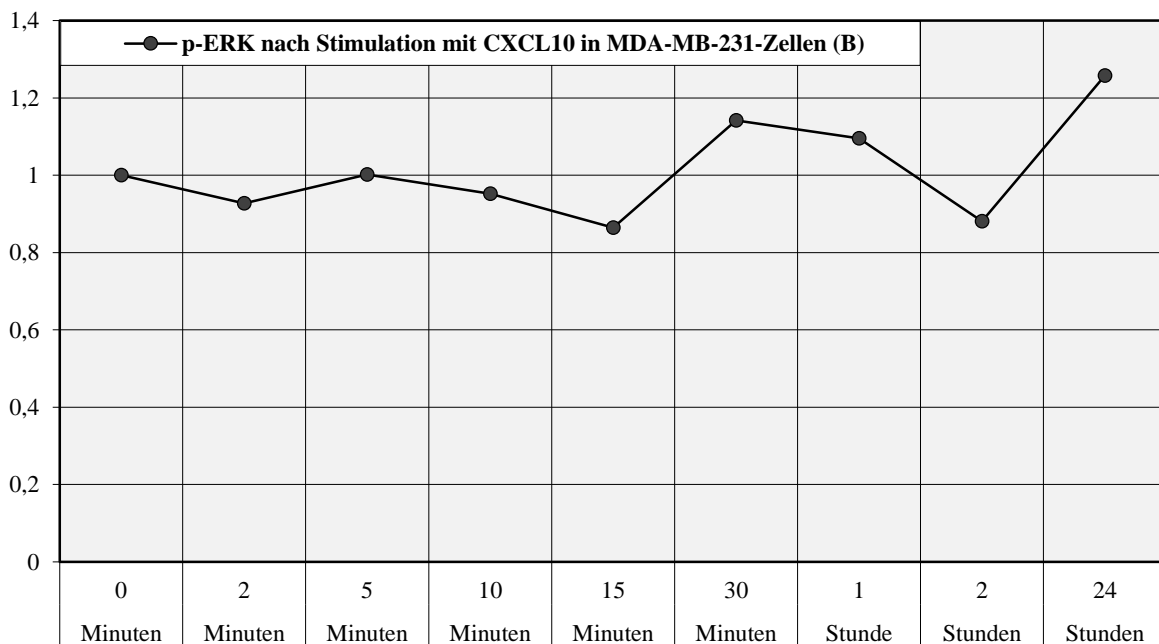
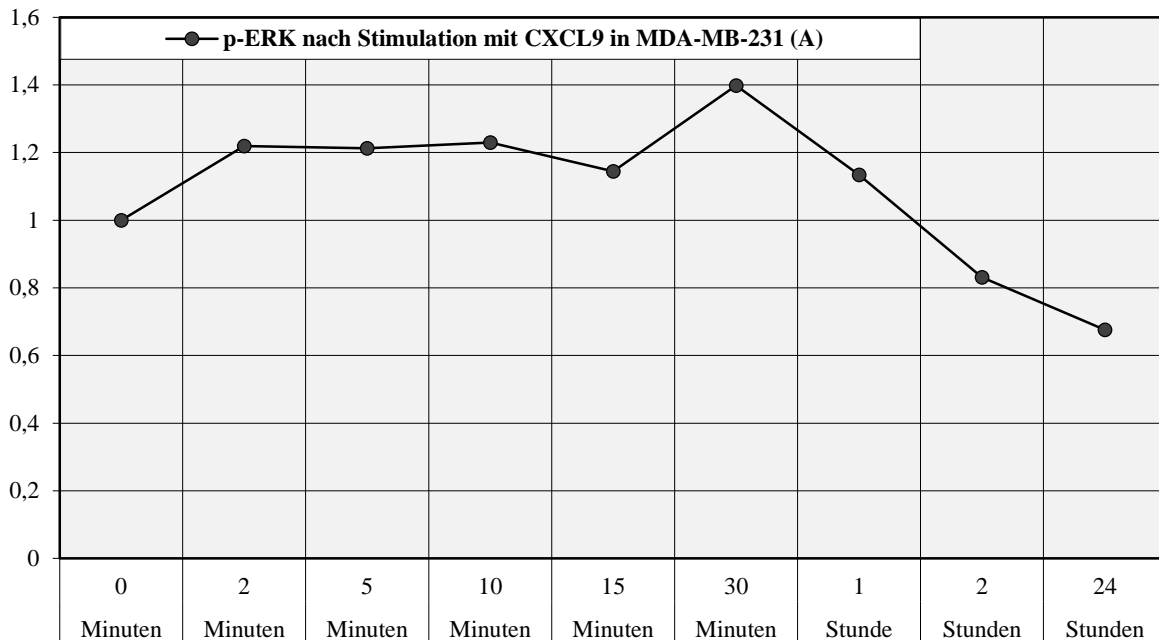


Abbildung 3.9: Induktion des ERK-Signalwegs durch CXCR3-Liganden in MDA-MB-231-Zellen.

Densiometrische Auswertung von 3.8. Um einen etwaigen Effekt von BSA/PBS (Lösungsmedium der Chemokine) auf die ERK-Phosphorylierung nicht als Chemokineffekt zu interpretieren, wurde die Kontrolle abgezogen. (A) CXCL9 führte zu allen Zeitpunkten innerhalb einer Stunde zu einer vermehrten ERK-Phosphorylierung. Nach 24 Stunden war eine verminderte Aktivierung von ERK messbar. (B) CXCL10 hemmte die ERK-Phosphorylierung nach 15 Minuten und 2 Stunden. Zwischen 2 und 5 Minuten war die ERK-Aktivität ähnlich der Ausgangsaktivität. Nach 24 Stunden ließ sich eine vermehrte ERK-Phosphorylierung messen.

3.4.2 Regulation von p-ERK/ERK nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MCF-7-Zellen

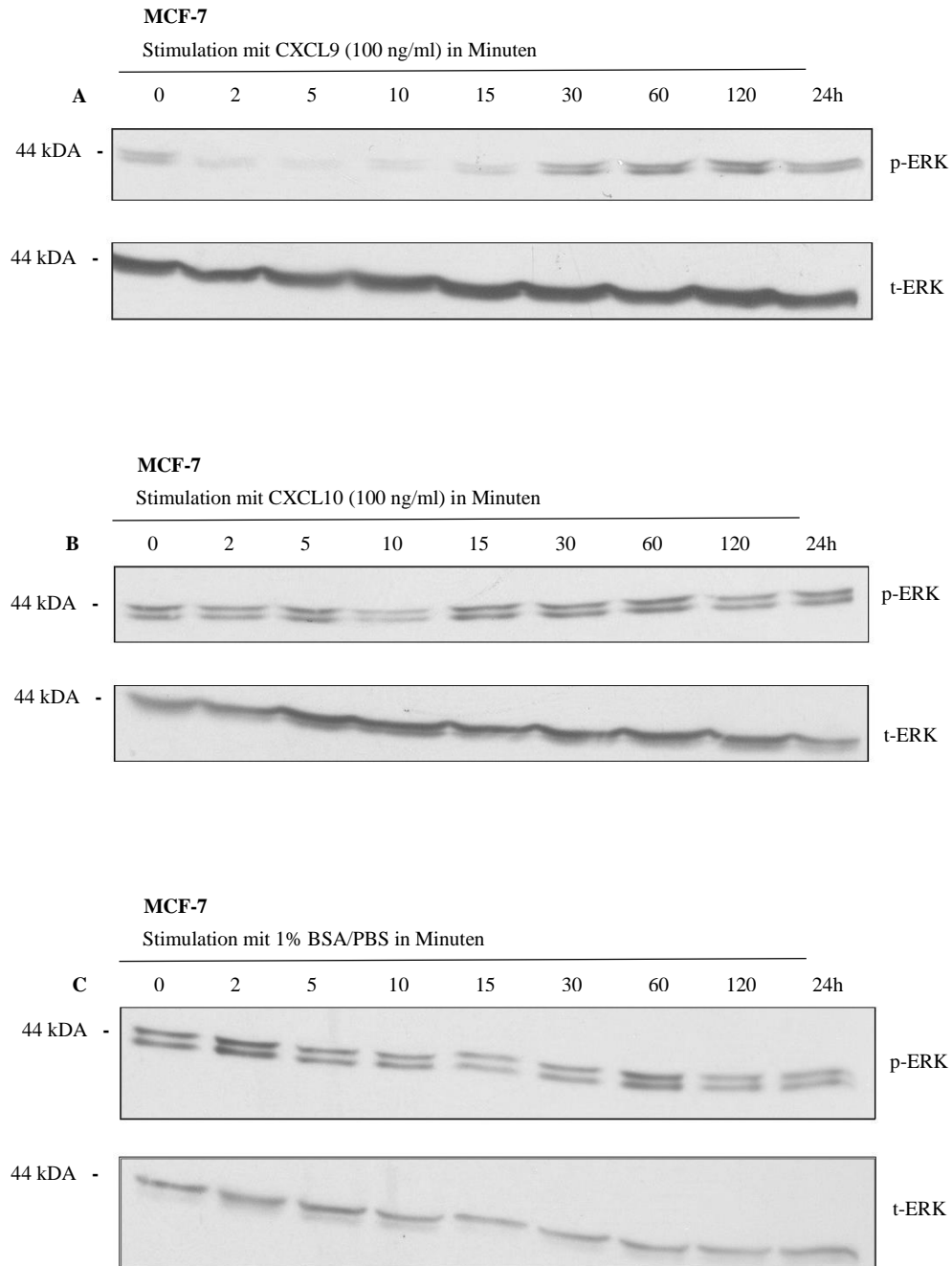


Abbildung 3.10: Induktion des ERK-Signalwegs durch CXCR3-Liganden in MCF-7-Zellen.

Die Zellen wurden 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert und anschließend mit 100 ng/ml CXCL9 (A) oder CXCL10 (B) stimuliert. Als Kontrolle diente 1% BSA/PBS (Lösungsmedium von CXCL9 und CXCL10) (C). Anschließend wurden die Zellen nach der angegebenen Zeit lysiert, geerntet und per Western Blot ausgewertet (n=3). Die Banden, die p-ERK entsprechen, waren innerhalb von 30 Minuten abgeschwächt und nach 24 Stunden vermehrt angefärbt. In der Kontrolle waren ebenfalls unspezifische Aktivierungen zu sehen, die nicht reproduzierbar waren.

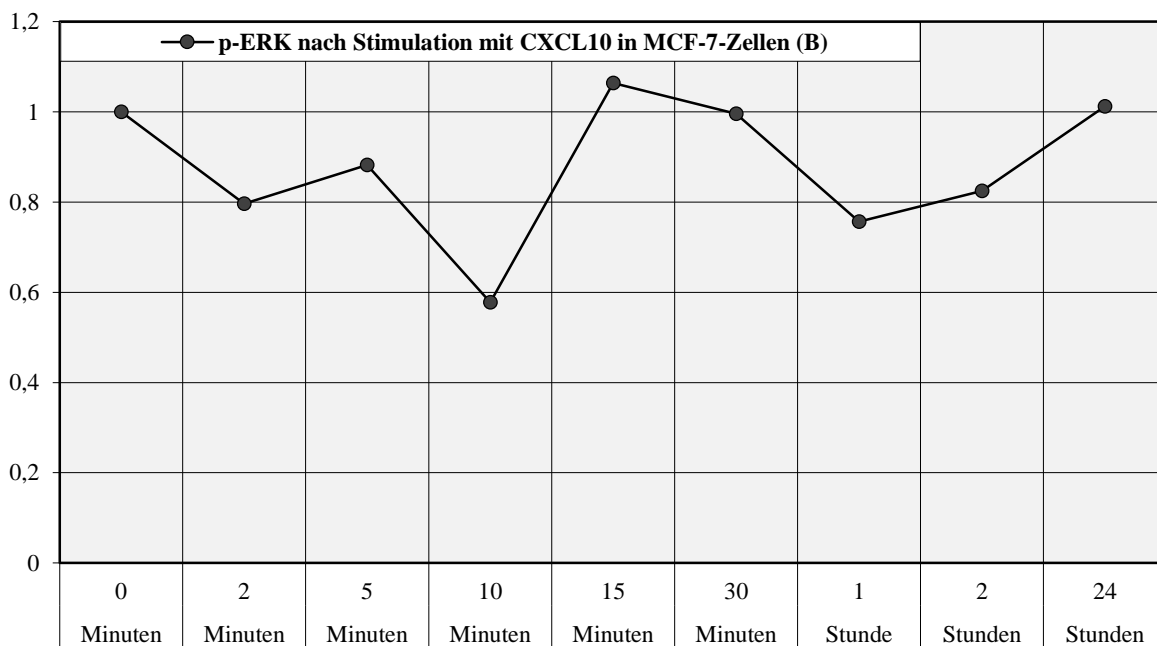
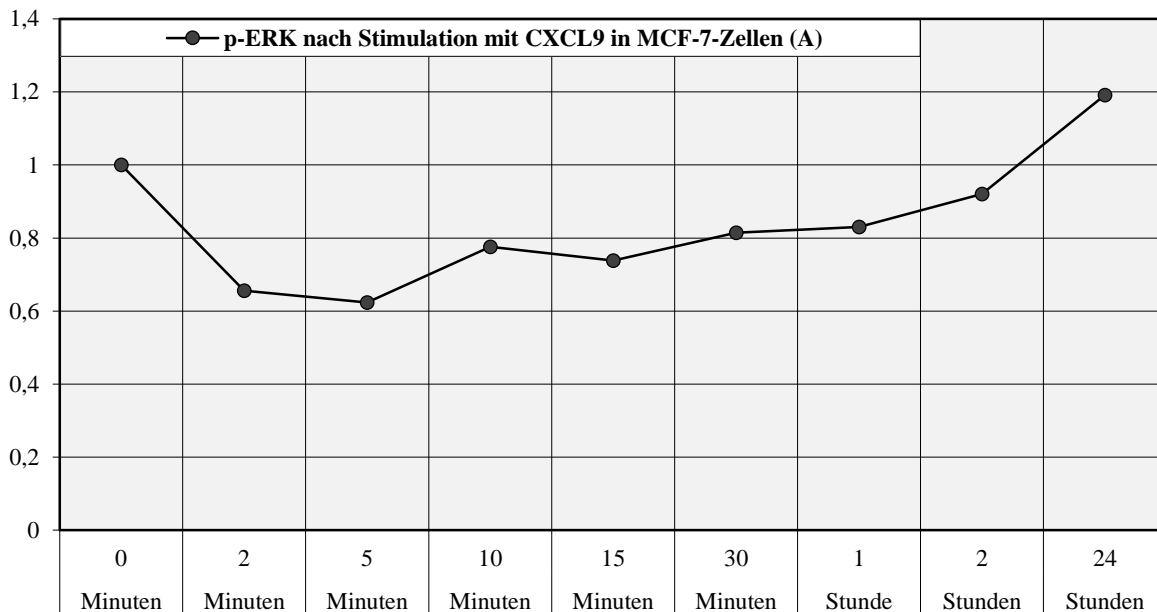


Abbildung 3.11: Induktion des ERK-Signalwegs durch CXCR3-Liganden in MCF-7.

Densitometrische Auswertung von 3.10. Um einen etwaigen Effekt von BSA/PBS (Lösungsmedium der Chemokine) auf die ERK-Phosphorylierung nicht als Chemokineffekt zu interpretieren, wurde die Kontrolle abgezogen. **(A)** CXCL9 führte zwischen 2 Minuten und zwei Stunden zu einer verminderten ERK-Phosphorylierung, wobei dieser Effekt nach 5 Minuten den *Punctum maximum* erreichte. Nach 24 Stunden war eine vermehrte Aktivierung von ERK messbar. **(B)** CXCL10 hemmte die ERK-Phosphorylierung innerhalb von 2 bis 10 Minuten, sowie nach 1 und 2 Stunden. Nach 15 bzw. 30 Minuten und nach 24 Stunden war die ERK-Aktivität ähnlich der Ausgangsaktivität.

3.4.3 Regulation von p-ERK/ERK nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in T-47D-Zellen

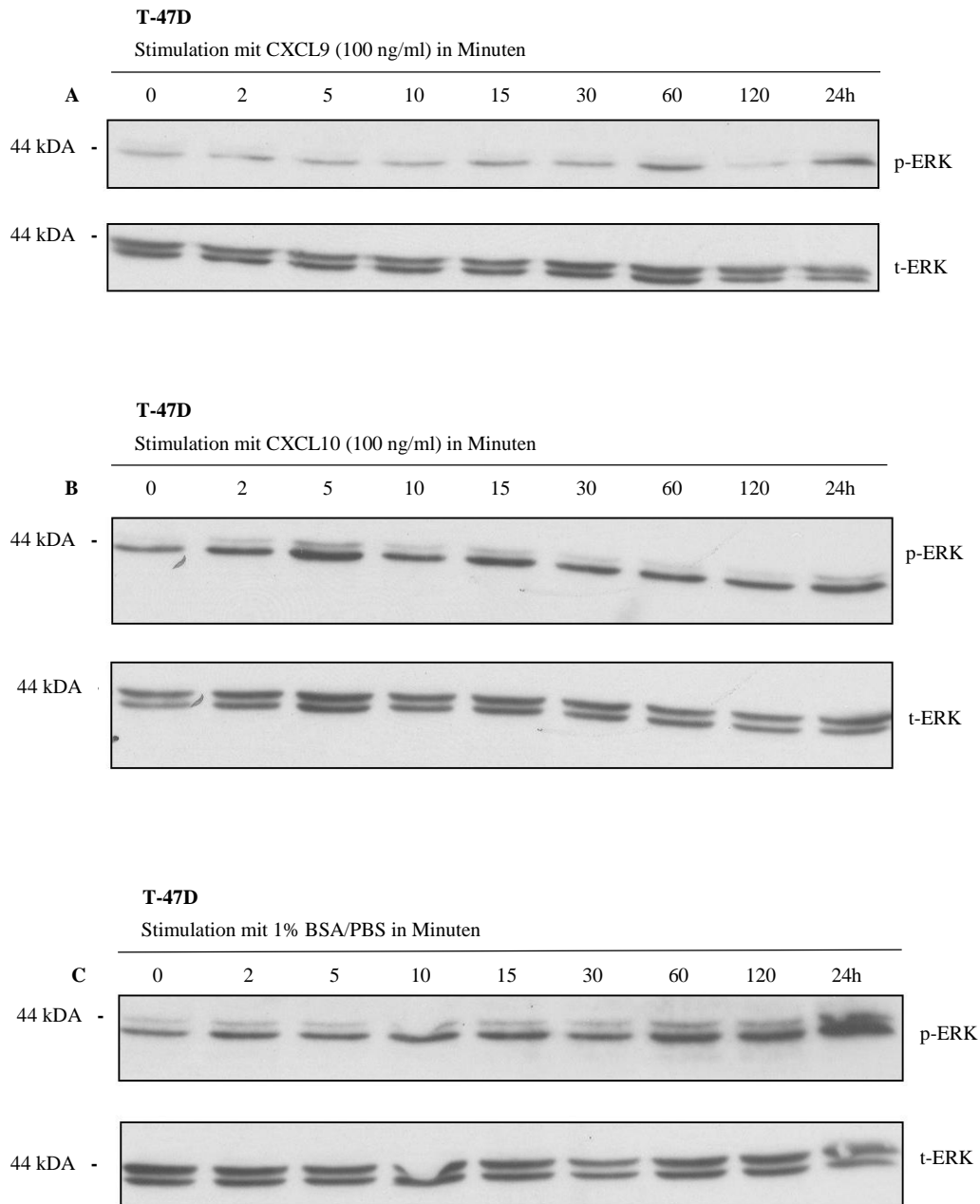


Abbildung 3.12: Induktion des ERK-Signalwegs durch CXCR3-Liganden in T-47D.

Die Zellen wurden 24 Stunden in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit 100 ng/ml CXCL9 (A) oder CXCL10 (B) stimuliert. Als Kontrolle diente 1% BSA/PBS (Lösungsmedium von CXCL9 und CXCL10) (C). Anschließend wurden die Zellen nach der angegebenen Zeit lysiert, geerntet und per Western Blot ausgewertet (n=3). In allen Versuchen konnte nach 24 Stunden eine ERK-Aktivierung beobachtet werden, wobei diese im Kontrollversuch am deutlichsten war.

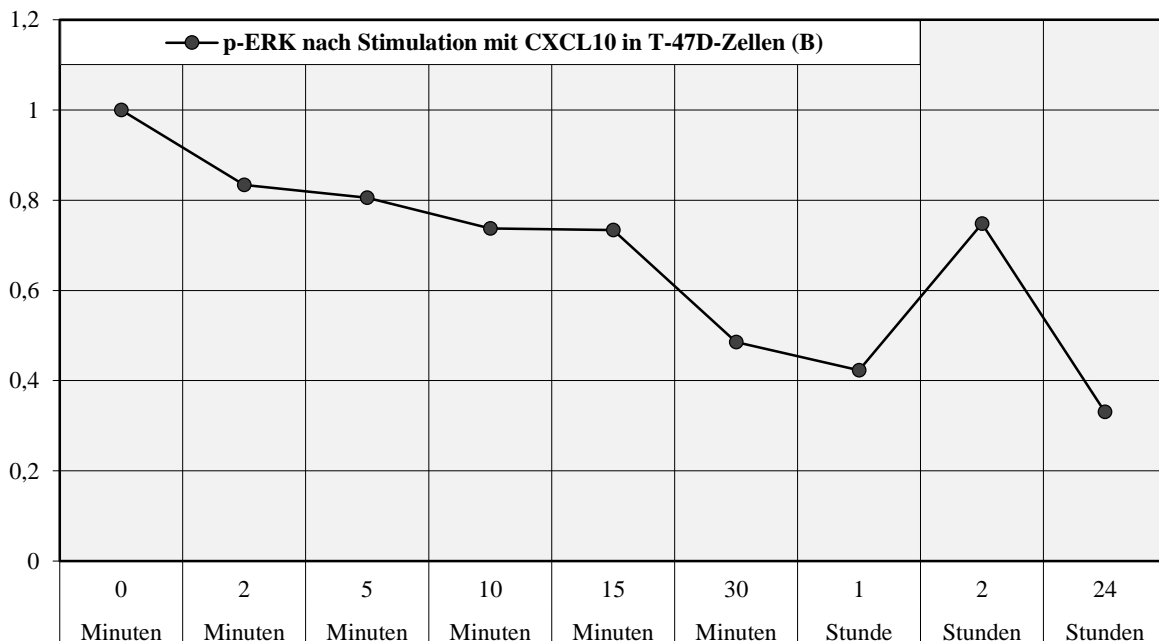
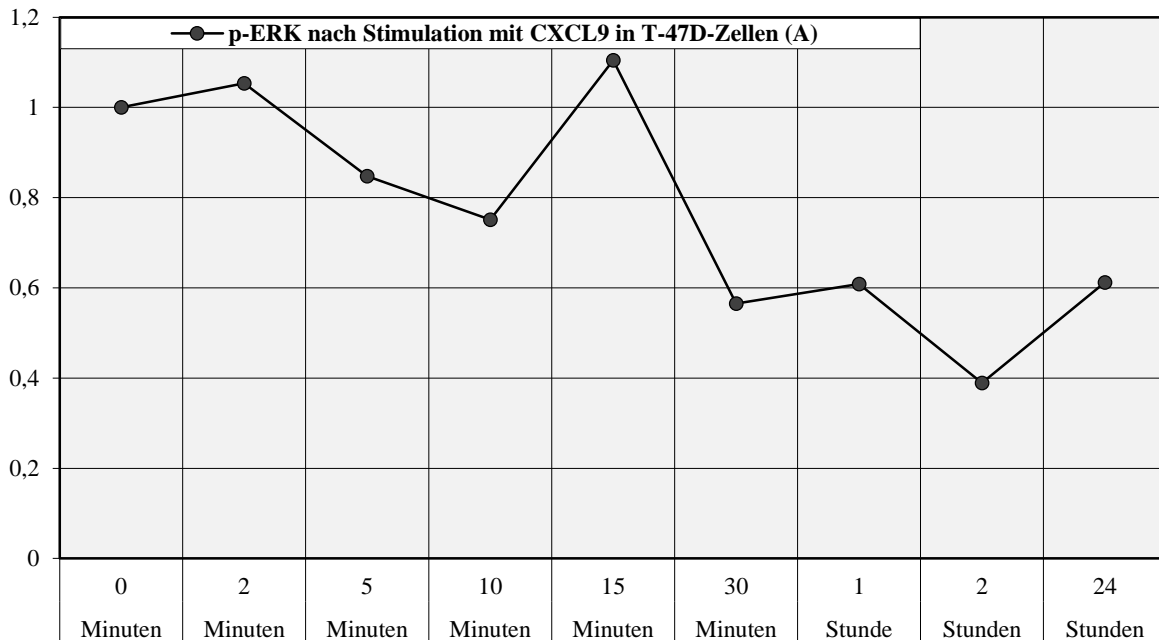


Abbildung 3.13: Induktion des ERK-Signalwegs durch CXCR3-Liganden in T-47D.

Densitometrische Auswertung von 3.12. Um einen etwaigen Effekt von BSA/PBS (Lösungsmedium der Chemokine) auf die ERK-Phosphorylierung nicht als Chemokineffekt zu interpretieren, wurde die Kontrolle abgezogen. (A) CXCL9 führte nach 2 und 5 Minuten zu einer vermehrten ERK-Phosphorylierung. Zu den restlichen Messzeiten war eine verminderte ERK-Phosphorylierung gemessen, die nach 2 Stunden am ausgeprägtesten war. (B) CXCL10 hemmte die ERK-Phosphorylierung zu allen Messzeiten, wobei der Effekt nach 24 Stunden am stärksten war. Betrachtet man die Western Blots sind nach 24 Stunden eine zunehmende Bandenfärbung zu erkennen, die im Vergleich zur Kontrolle jedoch geringer ausfallen. Nach Abzug der Kontrolle erhält man rechnerisch daher eine verminderte ERK-Phosphorylierung.

3.4.4 Regulation von p-AKT/AKT nach Stimulation mit CXCR3-Liganden in MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen

Wie in 3.3 beschrieben, spielt auch AKT eine Rolle in der chemokininduzierten Cathepsin B-Freisetzung. Daher wurde die Aktivierung bzw. Inaktivierung dieses Signalwegs nach CXCR3-Liganden-Stimulation in MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen in 6 cm-Schalen ausgesät, für 24 Stunden mit serumfreien Medium inkubiert und anschließend mit 100 ng/ml Chemokin stimuliert. Nach 15 Minuten und 24 Stunden wurden die Zellen lysiert. Nach einer Proteinbestimmung wurden jeweils gleiche Mengen (zwischen 10 µg und 40 µg) an Gesamtprotein per SDS-Page aufgetrennt. Durch den Übertrag der Proteine auf eine PVDF-Membran konnten die Banden anschließend mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes AKT und im Vergleich mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes AKT gefärbt werden. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit 1% BSA/PBS ebenfalls zeitabhängig stimuliert (Lösungsmedium der Chemokine).

In MDA-MB-231 führte die Stimulation mit CXCL4 zu einer AKT-Inaktivierung, sowohl nach 15 Minuten, als auch nach 24 Stunden. Die Stimulation mit CXCL9 und CXCL10 zeigte keinen Effekt. In den Zellen der Linie MCF-7 ließ sich nach 15 Minuten und nach 24 Stunden kein Effekt auf die AKT-Aktivierung nachweisen.

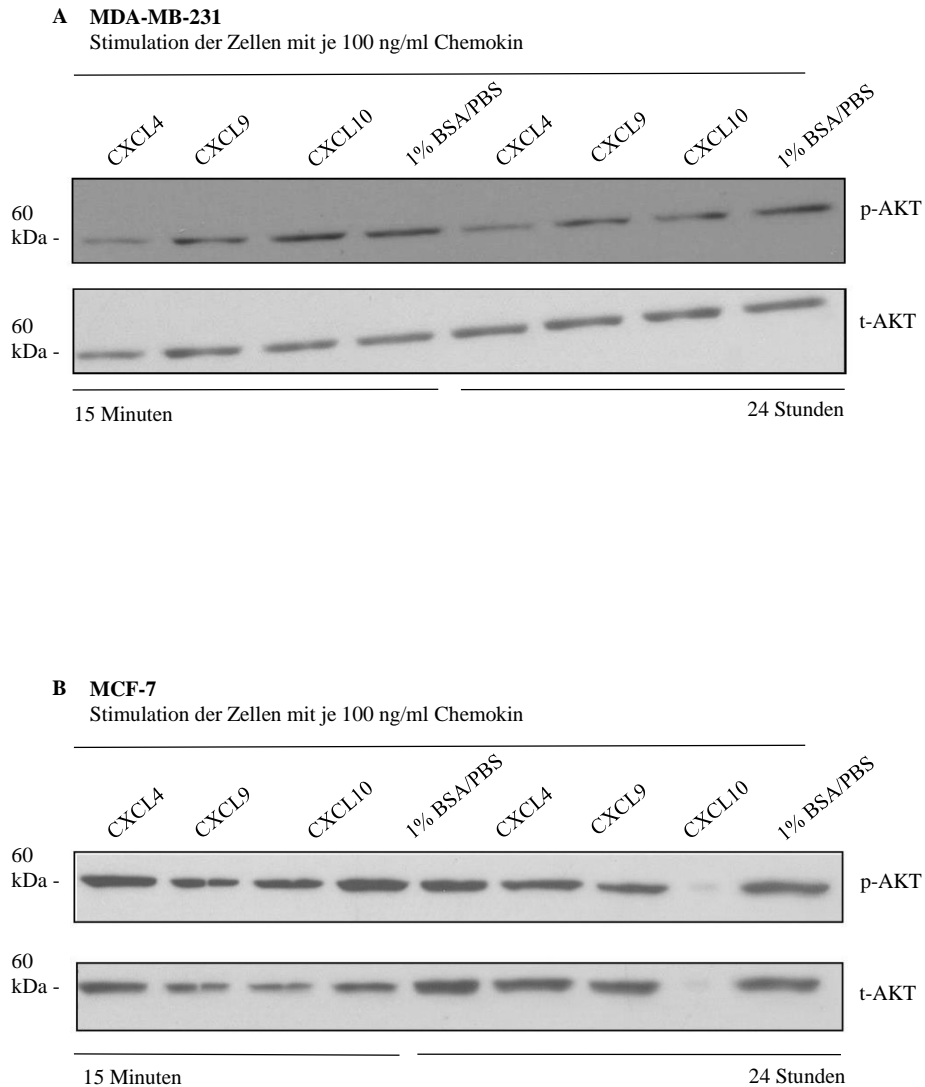


Abbildung 3.14: Induktion des AKT-Signalwegs durch CXCR3-Liganden in MCF-7 und MDA-MB-231.

Die Zellen der Brustkrebszelllinien MDA-MB-231 (A) und MCF-7 (B) wurden 24 mit serumfreien Medium inkubiert und anschließend mit 100 ng/ml CXCL9, CXCL10 und CXCL4 stimuliert. Als Kontrolle diente 1% BSA/PBS (Lösungsmedium von CXCL9, CXCL10 und CXCL4). Danach wurden die Zellen nach der angegebenen Zeit lysiert, geerntet und per Western Blot ausgewertet (n=1). Die Banden, die p-Akt entsprechen, färben sich nach Stimulation von MDA-MB-231-Zellen mit CXCL4 schwächer an.

4 Diskussion

4.1 Induktion von Cathepsin B durch CXCR3-Liganden im Mammakarzinom

William Halsted prägte zu Beginn des letzten Jahrhunderts die Theorie, dass Tumoren lokale Erkrankungen sind, deren Metastasierung Schritt für Schritt erfolgt. Dabei metastasiert der Tumor zunächst in die Lymphknoten und erst anschließend in periphere Organe. Später widersprach Bernard Fisher, indem er postulierte, dass Brustkrebs eine primär systemische Erkrankung sei. Die operative Entfernung von Lymphknoten hat daher für ihn vor allem prognostische, statt kurative Bedeutung (Kawada et al. 2011). Aktuelle Studien belegen weder die eine noch die andere Theorie, sondern weisen vielmehr auf eine Mischung aus beiden Theorien hin. So konnte in der Z0011-Studie kein signifikanter Überlebensvorteil nach Axilladisektion bei positivem Sentinellymphknoten festgestellt werden (Giuliano et al. 2010). Andererseits führt die lokale Tumorkontrolle zu einem verbessertem Überleben (Clarke et al. 2005). Die Abgrenzung von Tumoren, die aggressiv und schnell metastasieren, von solchen, die ein geringes metastatisches Potential aufweisen, ist für Therapieentscheidungen essentiell. Eine Rolle spielen hier Proteasen, im Mammakarzinom konnte die Bedeutung von Cathepsin B in diesem Zusammenhang bereits mehrfach gezeigt werden (siehe 1.4.3).

Wodurch entsteht die Überexpression von Proteasen im Tumorgewebe? Eine mögliche Erklärung liefert diese Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass die Chemokine CXCL9 und CXCL10 die Freisetzung von Cathepsin B aus Mammakarzinomzellen hervorrufen.

4.1.1 Cathepsin B und seine Bedeutung als Immunevasionsmechanismus

In den durchgeführten Versuchen konnte sowohl eine Steigerung von Procathepsin B in Zelllysaten (nach 48 Stunden), als auch eine vermehrte Freisetzung von aktivem Cathepsin B in Zellüberständen gemessen werden (nach 24 und 48 Stunden). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die Genexpression, als auch die Verteilung von intrazellulären Zellbestandteilen nach extrazellulär durch die Chemokinstimulation beeinflusst werden.

Damit liegen sie im Einklang mit vorherigen Arbeiten, die bereits zeigen konnten, dass Chemokine in der Lage sind, zu einer vermehrten Expression von anderen Proteasen wie MMPs im Tumorgewebe zu sorgen (Zipin-Roitman et al. 2007, Zhou et al. 2016). Die Überexpression

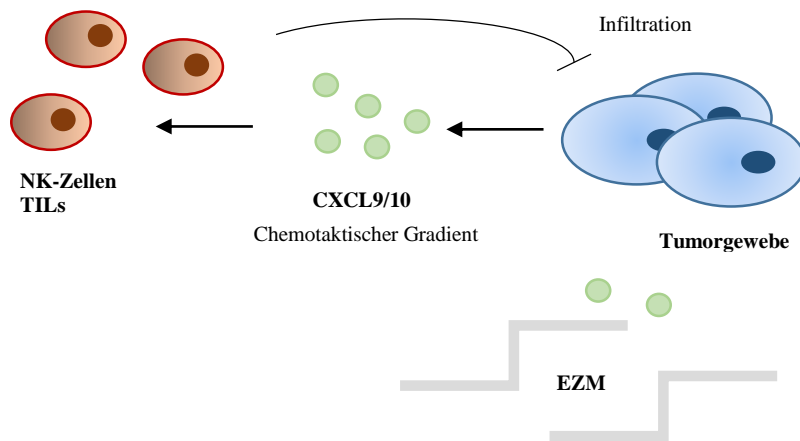
von MMP-9 nach Chemokinstimulation in MDA-MB-231 bestätigte sich in eigenen Versuchen ebenfalls (Daten nicht gezeigt).

Dieser Mechanismus bietet eine Erklärung, weshalb eine hohe Expression von Chemokinen im Tumorgewebe nach Chemotherapie mit einem verlängerten krankheitsfreien Überleben im Mammakarzinom einhergeht (Specht et al. 2009), die Expression des Rezeptors selbst auf Tumorzellen die Prognose jedoch verschlechtert (Ma et al. 2009): Die Chemokine wirken chemotaktisch und locken so Immunzellen in den Tumor, der daraufhin angegriffen und zurückgedrängt werden kann (Loetscher et al. 1996, Tarazona et al. 2016). Dagegen entwickelt der Tumor sogenannte „Immunevasionsmechanismen“. Darunter werden eigentlich physiologische Mechanismen zusammengefasst, die sich der Tumor zunutze macht, um vom Immunsystem unerkant zu bleiben oder dieses in seiner Aktivität zu hemmen. Zu den Immunevasionsmechanismen gehört die Produktion von immunsuppressiven Zytokinen wie IL-10, was die Aktivität von T-Zellen herabsetzt und Tumorzellen zu einer verringerten Expression ihrer MHC-I-Moleküle veranlasst (Petersson et al. 1998, Mocellin et al. 2003, Llanes-Fernandez et al. 2006). Generell führen Veränderungen in der Antigenprozessierung dazu, dass T-Zellen entartete Zellen nicht erkennen oder abtöten können (Meidenbauer et al. 2004) und können auch mit einer Prognoseverschlechterung der Tumorerkrankung einhergehen (Garcia-Lora et al. 2003, Seliger et al. 2010). Auch ein veränderter Metabolismus verschafft Tumorzellen einen Wachstumsvorteil im Vergleich zum umgebenden Gewebe. Als Beispiel lässt sich das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase anführen, welches in Tumorgewebe häufig überexprimiert ist und zu einer Unterversorgung der restlichen Zellen mit Tryptophan führt (Frumento et al. 2002). Die Dipeptidylpeptidase 4 ist in der Lage, CXCL10 zu spalten und dadurch die lymphozytäre Infiltration von Tumorgewebe zu hemmen (Barreira da Silva et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein bisher nicht beschriebener Vorgang beschrieben werden, der ebenfalls als Immunevasionsmechanismus verwendet werden könnte. Durch die Stimulation mit CXCL9 und CXCL10 erfolgt die Bildung der Protease Cathepsin B. Dies ist wahrscheinlich Teil eines physiologischen Prozesses, da Cathepsin B CXCL9 und CXCL10 spalten und inaktivieren kann (Repnik et al. 2015). Dass Proteasen am Abbau von Chemokingradienten beteiligt sind, wurde schon mehrfach beschrieben, MMPs sind beispielsweise ebenfalls in der Lage CXCL4, CXCL9 und CXCL10 zu spalten (Van Den Steen et al. 2000, Van den Steen et al. 2003). In gesundem Gewebe führt dies zu einem negativen Feedback-Mechanismus, der eine überschießende Immunantwort durch zu starke Immunzellinvasion verhindern und zu einem Abflauen der Entzündungsreaktion führen kann.

Im Tumorgewebe kann der Tumor jedoch doppelt profitieren: Cathepsin B erhöht die Tumorinvasivität und das Metastasierungspotential, während dabei durch Abbau der Chemokine die lymphozytäre Infiltration des Tumors reduziert wird.

A Chemokine und ihre Rolle der Tumorbekämpfung



B Chemokine und Cathepsin B als Immunevasionsmechanismus

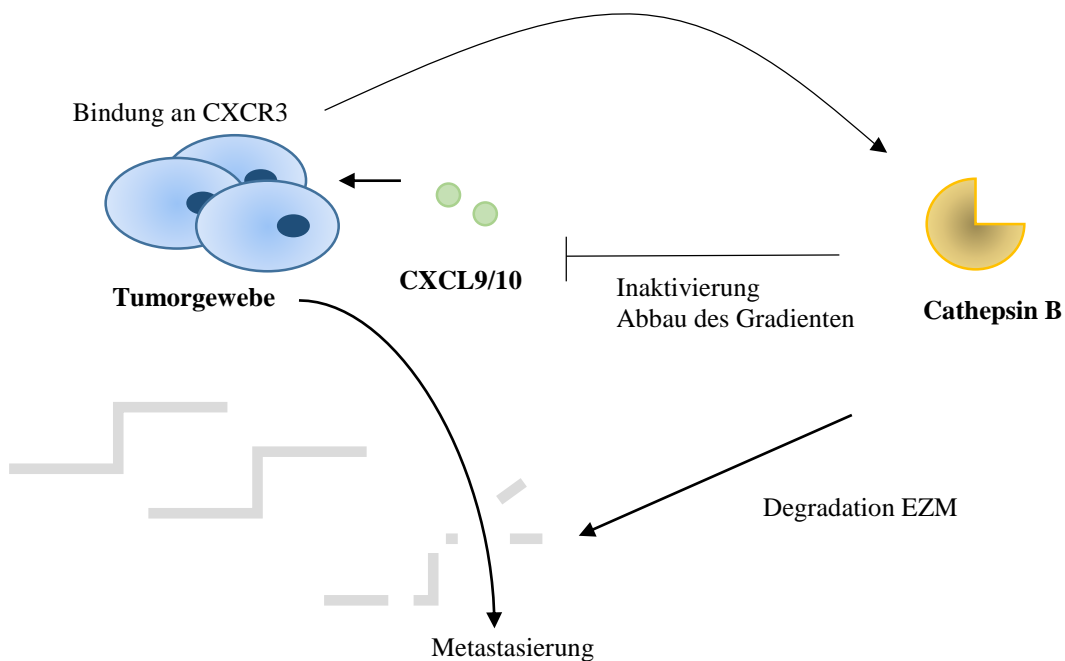


Abbildung 4.1.: Die chemokin-induzierte Cathepsin B-Freisetzung als potentieller Immunevasionsmechanismus.

A zeigt schematisch die protektive Funktion von Chemokinen gegen Tumoren, indem sie Immunzellen in den Tumor locken und so zur Tumorbekämpfung beitragen. Der Tumor exprimiert jedoch selbst CXCR3 und ist dadurch in der Lage Cathepsin B zu bilden, was wiederum zur Degradation von extrazellulärer Matrix und zum Abbau des Chemokingradienten führen kann: Ein Immunevasionsmechanismus (B).

4.1.2 Verantwortliche Signalwege für die chemokininduzierte Cathepsin B-Freisetzung

Um den Signalweg identifizieren zu können, der für die Freisetzung von Cathepsin B verantwortlich ist, wurde die basale Cathepsin B-Freisetzung von MDA-MB-231-Zellen mit der chemokininduzierten Freisetzung verglichen und zwar mit und ohne Hemmstoffe der untersuchten Signalwege. Untersucht wurden die Signalwege, die bereits in der Literatur nach CXCR3-Aktivierung beschrieben wurden, also ERK, Akt, p38 und Src (Bonacchi et al. 2001, Petrai et al. 2008).

U126, ein Hemmstoff der ERK-Signalkaskade, war dabei in der Lage, den Unterschied in der Cathepsin B-Freisetzung zwischen Kontrolle und Stimulation mit CXCL9 oder CXCL10 vollständig zu nivellieren. Damit lässt sich zeigen, dass dieser Signalweg essentiell an der chemokininduzierten Expression von Cathepsin B beteiligt sein muss. Da CXCL9 und CXCL10 auch AKT und Src aktivieren können, wurden diese Signalwege ebenfalls mit den jeweiligen Hemmstoffen LY294001 und PP1 gehemmt. Auch durch Blockierung dieser Signalwege wurde der Effekt von CXCL10 auf die Cathepsin B-Konzentration aufgehoben. Die Hemmung von p38 hingegen hatte keinen Einfluss auf die chemokininduzierte Cathepsin B-Freisetzung.

Erklären lassen sich diese Ergebnisse damit, dass ERK, AKT und Src über verschiedene Verbindungsmoleküle miteinander kommunizieren und somit vernetzt sind (siehe Abbildung 4.2). Die Induktion von Cathepsin B durch CXCL10 kann daher durch alle drei Signalwege hervorgerufen werden. Diese Hypothese steht im Einklang mit Ergebnissen von Bonacchi et al., die eine ERK-, AKT- und Src-Aktivierung nach Ligandenbindung an CXCR3 in Kupferzellen beschreiben konnten (Bonacchi et al. 2001). Dass die gemeinsame Aktivierung und Vernetzung dieser drei Signalwege in verschiedenen Prozessen eine Rolle spielen, konnte bereits in mehreren Veröffentlichungen gezeigt werden (siehe auch Abbildung 4.2., (Almeida et al. 2005, Kato et al. 2008, Li et al. 2013)). So führt beispielsweise eine Stimulation von Hep G2-Zellen (hepatozelluläres Karzinom) mit Bradykinin zu einer CXCL8-Freisetzung. Nach Hemmung von ERK, Src, JNK und p38 war der Bradykinin-Effekt nicht mehr nachweisbar (Chan et al. 2016).

Auffällig war, dass PD98059, ebenfalls ein Hemmer von ERK, nicht in der Lage ist, den Effekt von Chemokinen auf die Freisetzung von Cathepsin B zu blockieren. Dieses zunächst widersprüchliche Ergebnis ließ sich dadurch erklären, dass die verwendete Konzentration von 10 μM nicht in der Lage war, ERK vollständig zu blockieren, sondern noch eine Restaktivität zuließ (siehe 3.3.1, die Konzentration wurde gemäß den Herstellerangaben gewählt). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass nur die vollständige ERK-Inaktivierung den Chemokin-Effekt unterdrücken kann.

MDA-MB-231-Zellen, in denen Signalwege gehemmt wurden, wiesen durchweg eine geringere basale Expression von Cathepsin B auf. Am stärksten war dieser Effekt bei der Hemmung von AKT, dort sank die Freisetzung auf 20% des Ausgangswerts. Worauf dieser Effekt beruht ist unklar – AKT scheint an der basalen Freisetzung von Cathepsin B maßgeblich beteiligt zu sein, könnte allerdings auch eine wichtige Rolle in der Freisetzung in den extrazellulären Raum spielen.

Eine weitere Erklärung ist, dass die gehemmten Signalwege generell proliferative Signale hervorrufen – nach Wegfall dieser könnte es zu einem Wachstumsrückgang oder sogar zu apoptotischen Vorgängen der Zellen kommen und somit zu einer quantitativ verminderten Cathepsin-B-Ausschüttung. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein MTT-Assay durchgeführt. LY294002, Hemmstoff des AKT-Signalwegs, führt nach 24 Stunden zu einer signifikanten Wachstumsreduktion der Zellen um etwa 30%, nach 48 bzw. 72 Stunden ließen sich keine Wachstumsunterschiede mehr feststellen. Auch der Src-Inhibitor PP1 war in der Lage das Zellwachstum um bis zu 40% zu reduzieren, eine Wachstumsreduktion war nach allen Zeitpunkten festzustellen, U0126 (ERK-Inhibitor) reduzierte das Wachstum um bis zu 20% nach 48 und 72 Stunden. Damit ist klar, dass die verwendeten Signalweginhibitoren einen Einfluss auf das Zellwachstum der verwendeten Zelllinie hatten. Die basale Ausschüttung von Cathepsin B lässt sich allerdings nicht in ein lineares Verhältnis mit der Proliferation der mit Hemmstoff inkubierten Zellen setzen – so senkte SB203580 ebenfalls die basale Cathepsin B-Ausschüttung, wobei im MTT-Assay keine antiproliferative Wirksamkeit festgestellt wurde. Auch die Höhe der Wachstumsreduktion korrelierte nicht mit der verringerten basalen Cathepsin B-Freisetzung.

Möglich ist auch, dass die basale Expression von Cathepsin B über ein Zusammenwirken von ERK, AKT und Src gesteuert wird. Um die Chemokinwirkung auf die Cathepsin B-Freisetzung zu unterdrücken, reicht daher die Hemmung von nur einem Signalweg.

Welcher Effekt nun genau zur Reduktion der Cathepsin B-Freisetzung geführt hat oder ob es sich um eine Kombination aus verschiedenen Effekten handelt, bleibt unklar und bedarf weiterer Experimente.

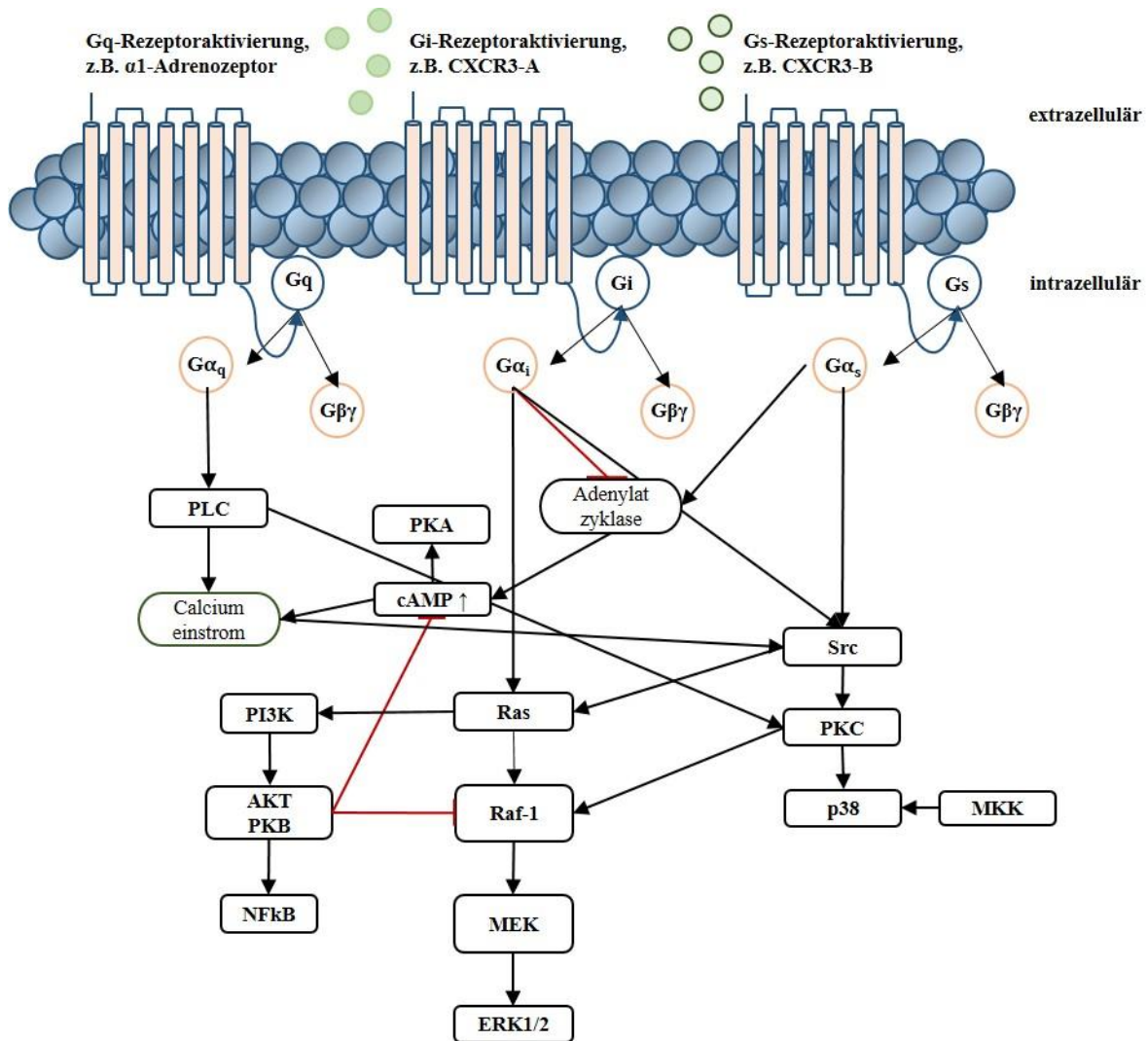


Abbildung 4.2.: Die Vernetzung unterschiedlicher Signalwege nach Rezeptoraktivierung (nach (Singh et al. , Neves et al. 2002, New et al. 2007, Bhatt et al. 2013, Arkun 2016)).

4.1.3 Verantwortliche Rezeptorspleißvariante für die chemokininduzierte Cathepsin B-Freisetzung

CXCR3 besitzt drei Spleißvarianten CXCR3-A, CXCR3-B und CXCR3-alt, wobei *in vivo* insbesondere CXCR3-A und CXCR3-B relevant zu sein scheinen. Die Bedeutung der beiden Varianten in Tumoren ist divergierend (Cerny et al. 2015): Die Überexpression von CXCR3-A im Tumorgewebe trägt zu der Entstehung von Metastasen bei und ist daher als ungünstiger Faktor zu bewerten. Beispielsweise führt sie im Prostatakarzinom zur Zellmigration und Invasion der Tumorzellen (Wu et al. 2012). Kürzlich konnten Utsumi et al. zeigen, dass in

metastasierten Nierenzellkarzinomen die Konzentration von CXCR3-A deutlich höher als in nicht-metastasierten Tumoren ist (Utsumi et al. 2014).

CXCR3-B ist für protektive Mechanismen verantwortlich. So hat CXCR3-B vor allem einen angiostatischen Effekt, wodurch im Tumor eine antiproliferative Aktivität beobachtet werden kann. Auch die Metastasierung wird durch CXCR3-B gebremst (Li et al. 2015).

Es stellt sich daher die Frage, über welche Spleißvariante die Regulation von Cathepsin B vermittelt wird. In den durchgeführten Experimenten war CXCL4 nicht in der Lage, die Freisetzung von Cathepsin B zu beeinflussen. Da CXCL4 selektiv an CXCR3-B bindet, legen diese Ergebnisse nahe, dass die chemokininduzierte Cathepsin B-Freisetzung über CXCR3-A vermittelt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von p38 keinen Einfluss auf die Cathepsin B-Freisetzung hatte. CXCR3-B vermittelt seine Funktion hauptsächlich über p38 (Petrai et al. 2008). Dies bekräftigt die These, dass CXCR3-B nicht an der Cathepsin B-Freisetzung beteiligt ist.

Dass CXCR3-A in der Regulation von Proteasen beteiligt und damit onkogen wirken kann, ist bereits häufiger gezeigt worden. Im hepatozellulären Karzinom konnte CXCR3-A als die Spleißvariante identifiziert werden, die zur Freisetzung der Proteasen MMP-2 und MMP-9 führt (Ding et al. 2016). Das Überwiegen von CXCR3-A im Vergleich zu CXCR3-B fördert im Prostatakarzinom die Zellmotilität, während die Überexpression von CXCR3-B Zellinvasion senken kann (Wu et al. 2012). Dieser Effekt wurde bereits für weitere Tumorentitäten beschrieben, so kann CXCL10 im Magenkarzinom über die Aktivierung von CXCR3-A eine Zellinvasion und -migration bewirken, im Gegenzug über CXCR3-B das Zellwachstum hemmen (Yang et al. 2016). Eine Ursache für das erhöhte Metastasierungspotential ist auch im Magenkarzinom die vermehrte Freisetzung von MMP-2 und MMP-9 (Zhou et al. 2016).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, dass CXCR3-A in Bezug auf die Expression im Mammakarzinom tumorfördernd und damit vielleicht auch prognoselimitierend ist (Cerny et al. 2015, Li et al. 2015). Neben den bisher untersuchten Mechanismen wie Vermittlung von Zellmotilität und Proliferation liefert die Induktion von Cathepsin B und der damit einhergehende Immunevasionsmechanismus einen weiteren Beleg für diese These.

4.2 Die Aktivierung von Signalwegen durch CXCL9 und CXCL10

4.2.1 ERK und AKT

Die Aktivierung von membrangebundenen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt zu einer intrazellulären Signalkaskade, durch die eine Antwort der Zelle auf den externen Stimulus erreicht werden kann. Dazu gehören rasche (z.B. Degranulation von Thrombozyten) wie langfristige Vorgänge (z.B. veränderte Genexpression). Mittlerweile ist klar, dass das komplexe Zusammenspiel aus Aktivierung und Deaktivierung verschiedener Signalkaskaden die Zellhomöostase steuern.

In Kapitel 4.1.2 ist bereits die Rolle von ERK, Akt und Src nach Chemokinstimulation diskutiert worden. Die Cathepsin B-Freisetzung nach Stimulation der Tumorzelle mit CXCR3-Liganden ist abhängig von diesen drei Signalwegen, was impliziert, dass eine Aktivierung der Signalwege vorliegt. Trotzdem bleibt die Frage bestehen, in welchem zeitlichen Rahmen diese Aktivierung stattfindet und ob nicht auch hemmende Signale vorliegen könnten. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden Mammakarzinomzelllinien mit CXCL9 und CXCL10 stimuliert, zeitabhängig lysiert und per Immunoblot analysiert, wann und in welchem Maße eine Signalkaskadenaktivierung stattfindet. Dabei lag der Fokus auf ERK. Der Immunoblot wurde als Methodik in Anlehnung an zahlreiche Veröffentlichungen gewählt (McCune et al. 2010, Jijon et al. 2012, Yamakawa et al. 2013, Chen et al. 2014).

Um die Aktivierung messen zu können, wurde der Anteil von phosphoryliertem p44/42 MAPK zu dem Gesamtanteil von p44/42 MAPK betrachtet. In Zellen der Linie MCF-7 führte die Stimulation mit CXCL9 und CXCL10 zunächst zu einer Hemmung des Signalwegs nach 10-15 Minuten, die dann in eine langfristige ERK-Aktivierung überging. Diese Ergebnisse bieten insofern eine neue Erkenntnis, da eine hemmende Wirkung von CXCR3-Liganden bisher nicht beschrieben wurde (siehe Kapitel 1.3.3 und (Bonacchi et al. 2001)). Es zeigt außerdem erneut die komplexen Zusammenspiele von Signalkaskaden auf, wenn durch den gleichen Stimulus Signalwege aktiviert und gehemmt werden können.

In Zellen der Linie MDA-MB-231 konnte nach Stimulation mit CXCL9 nach 24 Stunden eine Hemmung des ERK-Signalweges festgestellt werden. Dieses Ergebnis steht zunächst nicht im Einklang zu der Theorie, dass die ERK-Aktivierung zu einer Freisetzung von Cathepsin B führt, da die Hemmung des Signalweges die Chemokinwirkung unterbinden konnte. Es muss zunächst festgehalten werden, dass die Anzahl der durchgeführten Versuche nicht ausreichend war, um eine abschließende Bewertung des Sachverhalts treffen zu können. Weiterhin ist für

die Freisetzung von Cathepsin B nicht ein einzelner Weg verantwortlich. Vielmehr führt eine gemeinsame Aktivierung und vielleicht auch Hemmung der Signalkaskaden zu diesem Effekt. CXCL10 führte nach 24 Stunden in einem Experiment zu einer ERK-Aktivierung, in einem weiteren Experiment zu einer Hemmung von ERK. Bei identischer Versuchsdurchführung konnte kein Confounder identifiziert werden, was zusätzlich Zweifel an der gewählten Methodik aufkommen lässt und diese Testreihe letztendlich nicht auswertbar war.

Bezüglich der Aktivierung von AKT wurden nur wenige Versuche durchgeführt, die keine abschließende Bewertung zulassen. Es zeigte sich ein Trend für eine Hemmung des Signalwegs über CXCL4. Diese Ergebnisse könnten einen Hinweis auf die Rolle von CXCL4 bezüglich der Freisetzung von Cathepsin B sein. Wie bereits in 4.1. berichtet, ist CXCL4 nicht in der Lage eine signifikante Veränderung der Cathepsin B-Expression zu bewirken. Gleichzeitig führt die Hemmung von AKT zu einer deutlich geminderten, konstitutiven Cathepsin B-Freisetzung. Die Ursache davon könnte weniger die mangelnde ERK oder Src-Aktivierung, sondern die Hemmung von AKT sein.

4.2.2 Methodisches Vorgehen

Trotz häufiger Durchführung des Experiments und großer Sorgfalt konnten in der Kontrolle immer wieder unspezifische Phospho-p44/42-Aktivität gemessen werden. Bei den Kontrollexperimenten wurden die Zellen statt mit Chemokin mit 1% BSA/PBS stimuliert (Lösungsmedium der Chemokine). Woher kam diese unspezifische Aktivierung? Einerseits ist es denkbar, dass BSA eine Aktivierung von ERK auslösen kann. In der Literatur finden sich keine Daten, die diese Hypothese bestätigen oder verwerfen können.

Die Zellen wurden bei einer ca. 70-80%igen Konfluenz stimuliert. Nach 24 Stunden zeigten sich die Zellen etwa bis 95% konfluent. Änderungen der Konfluenz könnten die Ursache der unspezifischen Aktivierungen darstellen. In Fibroblasten ist ERK maßgeblich an der Kontakthemmung wachsender Zellen beteiligt und wird nach Zell-Zell-Kontakten gehemmt (Wayne et al. 2006). Dadurch kann ein überschießendes Wachstum verhindert werden. In Sarkomzellen ist dieser Effekt nicht mehr nachweisbar.

Eine weitere Erklärung sind mechanische Erschütterungen, die durch das Arbeiten mit den Zellen an der Werkbank hervorgerufen werden. Kippenberger et al. konnten zeigen, dass physikalische Stimuli in epidermalen Zellen zu einer schnellen Phosphorylierung von AKT innerhalb von 10 Minuten führen (Kippenberger et al. 2005). Auch ERK und JNK werden in Keratinozyten und Melanozyten aktiviert (Kippenberger et al. 2000). Dieser Effekt ist für

weitere Zellen, wie Herzfibroblasten, Skelett- und Herzmuskelzellen, beschrieben (Aronson et al. 1997, MacKenna et al. 1998, Seko et al. 1999, Galpin et al. 2012). Als Ursache konnten aktivierte Integrine und sich öffnende Ionenkanäle identifiziert werden (Silver et al. 2003). Trotz sorgfältiger Arbeitsweise müssen mechanische Stimuli als Ursache der unspezifischen Aktivierungen in Betracht gezogen werden.

Welcher Natur die Aktivierungen in den Kontrollversuchen auch war – direkter Effekt, physiologischer Prozess oder mechanische Einwirkung – sie führen dazu, dass die Ergebnisse, die unter 4.2.1 diskutiert wurden, nur unter Vorbehalt auszuwerten sind. Wenn in den Kontrollen Effekte zu sehen sind, die sich teilweise deutlicher als die Effekte der Chemokinstimulation auswirkten, kann keine endgültige Aussage über ERK-Aktivierung nach CXCR3-Ligandeninkubation getroffen werden. Damit gilt: Jedes Experiment steht und fällt mit seiner Kontrolle.

5 Zusammenfassung

In Deutschland ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau und damit auch für die meisten krebsassoziierten Todesfälle verantwortlich. Chemokine spielen eine wichtige Rolle in der Tumormikroumgebung des Mammakarzinoms. Liganden von CXCR3, CXCL9 und CXCL10, können durch Chemotaxis Immunzellen in Tumorgewebe locken und so zur Eindämmung des Tumors durch das Immunsystem führen. Gleichzeitig geht eine Überexpression von CXCR3 auf Mammakarzinomzellen mit einer verschlechterten Prognose einher.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Ligandenbindung an CXCR3 in MDA-MB-231-Zellen zu einer vermehrten Freisetzung und Bildung von Cathepsin B führt, einer Protease, deren Überexpression vielfach mit erhöhter Invasivität, Metastasierung und Prognoseverschlechterung im Mammakarzinom in Verbindung gebracht worden ist. Gleichzeitig kann Cathepsin B CXCL9 und CXCL10 spalten und inaktivieren, wodurch der Chemokingradient abgebaut werden kann. Dies könnte eine verminderte lymphozytäre Infiltration des Tumors zur Folge haben. Hierdurch entsteht für den Tumor ein Wachstumsvorteil, weshalb dieser Vorgang ein Immunevasionsmechanismus darstellen könnte.

CXCR3 besitzt zwei relevante Speißvarianten: CXCR3-A und CXCR3-B. CXCR3-A kann die Signalwege AKT, ERK und Src aktivieren, während CXCR3-B seine Funktion vorwiegend über p38 vermittelt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von AKT, ERK und Src die vermehrte Cathepsin B-Freisetzung durch Ligandenbindung an CXCR3 unterdrückt, weshalb diese Signalwege in diesem Prozess involviert sein müssen. Weil nach Hemmung von p38 weiterhin ein Effekt durch die Stimulation mit Chemokinen gemessen werden kann, kann p38 und damit die Speißvariante CXCR3-B nicht für den beschriebenen Effekt verantwortlich sein. Eine weitere Bestätigung dieser These liefert die Beobachtung, dass CXCL4 nicht in der Lage ist, die Cathepsin B-Freisetzung zu erhöhen, da CXCL4 selektiv nur an CXCR3-B binden kann. Zusammenfassend liefert diese Arbeit eine genauere Charakterisierung von CXCR3 und seine Rolle im Mammakarzinom. Die These, dass die Expression von CXCR3-A auf Tumorzellen onkogen wirken kann, wird unterstützt, während CXCR3-B keinen Einfluss auf die Expression von Cathepsin B hat. Dies zeigt die ambivalente Rolle der CXCR3-Achse in Mammatumoren.

6 Literaturverzeichnis

Aggarwal, N. and B. F. Sloane (2014). "Cathepsin B: multiple roles in cancer." *Proteomics Clin Appl* 8(5-6): 427-437.

Alberts B, J. A., Lewis J, et al. (2002). "Molecular Biology of the Cell. ." New York: Garland Science; 2002. 4th edition.

Almeida, M., L. Han, T. Bellido, S. C. Manolagas and S. Kousteni (2005). "Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT." *J Biol Chem* 280(50): 41342-41351.

Almeida, P. C., I. L. Nantes, J. R. Chagas, C. C. Rizzi, A. Faljoni-Alario, E. Carmona, L. Juliano, H. B. Nader and I. L. Tersariol (2001). "Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation." *J Biol Chem* 276(2): 944-951.

Arkun, Y. (2016). "Dynamic Modeling and Analysis of the Cross-Talk between Insulin/AKT and MAPK/ERK Signaling Pathways." *PLoS One* 11(3): e0149684.

Aronson, D., S. D. Dufresne and L. J. Goodyear (1997). "Contractile activity stimulates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in rat skeletal muscle." *J Biol Chem* 272(41): 25636-25640.

Ayad, S., C. A. Chambers, L. Berry, C. A. Shuttleworth and M. E. Grant (1986). "Type VI collagen and glycoprotein MFPI are distinct components of the extracellular matrix." *Biochem J* 236(1): 299-302.

Baggiolini, M., B. Dewald and B. Moser (1997). "Human chemokines: an update." *Annu Rev Immunol* 15: 675-705.

Balaji, K. N., N. Schaschke, W. Machleidt, M. Catalfamo and P. A. Henkart (2002). "Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation." *J Exp Med* 196(4): 493-503.

Bao, T., C. Basal, C. Seluzicki, S. Q. Li, A. D. Seidman and J. J. Mao (2016). "Long-term chemotherapy-induced peripheral neuropathy among breast cancer survivors: prevalence, risk factors, and fall risk." *Breast Cancer Res Treat* 159(2): 327-333.

Barreira da Silva, R., M. E. Laird, N. Yatim, L. Fiette, M. A. Ingersoll and M. L. Albert (2015). "Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy." *Nat Immunol* 16(8): 850-858.

Bauerfeind, I. and T. München (2009). *Manual Mammakarzinom. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. T. München. München. 12: 354.

- Bengsch, F., A. Buck, S. C. Gunther, J. R. Seiz, M. Tacke, D. Pfeifer, D. von Elverfeldt, L. Sevenich, L. E. Hillebrand, U. Kern, M. Sameni, C. Peters, B. F. Sloane and T. Reinheckel (2014). "Cell type-dependent pathogenic functions of overexpressed human cathepsin B in murine breast cancer progression." *Oncogene* 33(36): 4474-4484.
- Bergamaschi, A., E. Tagliabue, T. Sorlie, B. Naume, T. Triulzi, R. Orlandi, H. G. Russnes, J. M. Nesland, R. Tammi, P. Auvinen, V. M. Kosma, S. Menard and A. L. Borresen-Dale (2008). "Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome." *J Pathol* 214(3): 357-367.
- Bhatt, A. and B. Damania (2013). "AKTivation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by KSHV." *Frontiers in Immunology* 3(401).
- Bjorge, J. D., A. S. Pang, M. Funnell, K. Y. Chen, R. Diaz, A. M. Magliocco and D. J. Fujita (2011). "Simultaneous siRNA targeting of Src and downstream signaling molecules inhibit tumor formation and metastasis of a human model breast cancer cell line." *PLoS One* 6(4): e19309.
- Blichert-Toft, M., M. G. Smola, L. Cataliotti and N. O'Higgins (1998). "Principles and guidelines for surgeons--management of symptomatic breast cancer. On behalf of the European Society of Surgical Oncology." *Ann Chir Gynaecol* 87(1): 101-109.
- Bonacchi, A., P. Romagnani, R. G. Romanelli, E. Efsen, F. Annunziato, L. Lasagni, M. Francalanci, M. Serio, G. Laffi, M. Pinzani, P. Gentilini and F. Marra (2001). "Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes." *J Biol Chem* 276(13): 9945-9954.
- Bonecchi, R., G. Bianchi, P. P. Bordignon, D. D'Ambrosio, R. Lang, A. Borsatti, S. Sozzani, P. Allavena, P. A. Gray, A. Mantovani and F. Sinigaglia (1998). "Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s." *J Exp Med* 187(1): 129-134.
- Bonnans, C., J. Chou and Z. Werb (2014). "Remodelling the extracellular matrix in development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(12): 786-801.
- Brazil, D. P. and B. A. Hemmings (2001). "Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow." *Trends Biochem Sci* 26(11): 657-664.
- Brightling, C. E., A. J. Ammit, D. Kaur, J. L. Black, A. J. Wardlaw, J. M. Hughes and P. Bradding (2005). "The CXCL10/CXCR3 axis mediates human lung mast cell migration to asthmatic airway smooth muscle." *Am J Respir Crit Care Med* 171(10): 1103-1108.
- Bronger, H., S. Kraeft, U. Schwarz-Boeger, C. Cerny, A. Stockel, S. Avril, M. Kiechle and M. Schmitt (2012). "Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer." *Breast Cancer Res* 14(1): R30.

- Bruchard, M., G. Mignot, V. Derangere, F. Chalmin, A. Chevriaux, F. Vegran, W. Boireau, B. Simon, B. Ryffel, J. L. Connat, J. Kanellopoulos, F. Martin, C. Rebe, L. Apetoh and F. Ghiringhelli (2013). "Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth." *Nat Med* 19(1): 57-64.
- Burns, J. M., B. C. Summers, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, M. E. Penfold, M. J. Sunshine, D. R. Littman, C. J. Kuo, K. Wei, B. E. McMaster, K. Wright, M. C. Howard and T. J. Schall (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." *J Exp Med* 203(9): 2201-2213.
- Buus, R., I. Sestak, R. Kronenwett, C. Denkert, P. Dubsy, K. Krappmann, M. Scheer, C. Petry, J. Cuzick and M. Dowsett (2016). "Comparison of EndoPredict and EPclin With Oncotype DX Recurrence Score for Prediction of Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy." *J Natl Cancer Inst* 108(11).
- Caglic, D., J. R. Pungercar, G. Pejler, V. Turk and B. Turk (2007). "Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions." *J Biol Chem* 282(45): 33076-33085.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* 296(5573): 1655-1657.
- Cargnello, M. and P. P. Roux (2011). "Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases." *Microbiol Mol Biol Rev* 75(1): 50-83.
- Casaubon, J. T. and J. P. Regan (2017). *BRCA 1 and 2. StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing*
- StatPearls Publishing LLC.
- Cassatella, M. A., S. Gasperini, F. Calzetti, A. Bertagnin, A. D. Luster and P. P. McDonald (1997). "Regulated production of the interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokine by human neutrophils." *Eur J Immunol* 27(1): 111-115.
- Cavallo-Medved, D., D. Rudy, G. Blum, M. Bogyo, D. Caglic and B. F. Sloane (2009). "Live-cell imaging demonstrates extracellular matrix degradation in association with active cathepsin B in caveolae of endothelial cells during tube formation." *Exp Cell Res* 315(7): 1234-1246.
- Cerny, C., B. H., M. Davoodi, S. Sharma, L. Zhu, S. Obana, J. Sharma, R. Ebrahimi, M. S. John, J. M. Lee, R. Salgia, R. Strieter, S. Dubinett and S. Sharma (2015). "The Role of CXCR3/Ligand Axis in Cancer " *International Trends in Immunity* 3(2): 2326-3121.
- Ceru, S., S. Konjar, K. Maher, U. Repnik, I. Krizaj, M. Bencina, M. Renko, A. Nepveu, E. Zerovnik, B. Turk and N. Kopitar-Jerala (2010). "Stefin B interacts with histones and cathepsin L in the nucleus." *J Biol Chem* 285(13): 10078-10086.

- Chan, A. S., W. W. Lau, A. C. Szeto, J. Wang and Y. H. Wong (2016). "Differential Regulation of CXCL8 Production by Different G Protein Subunits with Synergistic Stimulation by Gi- and Gq-Regulated Pathways." *J Mol Biol* 428(19): 3869-3884.
- Chen, X., B. Bai, Y. Tian, H. Du and J. Chen (2014). "Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling." *J Biol Chem* 289(45): 31173-31187.
- Cheng, J. P. and B. J. Nichols (2016). "Caveolae: One Function or Many?" *Trends Cell Biol* 26(3): 177-189.
- Clarke, M., R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, V. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor and Y. Wang (2005). "Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." *Lancet* 366(9503): 2087-2106.
- Coca, S., J. Perez-Piqueras, D. Martinez, A. Colmenarejo, M. A. Saez, C. Vallejo, J. A. Martos and M. Moreno (1997). "The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma." *Cancer* 79(12): 2320-2328.
- Cole, K. E., C. A. Strick, T. J. Paradis, K. T. Osborne, M. Loetscher, R. P. Gladue, W. Lin, J. G. Boyd, B. Moser, D. E. Wood, B. G. Sahagan and K. Neote (1998). "Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3." *J Exp Med* 187(12): 2009-2021.
- Colvin, R. A., G. S. Campanella, J. Sun and A. D. Luster (2004). "Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function." *J Biol Chem* 279(29): 30219-30227.
- Cooper, D. M. (2003). "Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP." *Biochem J* 375(Pt 3): 517-529.
- Cossu-Rocca, P., S. Orru, M. R. Muroi, F. Sanges, G. Sotgiu, S. Ena, G. Pira, L. Murgia, A. Manca, M. G. Uras, M. G. Sarobba, S. Urru and M. R. De Miglio (2015). "Analysis of PIK3CA Mutations and Activation Pathways in Triple Negative Breast Cancer." *PLoS One* 10(11): e0141763.
- Cox, J. H., R. A. Dean, C. R. Roberts and C. M. Overall (2008). "Matrix metalloproteinase processing of CXCL11/I-TAC results in loss of chemoattractant activity and altered glycosaminoglycan binding." *J Biol Chem* 283(28): 19389-19399.
- Dalet-Fumeron, V., L. Boudjennah and M. Pagano (1996). "Competition between plasminogen and procathepsin B as a probe to demonstrate the in vitro activation of procathepsin B by the tissue plasminogen activator." *Arch Biochem Biophys* 335(2): 351-357.

Dalet-Fumeron, V., N. Guinec and M. Pagano (1993). "In vitro activation of pro-cathepsin B by three serine proteinases: leucocyte elastase, cathepsin G, and the urokinase-type plasminogen activator." *FEBS Lett* 332(3): 251-254.

Darby, S., P. McGale, C. Correa, C. Taylor, R. Arriagada, M. Clarke, D. Cutter, C. Davies, M. Ewertz, J. Godwin, R. Gray, L. Pierce, T. Whelan, Y. Wang and R. Peto (2011). "Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials." *Lancet* 378(9804): 1707-1716.

Datta, D., J. A. Flaxenburg, S. Laxmanan, C. Geehan, M. Grimm, A. M. Waaga-Gasser, D. M. Briscoe and S. Pal (2006). "Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer." *Cancer Res* 66(19): 9509-9518.

Deutzmann, R. N., R.; Rassow, J.; Hauser, K. (2012). "Duale Reihe Biochemie." Thieme 3: 864.

Ding, Q., Y. Xia, S. Ding, P. Lu, L. Sun and M. Liu (2016). "An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the metastasis of CD133+ liver cancer cells induced by CXCL9." *Oncotarget* 7(12): 14405-14414.

Dohchin, A., J. I. Suzuki, H. Seki, M. Masutani, H. Shiroto and Y. Kawakami (2000). "Immunostained cathepsins B and L correlate with depth of invasion and different metastatic pathways in early stage gastric carcinoma." *Cancer* 89(3): 482-487.

Droga-Mazovec, G., L. Bojic, A. Petelin, S. Ivanova, R. Romih, U. Repnik, G. S. Salvesen, V. Stoka, V. Turk and B. Turk (2008). "Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues." *J Biol Chem* 283(27): 19140-19150.

Du, R., K. V. Lu, C. Petritsch, P. Liu, R. Ganss, E. Passegue, H. Song, S. Vandenberg, R. S. Johnson, Z. Werb and G. Bergers (2008). "HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion." *Cancer Cell* 13(3): 206-220.

Duffy, M. J., P. M. McGowan, N. Harbeck, C. Thomssen and M. Schmitt (2014). "uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies." *Breast Cancer Res* 16(4): 428.

Dumenco, L. L., B. Everson, L. A. Culp and O. D. Ratnoff (1988). "Inhibition of the activation of Hageman factor (factor XII) by platelet factor 4." *J Lab Clin Med* 112(3): 394-400.

Eding, C. B., J. Domert, P. Waster, F. Jerhammar, I. Rosdahl and K. Ollinger (2015). "Melanoma growth and progression after ultraviolet a irradiation: impact of lysosomal exocytosis and cathepsin proteases." *Acta Derm Venereol* 95(7): 792-797.

- Ehlert, J. E., C. A. Addison, M. D. Burdick, S. L. Kunkel and R. M. Strieter (2004). "Identification and partial characterization of a variant of human CXCR3 generated by posttranscriptional exon skipping." *J Immunol* 173(10): 6234-6240.
- Elston, C. W. and I. O. Ellis (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." *Histopathology* 19(5): 403-410.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." *Immunochemistry* 8(9): 871-874.
- Fernandez, E. J. and E. Lolis (2002). "Structure, function, and inhibition of chemokines." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469-499.
- Fonovic, M. and B. Turk (2014). "Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation." *Biochim Biophys Acta* 1840(8): 2560-2570.
- Frlan, R. and S. Gobec (2006). "Inhibitors of cathepsin B." *Curr Med Chem* 13(19): 2309-2327.
- Frumento, G., R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti and G. B. Ferrara (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Exp Med* 196(4): 459-468.
- Galpin, A. J., A. C. Fry, L. Z. Chiu, D. B. Thomason and B. K. Schilling (2012). "High-power resistance exercise induces MAPK phosphorylation in weightlifting trained men." *Appl Physiol Nutr Metab* 37(1): 80-87.
- Garcia-Lopez, M. A., F. Sanchez-Madrid, J. M. Rodriguez-Frade, M. Mellado, A. Acevedo, M. I. Garcia, J. P. Albar, C. Martinez and M. Marazuela (2001). "CXCR3 chemokine receptor distribution in normal and inflamed tissues: expression on activated lymphocytes, endothelial cells, and dendritic cells." *Lab Invest* 81(3): 409-418.
- Garcia-Lora, A., I. Algarra and F. Garrido (2003). "MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape." *J Cell Physiol* 195(3): 346-355.
- Gasperini, S., M. Marchi, F. Calzetti, C. Laudanna, L. Vicentini, H. Olsen, M. Murphy, F. Liao, J. Farber and M. A. Cassatella (1999). "Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils." *J Immunol* 162(8): 4928-4937.
- Gentilini, G., N. E. Kirschbaum, J. A. Augustine, R. H. Aster and G. P. Visentin (1999). "Inhibition of human umbilical vein endothelial cell proliferation by the CXC chemokine, platelet factor 4 (PF4), is associated with impaired downregulation of p21(Cip1/WAF1)." *Blood* 93(1): 25-33.

Giuliano, A. E., L. McCall, P. Beitsch, P. W. Whitworth, P. Blumencranz, A. M. Leitch, S. Saha, K. K. Hunt, M. Morrow and K. Ballman (2010). "Locoregional recurrence after sentinel lymph node dissection with or without axillary dissection in patients with sentinel lymph node metastases: the American College of Surgeons Oncology Group Z0011 randomized trial." *Ann Surg* 252(3): 426-432; discussion 432-423.

Gong, F., X. Peng, C. Luo, G. Shen, C. Zhao, L. Zou, L. Li, Y. Sang, Y. Zhao and X. Zhao (2013). "Cathepsin B as a potential prognostic and therapeutic marker for human lung squamous cell carcinoma." *Mol Cancer* 12(1): 125.

Gormley, J. A., S. M. Hegarty, A. O'Grady, M. R. Stevenson, R. E. Burden, H. L. Barrett, C. J. Scott, J. A. Johnston, R. H. Wilson, E. W. Kay, P. G. Johnston and S. A. Olwill (2011). "The role of Cathepsin S as a marker of prognosis and predictor of chemotherapy benefit in adjuvant CRC: a pilot study." *Br J Cancer* 105(10): 1487-1494.

Gornall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David (1949). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction." *J Biol Chem* 177(2): 751-766.

Gottardis, M. M., S. P. Robinson and V. C. Jordan (1988). "Estradiol-stimulated growth of MCF-7 tumors implanted in athymic mice: a model to study the tumoristatic action of tamoxifen." *J Steroid Biochem* 30(1-6): 311-314.

Groom, J. R. and A. D. Luster (2011). "CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions." *Immunol Cell Biol* 89(2): 207-215.

Guerrero, I., H. Wong, A. Pellicer and D. E. Burstein (1986). "Activated N-ras gene induces neuronal differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells." *J Cell Physiol* 129(1): 71-76.

Haagenson, K. K. and G. S. Wu (2010). "The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment." *Cancer Metastasis Rev* 29(1): 143-149.

Haka, A. S., I. Grosheva, E. Chiang, A. R. Buxbaum, B. A. Baird, L. M. Pierini and F. R. Maxfield (2009). "Macrophages create an acidic extracellular hydrolytic compartment to digest aggregated lipoproteins." *Mol Biol Cell* 20(23): 4932-4940.

Harbeck, N., M. Schmitt, C. Meisner, C. Friedel, M. Untch, M. Schmidt, C. G. Sweep, B. W. Lisboa, M. P. Lux, T. Beck, S. Hasmuller, M. Kiechle, F. Janicke and C. Thomssen (2013). "Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients." *Eur J Cancer* 49(8): 1825-1835.

Harris, L., H. Fritsche, R. Menzel, L. Norton, P. Ravdin, S. Taube, M. R. Somerfield, D. F. Hayes and R. C. Bast, Jr. (2007). "American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer." *J Clin Oncol* 25(33): 5287-5312.

Harris, L. N., N. Ismaila, L. M. McShane, F. Andre, D. E. Collyar, A. M. Gonzalez-Angulo, E. H. Hammond, N. M. Kuderer, M. C. Liu, R. G. Mennel, C. Van Poznak, R. C. Bast and D. F. Hayes (2016). "Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline." *J Clin Oncol* 34(10): 1134-1150.

Heise, C. E., A. Pahuja, S. C. Hudson, M. S. Mistry, A. L. Putnam, M. M. Gross, P. A. Gottlieb, W. S. Wade, M. Kiankarimi, D. Schwarz, P. Crowe, A. Zlotnik and D. G. Alleva (2005). "Pharmacological characterization of CXC chemokine receptor 3 ligands and a small molecule antagonist." *J Pharmacol Exp Ther* 313(3): 1263-1271.

Herynk, M. H., A. R. Beyer, Y. Cui, H. Weiss, E. Anderson, T. P. Green and S. A. Fuqua (2006). "Cooperative action of tamoxifen and c-Src inhibition in preventing the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer cells." *Mol Cancer Ther* 5(12): 3023-3031.

Heywang-Kobrunner, S. H., I. Schreer, T. Decker and W. Bocker (2003). "Interdisciplinary consensus on the use and technique of vacuum-assisted stereotactic breast biopsy." *Eur J Radiol* 47(3): 232-236.

Hirano, S., Y. Iwashita, A. Sasaki, S. Kai, M. Ohta and S. Kitano (2007). "Increased mRNA expression of chemokines in hepatocellular carcinoma with tumor-infiltrating lymphocytes." *J Gastroenterol Hepatol* 22(5): 690-696.

Ikeda, Y., T. Ikata, T. Mishiro, S. Nakano, M. Ikebe and S. Yasuoka (2000). "Cathepsins B and L in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and the effect of cathepsin B on the activation of pro-urokinase." *J Med Invest* 47(1-2): 61-75.

Illy, C., O. Quraishi, J. Wang, E. Purisima, T. Vernet and J. S. Mort (1997). "Role of the occluding loop in cathepsin B activity." *J Biol Chem* 272(2): 1197-1202.

Ioannidis, L. J., C. Q. Nie and D. S. Hansen (2014). "The role of chemokines in severe malaria: more than meets the eye." *Parasitology* 141(5): 602-613.

Isberg, V., S. Mordalski, C. Munk, K. Rataj, K. Harpsoe, A. S. Hauser, B. Vroling, A. J. Bojarski, G. Vriend and D. E. Gloriam (2016). "GPCRdb: an information system for G protein-coupled receptors." *Nucleic Acids Res* 44(D1): D356-364.

Janicke, F., M. Schmitt, L. Pache, K. Ulm, N. Harbeck, H. Hofler and H. Graeff (1993). "Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 24(3): 195-208.

Ji, R., C. M. Lee, L. W. Gonzales, Y. Yang, M. O. Aksoy, P. Wang, E. Brailoiu, N. Dun, M. T. Hurford and S. G. Kelsen (2008). "Human type II pneumocyte chemotactic responses to CXCR3 activation are mediated by splice variant A." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294(6): L1187-1196.

Jijon, H. B., A. Buret, C. L. Hirota, M. D. Hollenberg and P. L. Beck (2012). "The EGF receptor and HER2 participate in TNF-alpha-dependent MAPK activation and IL-8 secretion in intestinal epithelial cells." *Mediators Inflamm* 2012: 207398.

Jordan, V. C. (1976). "Antiestrogenic and antitumor properties of tamoxifen in laboratory animals." *Cancer Treat Rep* 60(10): 1409-1419.

Jung, D., K. M. Lee, W. H. Kim, J. Y. Lee, T. Y. Kim, S. A. Im, K. H. Lee, D. Spiegel and B. J. Hahm (2016). "Longitudinal Association of Poor Sleep Quality With Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting in Patients With Breast Cancer." *Psychosom Med*.

Karre, K. (2008). "Natural killer cell recognition of missing self." *Nat Immunol* 9(5): 477-480.

Kato, C., T. Kajiwara, M. Numazaki, H. Takagi and N. Kojima (2008). "Oligomannose-coated liposomes activate ERK via Src kinases and PI3K/Akt in J774A.1 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 372(4): 898-901.

Kawada, K., H. Hosogi, M. Sonoshita, H. Sakashita, T. Manabe, Y. Shimahara, Y. Sakai, A. Takabayashi, M. Oshima and M. M. Taketo (2007). "Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes." *Oncogene* 26(32): 4679-4688.

Kawada, K. and M. M. Taketo (2011). "Significance and mechanism of lymph node metastasis in cancer progression." *Cancer Res* 71(4): 1214-1218.

Keeley, E. C., B. Mehrad and R. M. Strieter (2010). "CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases." *Adv Cancer Res* 106: 91-111.

Khan, I. A., J. A. MacLean, F. S. Lee, L. Casciotti, E. DeHaan, J. D. Schwartzman and A. D. Luster (2000). "IP-10 is critical for effector T cell trafficking and host survival in *Toxoplasma gondii* infection." *Immunity* 12(5): 483-494.

Kim, C., Y. Sano, K. Todorova, B. A. Carlson, L. Arpa, A. Celada, T. Lawrence, K. Otsu, J. L. Brissette, J. S. Arthur and J. M. Park (2008). "The kinase p38 alpha serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression." *Nat Immunol* 9(9): 1019-1027.

Kippenberger, S., S. Loitsch, M. Guschel, J. Muller, Y. Knies, R. Kaufmann and A. Bernd (2005). "Mechanical stretch stimulates protein kinase B/Akt phosphorylation in epidermal cells via angiotensin II type 1 receptor and epidermal growth factor receptor." *J Biol Chem* 280(4): 3060-3067.

Kippenberger, S., S. Loitsch, J. Muller, M. Guschel, A. Ramirez-Bosca, R. Kaufmann and A. Bernd (2000). "Melanocytes respond to mechanical stretch by activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK)." *Pigment Cell Res* 13(4): 278-280.

- Kistner, L., D. Doll, A. Holtorf, U. Nitsche and K. P. Janssen (2017). "Interferon-inducible CXC-chemokines are crucial immune modulators and survival predictors in colorectal cancer." *Oncotarget* 8(52): 89998-90012.
- Kondo, T., F. Ito, H. Nakazawa, S. Horita, Y. Osaka and H. Toma (2004). "High expression of chemokine gene as a favorable prognostic factor in renal cell carcinoma." *J Urol* 171(6 Pt 1): 2171-2175.
- Kreienberg, R., U. S. Albert, M. Follmann, I. B. Kopp, T. Kuhn and A. Wockel (2013). "Interdisciplinary GoR level III Guidelines for the Diagnosis, Therapy and Follow-up Care of Breast Cancer: Short version - AWMF Registry No.: 032-045OL AWMF-Register-Nummer: 032-045OL - Kurzversion 3.0, Juli 2012." *Geburtshilfe Frauenheilkd* 73(6): 556-583.
- Kuno, K., Y. Terashima and K. Matsushima (1999). "ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix." *J Biol Chem* 274(26): 18821-18826.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lasagni, L., M. Francalanci, F. Annunziato, E. Lazzeri, S. Giannini, L. Cosmi, C. Sagrinati, B. Mazzinghi, C. Orlando, E. Maggi, F. Marra, S. Romagnani, M. Serio and P. Romagnani (2003). "An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4." *J Exp Med* 197(11): 1537-1549.
- Lazennec, G. and A. Richmond (2010). "Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation." *Trends Mol Med* 16(3): 133-144.
- Lebeau, A., M. Kriegsmann, E. Burandt and H. P. Sinn (2014). "[Invasive breast cancer: the current WHO classification]." *Pathologe* 35(1): 7-17.
- Leibovici, J., O. Itzhaki, M. Huszar and J. Sinai (2011). "The tumor microenvironment: part 1." *Immunotherapy* 3(11): 1367-1384.
- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variance. In 'Contributions to Probability and Statistics'. (Eds I Olkin, SG Ghurye, W Hoeffding, WG Madow, HB Mann) pp. 278-292, Stanford University Press: Stanford, CA.
- Levicar, N., J. Kos, A. Blejec, R. Golouh, I. Vrhovec, S. Frkovic-Grazio and T. T. Lah (2002). "Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients." *Cancer Detect Prev* 26(1): 42-49.
- Li, D., M. A. Shatos, R. R. Hodges and D. A. Dartt (2013). "Role of PKC α activation of Src, PI-3K/AKT, and ERK in EGF-stimulated proliferation of rat and human conjunctival goblet cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(8): 5661-5674.

- Li, J. and K. Ley (2015). "Lymphocyte migration into atherosclerotic plaque." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(1): 40-49.
- Li, Y., J. C. Reader, X. Ma, N. Kundu, T. Kochel and A. M. Fulton (2015). "Divergent roles of CXCR3 isoforms in promoting cancer stem-like cell survival and metastasis." *Breast Cancer Res Treat* 149(2): 403-415.
- Liao, F., R. L. Rabin, J. R. Yannelli, L. G. Koniaris, P. Vanguri and J. M. Farber (1995). "Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization." *J Exp Med* 182(5): 1301-1314.
- Liu, M., S. Guo, J. M. Hibbert, V. Jain, N. Singh, N. O. Wilson and J. K. Stiles (2011). "CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications." *Cytokine Growth Factor Rev* 22(3): 121-130.
- Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition." *Immunol Today* 11(7): 237-244.
- Llanes-Fernandez, L., R. I. Alvarez-Goyanes, C. Arango-Prado Mdel, J. M. Alcocer-Gonzalez, J. C. Mojarrieta, X. E. Perez, M. O. Lopez, S. F. Odio, R. Camacho-Rodriguez, M. E. Guerra-Yi, V. Madrid-Marina, R. Tamez-Guerra and C. Rodriguez-Padilla (2006). "Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients." *Breast* 15(4): 482-489.
- Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini and B. Moser (1996). "Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes." *J Exp Med* 184(3): 963-969.
- Loetscher, M., P. Loetscher, N. Brass, E. Meese and B. Moser (1998). "Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization." *Eur J Immunol* 28(11): 3696-3705.
- Loetscher, P. and I. Clark-Lewis (2001). "Agonistic and antagonistic activities of chemokines." *J Leukoc Biol* 69(6): 881-884.
- Loetscher, P., M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini and B. Moser (1996). "Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release." *J Immunol* 156(1): 322-327.
- Loos, T., L. Dekeyzer, S. Struyf, E. Schutyser, K. Gijssbers, M. Gouwy, A. Fraeyman, W. Put, I. Ronsse, B. Grillet, G. Opdenakker, J. Van Damme and P. Proost (2006). "TLR ligands and cytokines induce CXCR3 ligands in endothelial cells: enhanced CXCL9 in autoimmune arthritis." *Lab Invest* 86(9): 902-916.
- Loscalzo, J., B. Melnick and R. I. Handin (1985). "The interaction of platelet factor four and glycosaminoglycans." *Arch Biochem Biophys* 240(1): 446-455.

- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-275.
- Luster, A. D. and J. V. Ravetch (1987). "Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10)." *J Exp Med* 166(4): 1084-1097.
- Ma, X., K. Norsworthy, N. Kundu, W. H. Rodgers, P. A. Gimotty, O. Goloubeva, M. Lipsky, Y. Li, D. Holt and A. Fulton (2009). "CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model." *Mol Cancer Ther* 8(3): 490-498.
- MacKenna, D. A., F. Dolfi, K. Vuori and E. Ruoslahti (1998). "Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts." *J Clin Invest* 101(2): 301-310.
- Maione, T. E., G. S. Gray, J. Petro, A. J. Hunt, A. L. Donner, S. I. Bauer, H. F. Carson and R. J. Sharpe (1990). "Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides." *Science* 247(4938): 77-79.
- Mann, H. B. and D. R. Whitney (1947). "On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other." 50-60.
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." *Nat Immunol* 5(12): 1260-1265.
- Massihnia, D., A. Galvano, D. Fanale, A. Perez, M. Castiglia, L. Incorvaia, A. Listi, S. Rizzo, G. Cicero, V. Bazan, S. Castorina and A. Russo (2016). "Triple negative breast cancer: shedding light onto the role of pi3k/akt/mtor pathway." *Oncotarget* 7(37): 60712-60722.
- Matkowski, R., I. Gisterek, A. Halon, A. Lacko, K. Szewczyk, U. Staszek, M. Pudelko, B. Szynglarewicz, J. Szelachowska, A. Zolnierok and J. Kornafel (2009). "The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer." *Anticancer Res* 29(7): 2445-2451.
- McCune, K., P. Bhat-Nakshatri, M. A. Thorat, K. P. Nephew, S. Badve and H. Nakshatri (2010). "Prognosis of hormone-dependent breast cancers: implications of the presence of dysfunctional transcriptional networks activated by insulin via the immune transcription factor T-bet." *Cancer Res* 70(2): 685-696.
- McLaren, K. M., L. Holloway and D. S. Pepper (1980). "Human platelet factor 4 and tissue mast cells." *Thromb Res* 19(1-2): 293-297.
- Meidenbauer, N., A. Zippelius, M. J. Pittet, M. Laumer, S. Vogl, J. Heymann, M. Rehli, B. Seliger, S. Schwarz, F. A. Le Gal, P. Y. Dietrich, R. Andreesen, P. Romero and A. Mackensen (2004). "High frequency of functionally active Melan-a-specific T cells in a patient with progressive immunoproteasome-deficient melanoma." *Cancer Res* 64(17): 6319-6326.

- Meiser, A., A. Mueller, E. L. Wise, E. M. McDonagh, S. J. Petit, N. Saran, P. C. Clark, T. J. Williams and J. E. Pease (2008). "The chemokine receptor CXCR3 is degraded following internalization and is replenished at the cell surface by de novo synthesis of receptor." *J Immunol* 180(10): 6713-6724.
- Mocellin, S., M. C. Panelli, E. Wang, D. Nagorsen and F. M. Marincola (2003). "The dual role of IL-10." *Trends Immunol* 24(1): 36-43.
- Morimoto, J., H. Yoneyama, A. Shimada, T. Shigihara, S. Yamada, Y. Oikawa, K. Matsushima, T. Saruta and S. Narumi (2004). "CXC chemokine ligand 10 neutralization suppresses the occurrence of diabetes in nonobese diabetic mice through enhanced beta cell proliferation without affecting insulinitis." *J Immunol* 173(11): 7017-7024.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Mulligan, A. M., I. Raitman, L. Feeley, D. Pinnaduwa, L. T. Nguyen, F. P. O'Malley, P. S. Ohashi and I. L. Andrulis (2013). "Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry." *Clin Cancer Res* 19(2): 336-346.
- Murphy, P. M. (2002). "International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature." *Pharmacol Rev* 54(2): 227-229.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." *Pharmacol Rev* 52(1): 145-176.
- Musil, D., D. Zucic, D. Turk, R. A. Engh, I. Mayr, R. Huber, T. Popovic, V. Turk, T. Towatari, N. Katunuma and et al. (1991). "The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity." *EMBO J* 10(9): 2321-2330.
- Neptune, E. R. and H. R. Bourne (1997). "Receptors induce chemotaxis by releasing the betagamma subunit of Gi, not by activating Gq or Gs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(26): 14489-14494.
- Neve, R. M., K. Chin, J. Fridlyand, J. Yeh, F. L. Baehner, T. Fevr, L. Clark, N. Bayani, J. P. Coppe, F. Tong, T. Speed, P. T. Spellman, S. DeVries, A. Lapuk, N. J. Wang, W. L. Kuo, J. L. Stilwell, D. Pinkel, D. G. Albertson, F. M. Waldman, F. McCormick, R. B. Dickson, M. D. Johnson, M. Lippman, S. Ethier, A. Gazdar and J. W. Gray (2006). "A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes." *Cancer Cell* 10(6): 515-527.
- Neves, S. R., P. T. Ram and R. Iyengar (2002). "G protein pathways." *Science* 296(5573): 1636-1639.

New, D. C. and Y. H. Wong (2007). "Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression." *J Mol Signal* 2: 2.

Nouh, M. A., M. M. Mohamed, M. El-Shinawi, M. A. Shaalan, D. Cavallo-Medved, H. M. Khaled and B. F. Sloane (2011). "Cathepsin B: a potential prognostic marker for inflammatory breast cancer." *J Transl Med* 9: 1.

Ohmori, Y., L. Wyner, S. Narumi, D. Armstrong, M. Stoler and T. A. Hamilton (1993). "Tumor necrosis factor- α induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo." *Am J Pathol* 142(3): 861-870.

Palomino, D. C. and L. C. Marti (2015). "Chemokines and immunity." *Einstein (Sao Paulo)* 13(3): 469-473.

Parada, L. F., C. J. Tabin, C. Shih and R. A. Weinberg (1982). "Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene." *Nature* 297(5866): 474-478.

Pavlova, A., J. C. Krupa, J. S. Mort, M. Abrahamson and I. Bjork (2000). "Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration By release of loop anchoring through mutation of his110." *FEBS Lett* 487(2): 156-160.

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 406(6797): 747-752.

Petersen, F., L. Bock, H. D. Flad and E. Brandt (1999). "Platelet factor 4-induced neutrophil-endothelial cell interaction: involvement of mechanisms and functional consequences different from those elicited by interleukin-8." *Blood* 94(12): 4020-4028.

Petersson, M., J. Charo, F. Salazar-Onfray, G. Noffz, M. Mohaupt, Z. Qin, G. Klein, T. Blankenstein and R. Kiessling (1998). "Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1." *J Immunol* 161(5): 2099-2105.

Petrai, I., K. Rombouts, L. Lasagni, F. Annunziato, L. Cosmi, R. G. Romanelli, C. Sagrinati, B. Mazzinghi, M. Pinzani, S. Romagnani, P. Romagnani and F. Marra (2008). "Activation of p38(MAPK) mediates the angiostatic effect of the chemokine receptor CXCR3-B." *Int J Biochem Cell Biol* 40(9): 1764-1774.

Plourde, P. V., M. Dyroff and M. Dukes (1994). "Arimidex: a potent and selective fourth-generation aromatase inhibitor." *Breast Cancer Res Treat* 30(1): 103-111.

Proost, P., E. Schutyser, P. Menten, S. Struyf, A. Wuyts, G. Opdenakker, M. Detheux, M. Parmentier, C. Durinx, A. M. Lambeir, J. Neyts, S. Liekens, P. C. Maudgal, A. Billiau and J. Van Damme (2001). "Amino-terminal truncation of CXCR3 agonists impairs receptor

signaling and lymphocyte chemotaxis, while preserving antiangiogenic properties." *Blood* 98(13): 3554-3561.

Pu, Y., S. Li, C. Zhang, Z. Bao, Z. Yang and L. Sun (2015). "High expression of CXCR3 is an independent prognostic factor in glioblastoma patients that promotes an invasive phenotype." *J Neurooncol* 122(1): 43-51.

Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser and C. R. Mackay (1998). "The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions." *J Clin Invest* 101(4): 746-754.

Quraishi, O., D. K. Nagler, T. Fox, J. Sivaraman, M. Cygler, J. S. Mort and A. C. Storer (1999). "The occluding loop in cathepsin B defines the pH dependence of inhibition by its propeptide." *Biochemistry* 38(16): 5017-5023.

Rabellino, E. M., R. B. Levene, L. L. Leung and R. L. Nachman (1981). "Human megakaryocytes. II. Expression of platelet proteins in early marrow megakaryocytes." *J Exp Med* 154(1): 88-100.

Rafn, B., C. F. Nielsen, S. H. Andersen, P. Szyniarowski, E. Corcelle-Termeau, E. Valo, N. Fehrenbacher, C. J. Olsen, M. Daugaard, C. Egebjerg, T. Bottzauw, P. Kohonen, J. Nylandsted, S. Hautaniemi, J. Moreira, M. Jaattela and T. Kallunki (2012). "ErbB2-driven breast cancer cell invasion depends on a complex signaling network activating myeloid zinc finger-1-dependent cathepsin B expression." *Mol Cell* 45(6): 764-776.

Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch and R. J. Davis (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." *J Biol Chem* 270(13): 7420-7426.

Raju, T. N. (2000). "The Nobel chronicles. 1994: Alfred G Gilman (b 1941) and Martin Rodbell (1925-98)." *Lancet* 355(9222): 2259.

Rathore, A. S., M. M. Goel, A. Makker, S. Kumar and A. N. Srivastava (2014). "Is the tumor infiltrating natural killer cell (NK-TILs) count in infiltrating ductal carcinoma of breast prognostically significant?" *Asian Pac J Cancer Prev* 15(8): 3757-3761.

Renart, J., J. Reiser and G. R. Stark (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(7): 3116-3120.

Repnik, U., A. E. Starr, C. M. Overall and B. Turk (2015). "Cysteine cathepsins activate ELR chemokines and inactivate non-ELR chemokines." *J Biol Chem*.

Robert-Koch-Institut. (2015). "Gesundheitsberichterstattung und Epidemiologie - Dachdokumentation Krebs: Interaktive Datenbankabfragen." from <http://www.rki.de>.

- Romero, I. L., A. Mukherjee, H. A. Kenny, L. M. Litchfield and E. Lengyel (2015). "Molecular pathways: trafficking of metabolic resources in the tumor microenvironment." *Clin Cancer Res* 21(4): 680-686.
- Rossi, A., Q. Deveraux, B. Turk and A. Sali (2004). "Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome." *Biol Chem* 385(5): 363-372.
- Rouse, J., P. Cohen, S. Trigon, M. Morange, A. Alonso-Llamazares, D. Zamanillo, T. Hunt and A. R. Nebreda (1994). "A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins." *Cell* 78(6): 1027-1037.
- Rozhin, J., M. Sameni, G. Ziegler and B. F. Sloane (1994). "Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells." *Cancer Res* 54(24): 6517-6525.
- Sadegh-Nasseri, S. and A. Kim (2015). "Exogenous antigens bind MHC class II first, and are processed by cathepsins later." *Mol Immunol* 68(2 Pt A): 81-84.
- Saftig, P. and J. Klumperman (2009). "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(9): 623-635.
- Satsangi, A., S. S. Roy, R. K. Satsangi, A. W. Tolcher, R. K. Vadlamudi, B. Goins and J. L. Ong (2015). "Synthesis of a novel, sequentially active-targeted drug delivery nanopatform for breast cancer therapy." *Biomaterials* 59: 88-101.
- Satsangi, A., S. S. Roy, R. K. Satsangi, R. K. Vadlamudi and J. L. Ong (2014). "Design of a paclitaxel prodrug conjugate for active targeting of an enzyme upregulated in breast cancer cells." *Mol Pharm* 11(6): 1906-1918.
- Sauty, A., M. Dziejman, R. A. Taha, A. S. Iarossi, K. Neote, E. A. Garcia-Zepeda, Q. Hamid and A. D. Luster (1999). "The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells." *J Immunol* 162(6): 3549-3558.
- Schaffner, A., P. Rhyn, G. Schoedon and D. J. Schaer (2005). "Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes--role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway." *J Leukoc Biol* 78(1): 202-209.
- Schmidt, M. (2008). "Node-Negative Breast Cancer: Which Patients Should Be Treated?" *Breast Care (Basel)* 3(4): 237-243.
- Schmitt, M., L. Goretzki, F. Janicke, J. Calvete, M. Eulitz, H. Kobayashi, N. Chucholowski and H. Graeff (1991). "Biological and clinical relevance of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) in breast cancer." *Biomed Biochim Acta* 50(4-6): 731-741.

- Schmitt, M., F. Janicke, N. Moniwa, N. Chucholowski, L. Pache and H. Graeff (1992). "Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance." *Biol Chem Hoppe Seyler* 373(7): 611-622.
- Seko, Y., N. Takahashi, K. Tobe, T. Kadowaki and Y. Yazaki (1999). "Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 259(1): 8-14.
- Seliger, B., R. Stoehr, D. Handke, A. Mueller, S. Ferrone, B. Wullich, A. Tannapfel, F. Hofstaedter and A. Hartmann (2010). "Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer." *Cancer Immunol Immunother* 59(4): 529-540.
- Sevenich, L., F. Werner, M. Gajda, U. Schurigt, C. Sieber, S. Muller, M. Follo, C. Peters and T. Reinheckel (2011). "Transgenic expression of human cathepsin B promotes progression and metastasis of polyoma-mid-T-induced breast cancer in mice." *Oncogene* 30(1): 54-64.
- Shin, H., S. J. Jo, D. H. Kim, O. Kwon and S. K. Myung (2015). "Efficacy of interventions for prevention of chemotherapy-induced alopecia: a systematic review and meta-analysis." *Int J Cancer* 136(5): E442-454.
- Shin, J. A., A. El-Jawahri, A. Parkes, S. M. Schleicher, H. P. Knight and J. S. Temel (2016). "Quality of Life, Mood, and Prognostic Understanding in Patients with Metastatic Breast Cancer." *J Palliat Med* 19(8): 863-869.
- Sidahmed, A. M., A. J. Leon, S. E. Bosinger, D. Banner, A. Danesh, M. J. Cameron and D. J. Kelvin (2012). "CXCL10 contributes to p38-mediated apoptosis in primary T lymphocytes in vitro." *Cytokine* 59(2): 433-441.
- Silver, F. H. and L. M. Siperko (2003). "Mechanosensing and mechanochemical transduction: how is mechanical energy sensed and converted into chemical energy in an extracellular matrix?" *Crit Rev Biomed Eng* 31(4): 255-331.
- Singh, A. K., R. K. Arya, A. K. Trivedi, S. Sanyal, R. Baral, O. Dormond, D. M. Briscoe and D. Datta "Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12." *Cytokine and Growth Factor Reviews* 24(1): 41-49.
- Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga and L. Norton (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." *N Engl J Med* 344(11): 783-792.
- Sloane, B. F., J. R. Dunn and K. V. Honn (1981). "Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential." *Science* 212(4499): 1151-1153.

Sloane, B. F., K. Moin, M. Sameni, L. R. Tait, J. Rozhin and G. Ziegler (1994). "Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene." *J Cell Sci* 107 (Pt 2): 373-384.

Slungaard, A., J. A. Fernandez, J. H. Griffin, N. S. Key, J. R. Long, D. J. Piegors and S. R. Lentz (2003). "Platelet factor 4 enhances generation of activated protein C in vitro and in vivo." *Blood* 102(1): 146-151.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.

Smyth, M. J., K. Y. Thia, E. Cretney, J. M. Kelly, M. B. Snook, C. A. Forbes and A. A. Scalzo (1999). "Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis." *J Immunol* 162(11): 6658-6662.

Sobotic, B., M. Vizovisek, R. Vidmar, P. Van Damme, V. Gocheva, J. A. Joyce, K. Gevaert, V. Turk, B. Turk and M. Fonovic (2015). "Proteomic Identification of Cysteine Cathepsin Substrates Shed from the Surface of Cancer Cells." *Mol Cell Proteomics* 14(8): 2213-2228.

Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J. C. Matese, P. O. Brown, D. Botstein, P. E. Lonning and A. L. Borresen-Dale (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19): 10869-10874.

Specht, K., N. Harbeck, J. Smida, K. Annecke, U. Reich, J. Naehrig, R. Langer, J. Mages, R. Busch, E. Kruse, L. Klein-Hitpass, M. Schmitt, M. Kiechle and H. Hoefler (2009). "Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy." *Breast Cancer Res Treat* 118(1): 45-56.

Stahl, D. (2016). "[Knowledge on Loose Sheets in the Context of fixed Theories. Theodor Leber's Research of Inflammation]." *Ntm* 24(3): 279-308.

Stoka, V., B. Turk, S. L. Schendel, T. H. Kim, T. Cirman, S. J. Snipas, L. M. Ellerby, D. Bredesen, H. Freeze, M. Abrahamson, D. Bromme, S. Krajewski, J. C. Reed, X. M. Yin, V. Turk and G. S. Salvesen (2001). "Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route." *J Biol Chem* 276(5): 3149-3157.

Strieter, R. M., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, D. Marriott and et al. (1995). "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." *J Biol Chem* 270(45): 27348-27357.

Sun, T., D. Jiang, L. Zhang, Q. Su, W. Mao and C. Jiang (2016). "Expression profile of cathepsins indicates the potential of cathepsins B and D as prognostic factors in breast cancer patients." *Oncol Lett* 11(1): 575-583.

- Swain, S. M., S. B. Kim, J. Cortes, J. Ro, V. Semiglazov, M. Campone, E. Ciruelos, J. M. Ferrero, A. Schneeweiss, A. Knott, E. Clark, G. Ross, M. C. Benyunes and J. Baselga (2013). "Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study." *Lancet Oncol* 14(6): 461-471.
- Tamemoto, H., T. Kadowaki, K. Tobe, K. Ueki, T. Izumi, Y. Chatani, M. Kohno, M. Kasuga, Y. Yazaki and Y. Akanuma (1992). "Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells." *J Biol Chem* 267(28): 20293-20297.
- Tan, M., P. Li, K. S. Klos, J. Lu, K. H. Lan, Y. Nagata, D. Fang, T. Jing and D. Yu (2005). "ErbB2 promotes Src synthesis and stability: novel mechanisms of Src activation that confer breast cancer metastasis." *Cancer Res* 65(5): 1858-1867.
- Tarazona, R., B. Sanchez-Correa, I. Casas-Aviles, C. Campos, A. Pera, S. Morgado, N. Lopez-Sejas, F. Hassouneh, J. M. Bergua, M. J. Arcos, H. Banas, J. G. Casado, E. Duran, F. Labella and R. Solana (2016). "Immunosenescence: limitations of natural killer cell-based cancer immunotherapy." *Cancer Immunol Immunother.*
- Taub, D. D. (1996). "Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well." *Cytokine Growth Factor Rev* 7(4): 355-376.
- Tian, X., J. Azpurua, C. Hine, A. Vaidya, M. Myakishev-Rempel, J. Ablueva, Z. Mao, E. Nevo, V. Gorbunova and A. Seluanov (2013). "High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat." *Nature* 499(7458): 346-349.
- Tiezzi, M. F., J. M. de Andrade, A. P. Romao, D. G. Tiezzi, M. R. Lerri, H. A. Carrara and L. A. Lara (2016). "Quality of Life in Women With Breast Cancer Treated With or Without Chemotherapy." *Cancer Nurs.*
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- Trotta, T., S. Costantini and G. Colonna (2009). "Modelling of the membrane receptor CXCR3 and its complexes with CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokines: putative target for new drug design." *Mol Immunol* 47(2-3): 332-339.
- Turk, B., I. Dolenc, E. Zerovnik, D. Turk, F. Gubensek and V. Turk (1994). "Human cathepsin B is a metastable enzyme stabilized by specific ionic interactions associated with the active site." *Biochemistry* 33(49): 14800-14806.
- Turk, V., V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk and D. Turk (2012). "Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers." *Biochim Biophys Acta* 1824(1): 68-88.

Utsumi, T., T. Suyama, Y. Imamura, M. Fuse, S. Sakamoto, N. Nihei, T. Ueda, H. Suzuki, N. Seki and T. Ichikawa (2014). "The association of CXCR3 and renal cell carcinoma metastasis." *J Urol* 192(2): 567-574.

Van den Steen, P. E., S. J. Husson, P. Proost, J. Van Damme and G. Opdenakker (2003). "Carboxyterminal cleavage of the chemokines MIG and IP-10 by gelatinase B and neutrophil collagenase." *Biochem Biophys Res Commun* 310(3): 889-896.

Van Den Steen, P. E. a., P. a. Proost, A. a. Wuyts, J. a. Van Damme and G. Opdenakker (2000). "Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact." *Blood Volume* 96 (Issue 8): 2673-2681.

van der Stappen, J. W., A. C. Williams, R. A. Maciewicz and C. Paraskeva (1996). "Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D." *Int J Cancer* 67(4): 547-554.

Van Raemdonck, K., P. E. Van den Steen, S. Liekens, J. Van Damme and S. Struyf (2015). "CXCR3 ligands in disease and therapy." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 26(3): 311-327.

Van Weemen, B. K. and A. H. Schuurs (1971). "Immunoassay using antigen-enzyme conjugates." *FEBS Lett* 15(3): 232-236.

Vandercappellen, J., J. Van Damme and S. Struyf (2008). "The role of CXC chemokines and their receptors in cancer." *Cancer Lett* 267(2): 226-244.

Vasseur, S., C. Malicet, E. L. Calvo, C. Labrie, P. Berthezene, J. C. Dagorn and J. L. Iovanna (2003). "Gene expression profiling by DNA microarray analysis in mouse embryonic fibroblasts transformed by rasV12 mutated protein and the E1A oncogene." *Mol Cancer* 2: 19.

Victor, B. C., A. Anbalagan, M. M. Mohamed, B. F. Sloane and D. Cavallo-Medved (2011). "Inhibition of cathepsin B activity attenuates extracellular matrix degradation and inflammatory breast cancer invasion." *Breast Cancer Res* 13(6): R115.

Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr. and K. W. Kinzler (2013). "Cancer genome landscapes." *Science* 339(6127): 1546-1558.

von Hundelshausen, P., R. R. Koenen, M. Sack, S. F. Mause, W. Adriaens, A. E. Proudfoot, T. M. Hackeng and C. Weber (2005). "Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium." *Blood* 105(3): 924-930.

Walser, T. C., X. Ma, N. Kundu, R. Dorsey, O. Goloubeva and A. M. Fulton (2007). "Immune-mediated modulation of breast cancer growth and metastasis by the chemokine Mig (CXCL9) in a murine model." *J Immunother* 30(5): 490-498.

- Walser, T. C., S. Rifat, X. Ma, N. Kundu, C. Ward, O. Goloubeva, M. G. Johnson, J. C. Medina, T. L. Collins and A. M. Fulton (2006). "Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer." *Cancer Res* 66(15): 7701-7707.
- Wang, Y. L., X. Dai, Y. D. Li, R. X. Cheng, B. Deng, X. X. Geng and H. J. Zhang (2015). "Study of PIK3CA, BRAF, and KRAS mutations in breast carcinomas among Chinese women in Qinghai." *Genet Mol Res* 14(4): 14840-14846.
- Wayne, J., J. Sielski, A. Rizvi, K. Georges and D. Hutter (2006). "ERK regulation upon contact inhibition in fibroblasts." *Mol Cell Biochem* 286(1-2): 181-189.
- Weiner, L. M. (1999). "An overview of monoclonal antibody therapy of cancer." *Semin Oncol* 26(4 Suppl 12): 41-50.
- Wendel, M., I. E. Galani, E. Suri-Payer and A. Cerwenka (2008). "Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands." *Cancer Res* 68(20): 8437-8445.
- Wennerberg, E., V. Kremer, R. Childs and A. Lundqvist (2015). "CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo." *Cancer Immunol Immunother* 64(2): 225-235.
- Wightman, S. C., A. Uppal, S. P. Pitroda, S. Ganai, B. Burnette, M. Stack, G. Oshima, S. Khan, X. Huang, M. C. Posner, R. R. Weichselbaum and N. N. Khodarev (2015). "Oncogenic CXCL10 signalling drives metastasis development and poor clinical outcome." *Br J Cancer*.
- Willstätter, R. and E. Bamann (1929). Über die Proteasen der Magenschleimhaut. Erste Abhandlung über die Enzyme der Leukocyten. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*. 180: 127.
- Windmüller, C., D. Zech, S. Avril, M. Boxberg, T. Dawidek, B. Schmalfeldt, M. Schmitt, M. Kiechle and H. Bronger (2017). "CXCR3 mediates ascites-directed tumor cell migration and predicts poor outcome in ovarian cancer patients." *Oncogenesis* 6(5): e331.
- Withana, N. P., G. Blum, M. Sameni, C. Slaney, A. Anbalagan, M. B. Olive, B. N. Bidwell, L. Edgington, L. Wang, K. Moin, B. F. Sloane, R. L. Anderson, M. S. Bogoyo and B. S. Parker (2012). "Cathepsin B inhibition limits bone metastasis in breast cancer." *Cancer Res* 72(5): 1199-1209.
- Wolf, K. and P. Friedl (2011). "Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration." *Trends Cell Biol* 21(12): 736-744.
- Wood, L. D., D. W. Parsons, S. Jones, J. Lin, T. Sjoblom, R. J. Leary, D. Shen, S. M. Boca, T. Barber, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, Z. Dezso, V. Ustyanksky, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, R. Karchin, P. A. Wilson, J. S. Kaminker, Z. Zhang, R. Croshaw, J. Willis, D. Dawson, M. Shipitsin, J. K. Willson, S. Sukumar, K. Polyak, B. H. Park, C. L. Pethiyagoda, P. V. Pant, D. G. Ballinger, A. B. Sparks, J. Hartigan, D. R. Smith, E. Suh, N. Papadopoulos,

- P. Buckhaults, S. D. Markowitz, G. Parmigiani, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu and B. Vogelstein (2007). "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers." *Science* 318(5853): 1108-1113.
- Wu, Q., R. Dhir and A. Wells (2012). "Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion." *Mol Cancer* 11: 3.
- Xanthou, G., T. J. Williams and J. E. Pease (2003). "Molecular characterization of the chemokine receptor CXCR3: evidence for the involvement of distinct extracellular domains in a multi-step model of ligand binding and receptor activation." *Eur J Immunol* 33(10): 2927-2936.
- Xu, Z., X. Zhang, J. Lau and J. Yu (2016). "C-X-C motif chemokine 10 in non-alcoholic steatohepatitis: role as a pro-inflammatory factor and clinical implication." *Expert Rev Mol Med* 18: e16.
- Yamakawa, D., H. Kidoya, S. Sakimoto, W. Jia, H. Naito and N. Takakura (2013). "Ligand-independent Tie2 dimers mediate kinase activity stimulated by high dose angiopoietin-1." *J Biol Chem* 288(18): 12469-12477.
- Yang, C., W. Zheng and W. Du (2016). "CXCR3A contributes to the invasion and metastasis of gastric cancer cells." *Oncol Rep* 36(3): 1686-1692.
- Yang, W. E., C. C. Ho, S. F. Yang, S. H. Lin, K. T. Yeh, C. W. Lin and M. K. Chen (2016). "Cathepsin B Expression and the Correlation with Clinical Aspects of Oral Squamous Cell Carcinoma." *PLoS One* 11(3): e0152165.
- Yang, X., Y. Chu, Y. Wang, R. Zhang and S. Xiong (2006). "Targeted in vivo expression of IFN-gamma-inducible protein 10 induces specific antitumor activity." *J Leukoc Biol* 80(6): 1434-1444.
- Youssef, A. and P. Barkhan (1968). "Release of platelet factor 4 by adenosine diphosphate and other platelet-aggregating agents." *Br Med J* 1(5594): 746-747.
- Zhang, H., T. Fu, S. McGettigan, S. Kumar, S. Liu, D. Speicher, L. Schuchter and X. Xu (2011). "IL-8 and cathepsin B as melanoma serum biomarkers." *Int J Mol Sci* 12(3): 1505-1518.
- Zhou, B., X. Hou and S. Shi (2015). "[Relationship between expression of MMP-2 and prognosis in human laryngeal squamous cell carcinoma]." *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 29(23): 2067-2071.
- Zhou, H., J. Wu, T. Wang, X. Zhang and D. Liu (2016). "CXCL10/CXCR3 axis promotes the invasion of gastric cancer via PI3K/AKT pathway-dependent MMPs production." *Biomed Pharmacother* 82: 479-488.

Zipin-Roitman, A., T. Meshel, O. Sagi-Assif, B. Shalmon, C. Avivi, R. M. Pfeffer, I. P. Witz and A. Ben-Baruch (2007). "CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells." *Cancer Res* 67(7): 3396-3405.

Zou, Y. R., A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi and D. R. Littman (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." *Nature* 393(6685): 595-599.

7 Abkürzungen

Abkürzung	
ADAM	Disintegrin und Metalloprotease
ALND	Axilläre Lymphknotendisektion
ATP	Adenosintriphosphat
BET	brusterhaltende Therapie
BRCA 1/2	„Breast cancer“ ½ (Tumorsuppressorgen)
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD4+	<i>cluster of differentiation 4</i>
CD8+	<i>cluster of differentiation 8</i>
CTX	Chemotherapie
DARC	Duffy Antigen/Receptor für Chemokine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP IV	Dipeptidylpeptidase 4
ECL	Extrazelluläre Schleife
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“ (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
ELR	Glutamyl-Leucyl-Arginin-Motiv
ER	Östrogenrezeptor
ERK	„Extracellular-signal Regulated Kinase“, auch p42/44 MAPK
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	„fetal calf serum“ (fetales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G _i	G-Inhibitor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
G _s	G-stimulierend
HER2	„human epidermal growth factor receptor 2“ (humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2)
HR	Hormonrezeptor
HRP	„ <i>horseradish peroxidase</i> “ (Meerrettichperoxidase)
ICL	Intrazelluläre Schleife
IFN-γ	Interferon-γ
Il-10	Interleukin 10
Il-8	Interleukin 8
LK	Lymphknoten
MAPK	„mitogen activated protein“-Kinase
ME	Mastektomie
MHC-I	„Major Histocompatibility Complex“ (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMP	Matrix-Metalloproteinase

NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NST	„non specific type“ (invasives Mammakarzinom des nicht spezifischen Typs)
PAI-I	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PBMC	„peripheral blood mononuclear cells“ (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	„phosphate buffered saline“ (phosphatgepufferte Salzlösung)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PR	Progesteronrezeptor
PST	Primär systemische Therapie (Mammakarzinom)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	Akronym aus „rat“ und „sarcoma“
RTX	Strahlentherapie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERM	Selektiver Östrogen-Rezeptormodulator
SH2 und SH3	Src-Homologiedomäne 2 und 3
SLN	„Sentinellymphnode“ (Wächterlymphknoten)
SLNB	„Sentinellymphnode biopsie“ (Wächterlymphknotenentfernung)
Src	Akronym aus „cellular“ und „sarcoma“
TBS	„Tris-buffered saline“ (trisgepufferte Salzlösung)
TBSTT	TBS mit Tween und Triton
TIMP	„Tissue inhibitor of metalloproteinases“ (Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen)
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNBC	„triple negative breast cancer“ (Hormonrezeptor negatives, HER2 negatives Mammakarzinom)
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
UICC	„Union internationale contre le cancer“ (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
WHO	„World Health Organisation“ (Weltgesundheitsorganisation)

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Holger Bronger für die Betreuung dieser Arbeit und letztlich auch deren Vertretung vor dem Promotionsausschuss. Von der fachlichen Einführung in die Laborarbeit bis hin zur Korrektur des Manuskripts konnte ich mich stets auf deine umfassende Unterstützung und wissenschaftliche Kompetenz verlassen. Daher freut es mich besonders, dass unsere freundschaftliche Zusammenarbeit weiterhin Bestand hat.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Manfred Schmitt für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die initiale Betreuung dieser Arbeit. Nicht nur sein großes Wissen, sondern insbesondere seine humorvolle Art werden mir immer in guter Erinnerung bleiben!

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe der Experimentellen Gynäkologie für die freundliche Aufnahme ins Team und die gute Arbeitsatmosphäre bedanken.

Vielen Dank an meine Mitdoktoranten Claudia Windmüller, Julia Hingerl, Anna Kellner und Julia Miller für ihre Freundschaft auch über das Labor hinaus.

Danke meiner Familie und meinen Freunden, die immer an mich geglaubt haben, insbesondere Lukas, der mich zusätzlich bei der statistischen Auswertung (und auch sonst immer!) unterstützt hat. Danke an Alex, der diese Arbeit musikalisch untermalt hat.