

5 Ergebnisse

Zu Beginn des Kapitels wird die Klonierung des humanen Rezeptors CCR7 und seiner Liganden CCL19 und CCL21 beschrieben; im Anschluß daran die Generierung von Zellklonen, die diesen Rezeptor in Kombination mit den Liganden auf MDA-MB435S1-Zellen stabil exprimieren. Die verwendete humane Mammakarzinomzelllinie mit niedrigem Metastasierungspotential, MDA-MB435S1, wurde im Labor von W. Birchmeier etabliert und von Meiners *et al.* (1998) beschrieben. Sowohl die stabile Expression von CCR7 als auch die Koexpression von CCL19 oder CCL21 wurde mittels PCR, Western Blot, FACS-Analyse und über funktionelle und biologische Assays getestet. Es folgen zuerst *in vitro* Ergebnisse zur biochemischen Charakterisierung und Funktionalität des Rezeptors CCR7 in verschiedenen Zelllinien. Um die biologische Rolle von ektopisch exprimierten CCR7 mit Hilfe der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB435S1 *in vivo* zu untersuchen, wurden diese Zellen immundefizienten Nacktmäusen appliziert. Zudem wurde untersucht, inwieweit eine autokrine Stimulierung von CCR7 das durch exogenes Chemokin induzierte Migrationsverhalten *in vitro* verändert. Das Migrationsverhalten und das Metastasierungspotential der stabil exprimierenden Mammakarzinomzelllinie wurde nach intravenöser Injektion in die Schwanzvene von BALB/c-Mäusen oder nach orthotoper Applikation in Nacktmäusen untersucht.

5.1 Klonierung und funktionelle Charakterisierung des Rezeptors CCR7 und dessen Liganden CCL19 und CCL21

Ziel war die Generierung von Expressionsplasmiden für den humanen Chemokinrezeptor CCR7 sowie dessen humanen Liganden CCL19 und CCL21, die separat oder in Kombination in MDA-MB435S1-Zellen exprimiert werden sollten. Primer für die Amplifikation und die Klonierung der entsprechenden cDNA-Sequenzen wurden anfangs auf der Basis der publizierten cDNA-Sequenzen dieser Moleküle entworfen (Nagira *et al.*, 1997; Ngo *et al.*, 1998; Schweickart *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1997).

5.1.1 Klonierung der CCR7 cDNA

Die Amplifikation der cDNA von CCR7 erfolgte aus Raji-Zellen mit den entsprechenden spezifischen Primer-Oligonukleotiden. Am 5'-Ende der cDNA wurde eine BamHI- und am 3'-Ende das translationale Stopcodon und eine EcoRI-Schnittstelle über die Primer eingeführt. Das PCR-Produkt wurde mit den gewählten Restriktionsenzymen geschnitten, in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3 kloniert und sequenziert. Das cDNA-Insert wies eine stille Mutation (Position 909; A->G) gegenüber der publizierten Sequenz auf. Die CCR7-cDNA wurde über BamHI und EcoRI in das Expressionsplasmid pcDNA3 kloniert, in dem

die Expression von CCR7 durch einen konstitutiv-aktiven CMV-Promotor kontrolliert wird. Die Selektion stabiler Zellklone wird über G418 ermöglicht.

5.1.2 Klonierung und Sequenzierung der CCL19 und CCL21 cDNA

Bei der Klonierung von humanen CCL19 und CCL21 aus RT-Ansätzen verschiedener Zelllinien erwies es sich als günstig, Primer für die RT-PCR zu verwenden, die an der 5'- und 3'-untranslatierten kodierenden cDNA-Region von CCL19 oder CCL21 hybridisieren. Mit Primern, die in der Nähe des Start- und Stopcodons der CCL19 cDNA hybridisieren, wurde aber verstärkt eine cDNA-Region des Proteins L3 (*Acc.No*: NM000967) amplifiziert (Abb. 4).



Abb. 4: Die cDNA-Sequenz von ribosomalem Protein L3 (742-496 bp) und humanem CCL19 (1-300 bp). a) 5' und b) 3' Primer-Sequenz; blau markierte Nukleotide: Sequenz-Übereinstimmung von L3 und CCL19; rot markierte Nukleotide: Start- bzw. Stopcodon.

Für die erfolgreiche Klonierung der cDNA von CCL19 oder CCL21 wurden aufgrund der hohen Homologie zu der cDNA von L3 mit den Primern huCCL19-Genom und huCCL21-Genom die jeweiligen genomischen Fragmente aus der DNA von BL72 amplifiziert, in verschiedene Expressionsvektoren kloniert und sequenziert. Die Kartierung der cDNA-Sequenzen zeigte, daß die Fragmente sowohl die vier Exons als auch die Introns der Gene von CCL19 (*Acc. No*: HSA223410; mit 1323 bp) und CCL21 (*Acc. No*: AJ005654; mit 673 bp) beinhalteten. Um die gespleißte cDNA für CCL19 und CCL21 zu erhalten, wurden HEK293-Zellen mit diesen genomischen Fragmenten im Expressionsplasmid pcDNA3 transfiziert. Aus einer RT-PCR (Primerpaare: huCCL19-5/3; huCCL21-5/3) heraus konnte bei transienten Transfektionen von HEK293-Zellen mit genomischer DNA-CCL19 oder genomischer DNA-CCL21 die entsprechende cDNA für CCL19 (Abb. 5a) und CCL21 (Abb. 5c) kloniert werden. Zusätzlich zur cDNA von CCL19 wurde auch eine CCL19-Spleißvariante kloniert. Dieser CCL19-Spleißvariante mit 206 bp fehlt das 3. Exon, wodurch das CCL19-Protein verkürzt ist (Abb. 5a). Diese 206 bp lange CCL19-cDNA ist auf alternatives Spleißen des genomischen CCL19-Fragments in HEK293-Zellen zurückzuführen, vielleicht weil das 3. Intron eine seltene Donor-Spleiß-Sequenz (GC-Sequenz) hat (Abb. 5a) (Thanaraj und Clark, 2001). Es wurden in keiner weiteren Zelllinie und keinem Organ (Niere und Stroma) humanen Ursprungs CCL19-Spleißvarianten gefunden. Nur in murinen Organen wie Herz, Lunge, Thymus (Abb. 6) und Niere (Daten nicht gezeigt) wurde ein CCL19-Spleißprodukt über RT-PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert, dem aber das Exon 2 fehlte. Über alternatives Spleißen des 2. Exons kommt es zu einer Leserahmen-Verschiebung, so daß ein Produkt entsteht, das im wesentlichen nur noch aus dem Signalpeptid besteht.

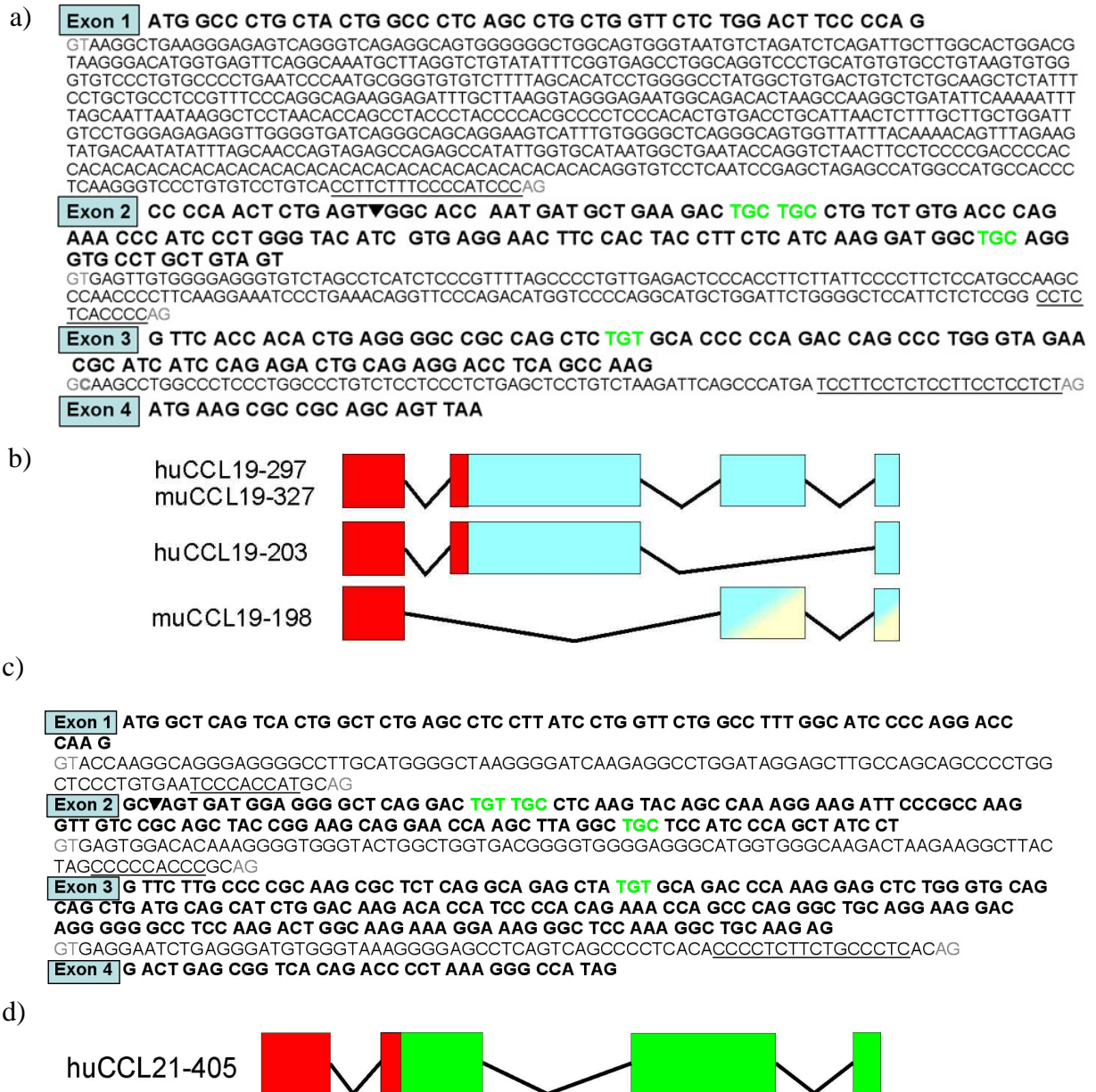


Abb. 5: Graphische Darstellung der cDNA-Sequenz und entsprechender Exon-Intron Aufbau von CCL19 a-b) und CCL21 c-d). a) humane CCL19- und c) humane CCL21-Genomsequenz:

a) 1. Exon besteht aus 49 bp, 1. Intron besteht aus 749 bp, 2. Exon besteht aus 134 bp, 2. Intron besteht aus 187 bp, 3. Exon besteht aus 94 bp, 3. Intron besteht aus 89 bp und 4. Intron besteht aus 21bp;

c) 1. Exon besteht aus 67 bp, 1. Intron besteht aus 102 bp, 2. Exon besteht aus 121 bp, 2. Intron aus 94 bp, 3. Exon besteht aus 184 bp, 3. Intron besteht aus 72 bp und 4. Exon besteht aus 33 bp.

In b) und d) werden kodierte humane (hu) oder murine (m) CCL19- und CCL21-Proteine und klonierten Spleißvarianten von CCL19 dargestellt. Zeichen: ▼ repräsentiert die potentielle Schnittstelle für ein Signalpeptid; Spleißsequenzen im Intron: Konsensussequenz für 5' und 3' Spleißstellen; Pyrimidinbasenfolge; **Konservierte Cysteine**; rot markierter Balken repräsentiert potentielles Signalpeptid von CCL19/ CCL21; blau/grün markierter Balken repräsentiert potentielles sezerniertes Protein; schattierter Balken repräsentiert untranslatiertes Exon; Linien präsentieren untranslatierte Introns; huCCL19-297 cDNA besteht aus 297 bp und kodiert 98 Aminosäuren; muCCL19-327 cDNA besteht aus 327 bp und kodiert 108 Aminosäuren; huCCL19-203 cDNA besteht aus 203 bp und kodiert 61 Aminosäuren; muCCL19-198 cDNA besteht aus 198 bp und kodiert 24 Aminosäuren; huCCL21-405 cDNA besteht aus 405 bp und kodiert 134 Aminosäuren.

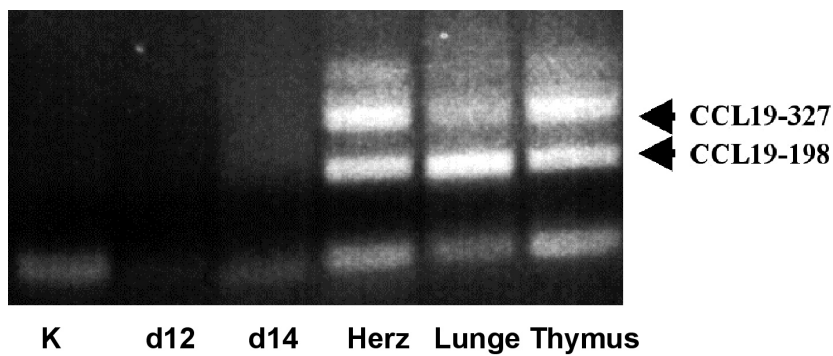


Abb. 6: Expression von murinem CCL19 in verschiedenen Organen der adulten und embryonalen Maus. Amplifizierung der cDNA von CCL19 mit CCL19-Genom für die genomische Sequenz von CCL19. Die cDNA wurde über 35 Zyklen amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte wurden durch Sequenzierung überprüft. K: Primerkontrolle; d12 und d14: Embryo Tag 12 und 14.

5.1.3 Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs über die Stimulation von CCR7

Zur Kontrolle sämtlicher Vektorkonstrukte wurden CHO-K1- oder Jurkat-Zellen transient transfiziert und die Aktivierung des MAPK-Signals nach Stimulation von CCR7 unter Verwendung des "PathDetect in vivo signal transduction pathway reporting system" und des "dual-luciferase reporter assay system" getestet. Für HEK293- und CHO-K1-Zellen war bereits bekannt, daß die heterologe Expression von CCR7 (Sullivan et al., 1999) oder anderer GPCRs die Aktivierung von ERK nach Liganden-Stimulation induziert (Müller und Lipp, 2001). Für die Untersuchung der MAP-Kinase Aktivierung wurden Jurkat-Zellen verwendet, da bereits bei Tilton *et al.* (2000) gezeigt wurde, daß CCL19 ERK2 in T-Zellen aktivieren kann. Die Aktivierung des Elk1-Transkriptionsfaktors, der in Zusammenhang mit der Aktivierung dieser MAP-Kinase steht, wurde unter Verwendung des MAPK-Assays (auch Elk-1-Assay) untersucht. Das Prinzip des Assays besteht darin, daß der chimäre Transkriptionsfaktor Elk-1 spezifisch über eine MAP-Kinase-Kaskade durch Phosphorylierung aktiviert wird, wobei die DNA-Bindungsdomäne gegen die des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4 ausgetauscht wurde. Das phosphorylierte Elk1-GAL4-Produkt aktiviert das kotransfizierte Luziferase-Gen über dessen synthetischen Promotor, bestehend aus mehrfachen Wiederholungen des GAL4-*cis*-Elements. Die Menge an synthetisierter *firefly*-Luziferase gibt Aufschluß über den Grad der Aktivierung dieses Signalwegs. Zur Normalisierung der Ergebnisse in bezug auf Variationen in der Transfektionseffizienz wurde ein weiteres Reporterplasmid eingesetzt, welches die *Renilla reniformis*-Luziferase unter Kontrolle eines Thymidin-Kinase-Promotors exprimiert. Im Dualen Reporter-Assay werden die Ergebnisse beider Lumineszenzen (R1/R2) für die unterschiedlichen Luziferasen als Verhältnis dargestellt. Dieser Assay konnte einerseits dafür verwendet werden, die biologische Aktivität des klonierten Rezeptors und seiner Liganden nachzuweisen, andererseits Aufschluß über mögliche Signalkaskaden, die mit der Aktivierung von CCR7 verbunden sind, in verschiedenen Zelllinien zu geben. Dabei zeigte sich in CCR7-kotransfizierten Jurkat-Zellen (Abb. 7a), daß die Aktivierung von Elk-1 nach exogener Liganden-Zugabe (CCL19 oder CCL21) von 100 ng/ml Ptx und 5 µM Chelerythrin Chlorid

(Che) unterdrückt werden kann. Die CCR7-abhängige Aktivierung von Elk-1 konnte nicht durch den PI3K-Inhibitor Wortmannin (200 nm) oder den PLD-Inhibitor Ethanol (2 %) inhibiert werden (Abb. 7a).

Mit Hilfe des Elk-1 Assays konnte in ektopisch CCR7-exprimierenden Jurkat-Zellen gezeigt werden, daß CCR7 über Gαi koppelt, da die Stimulation von Elk-1 über CCR7 Ptx-sensitiv war. Zudem konnte gezeigt werden, daß die Inhibierung der PKC durch Che die CCR7-induzierte Aktivierung von Elk-1 unterbindet.

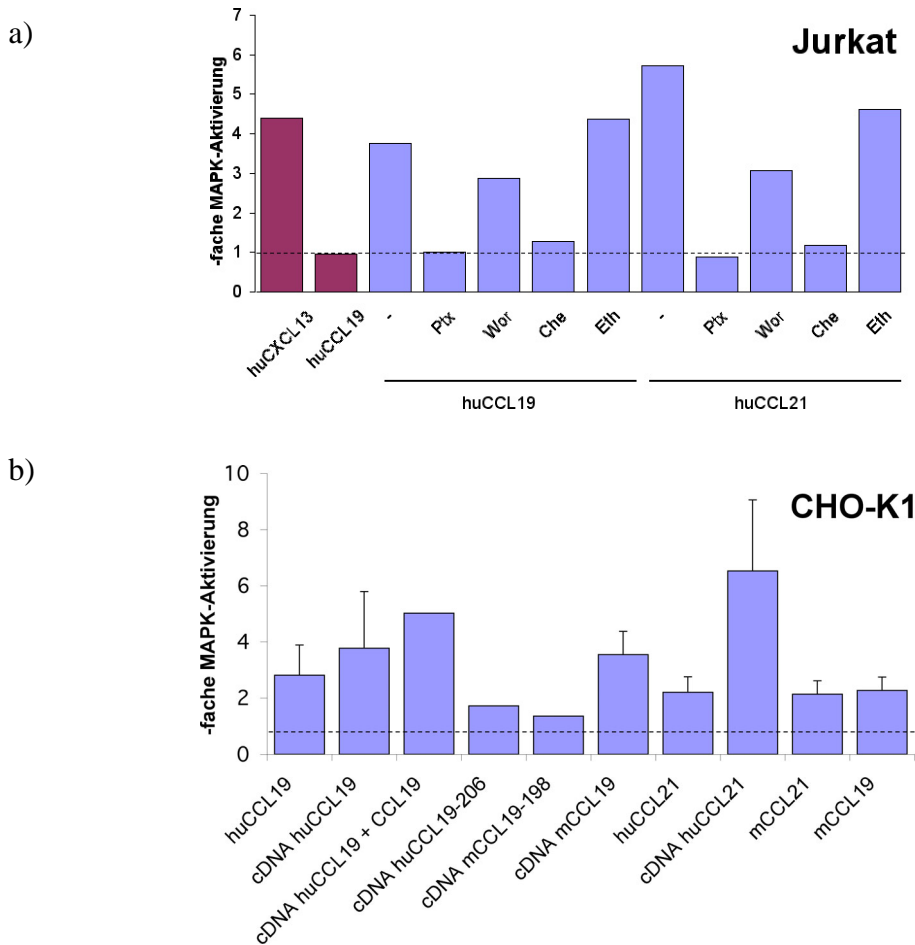


Abb. 7: Aktivierung der MAPK-Kaskade über humane CXCR5 (a) und humane CCR7 (a und b). Jurkat- oder CHO-K1-Zellen wurden transient mit den Reporterplasmiden und dem CCR7- (a und b) oder CXCR5- (a) kodierendem Plasmid kotransfiziert. Für 1 Stunde wurden die Zellen mit entsprechenden Inhibitor präinkubiert und dann für weitere 6 Stunden wie angegeben mit 30 nM rekombinanten humanen (hu) oder murinen (m) Chemokinen (CCL19, huCCL21 oder CXCL13) stimuliert. In b) wurden CHO-K1-Zellen zusätzlich mit Expressionsplasmiden kotransfiziert, die verschiedene Chemokin-kodierende cDNAs von Maus (m) oder Mensch (hu) enthalten. Die Zellen wurden wie angegeben stimuliert. Die Meßwerte jeder Abbildung in a) und b) repräsentieren den Mittelwert aus zwei oder drei (angegeben mit Standardabweichung) unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse entsprechen dem Quotienten der Luziferase-Aktivität der *firefly*-Luziferase (RLU1) und der kotransfizierten *renilla*-Luziferase (RLU2). Die *renilla*-Luziferase diente als interner Standard. Die relative Luziferase-Aktivität von RLU1 und RLU2 ist ein Maß für die Phosphorylierung von Elk-1 und damit für die MAP-Kinase Aktivierung. Die Ergebnisse sind auf die Messung unstimulierter Zellen normalisiert (=1, gestrichelte Linie). Che: 5 µM Chelerythrin Chlorid; Wort: 200 nM Wortmannin; Ptx: 100 ng/ml Pertussis-Toxin; Eth: 2% Ethanol. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Meßwerten errechnet. In der Abbildung ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten ohne Standardabweichung dargestellt.

Unerlässlich für das *in vivo* Metastasierungsmodell in der Maus war zu klären, ob der humane Rezeptor CCR7 im Zellkultursystem über murines CCL19 oder CCL21 stimuliert werden kann. Im MAPK-Assay unter Verwendung von CHO-K1-Zellen konnte gezeigt werden, daß sowohl humane als auch murine CCR7-Liganden über den humanen CCR7 Elk-1 aktivierten (Abb. 7b). Damit können die murinen Agonisten von CCR7 speziessübergreifend den humanen CCR7 *in vitro* aktivieren.

Darüber hinaus wurde gezeigt, daß CHO-K1-Zellen, die mit den Chemokin-exprimierenden Expressionsplasmiden kotransfiziert wurden, den ektopisch exprimierten humanen CCR7 vergleichbar wie rekombinantes CCL19 (hu/mCCL19) oder CCL21 (hu/mCCL21) stimulieren können. Somit konnte im MAPK-Assay gezeigt werden, daß die Expressionsplasmide mit der cDNA von humanem CCL19 oder CCL21 funktionelle CCR7-Agonisten kodieren (Abb. 7b).

Weiterhin wurde die Bedeutung der CCL19-Spleißvarianten dahingehend weiterverfolgt, ob Sie eine biologische Aktivität aufweisen. Dafür wurden CHO-K1-Zellen im Elk-1-Assay (MAPK-Assay) mit CCR7 in Kombination der verschiedenen Expressionsvektoren, die für Spleißvarianten kodieren, kotransfiziert (Abb. 7b).

Für das murine Spleißprodukt mCCL19-198 und das humane Spleißprodukt huCCL19-206 konnte keine signifikante MAPK-Aktivität gezeigt werden. Als Positivkontrolle diente die ungespleißte cDNA von CCL19. Um der Fragestellung nachzugehen, ob die Spleißvarianten als Antagonisten für CCR7 funktionieren, mußte in der Folge gezeigt werden, daß eine Stimulation mit rekombinatem (rk) CCL19 in Kombination mit einer der Spleißvarianten unterbunden werden kann. Da in diesem Assay nicht sichergestellt werden kann, in welcher Expressionshöhe die CCL19-Spleißvarianten exprimiert und schließlich sezerniert werden, müßten für eine weitere Untersuchung der biologischen Relevanz und Aktivität der potentiellen CCL19-Spleißvarianten rekombinante Spleißvarianten synthetisiert werden. Da die für die Aufreinigung notwendige Proteinmenge der Spleißprodukt nicht erhalten werden konnte, wurde eine Funktionsanalyse der Spleißprodukte nicht weiter verfolgt.

5.1.4 PKC-abhängige Kontrolle der Expression von CCR7

Viele Tumorzellen zeichnen sich nicht nur durch ein hohes Expressionsniveau von Chemokinrezeptoren aus, sondern auch durch eine Überexpression oder verstärkte Aktivität von PKC (Jarzabek et al., 2002). Um zu zeigen, daß es zwischen diesen beiden Koinzidenzen einen Zusammenhang gibt, wurden verschiedene T- und B-Zelllinien und Primärzellen aus humanen Tonsillen mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) für 20 Stunden stimuliert. Die Stimulation mit PMA führt zur starken Aktivierung von PKC und damit zu einer Veränderung im Expressionsmuster der Zelle und möglicherweise zur Veränderung des Expressionsprofils von CCR7.

Die Zellen wurden in Anwesenheit von 50 ng/ml PMA bei 37 °C kultiviert und dann mit verschiedenen Inhibitoren (wie Wortmannin, Chelerythrin Chlorid und PD98059) für weitere

6 Stunden inkubiert. Die Oberflächenexpression von CCR7 wurde per FACS mit anti-CCR7 bestimmt (Abb. 8). Die Stimulation mit PMA erhöhte die Oberflächenexpression von CCR7 auf Zellen, denen bereits ohne Stimulation CCR7 nachgewiesen werden konnte. Scheinbar hat PMA einen stärkeren Effekt auf die Expression von CCR7 auf B-Zelllinien (BL99; nicht gezeigt für BL64 und Ramos) als auf T-Zelllinien (Jurkat und Hut78; nicht gezeigt für CCRF-CEM). Alle verwendeten Inhibitoren hatten keinen Einfluß auf die Basalexpression von CCR7 (Daten nicht gezeigt). 200 nM Wortmannin und 50 µM PD98059 hatten keinen Einfluß auf die PMA-induzierte Expression von CCR7.

Wortmannin inhibiert die PI3-Kinase und PD98059 bindet die inaktive Form von MKK1/2 und inhibiert darüber die MAPK-Kaskade (Alessi et al., 1995). Die durch PMA verstärkte Expression von CCR7 konnte nur durch Präinkubation der Zellen mit 5 µM des PKC-Inhibitors Chelerythrin Chlorid auf den Basalwert reduziert werden (Abb. 8).

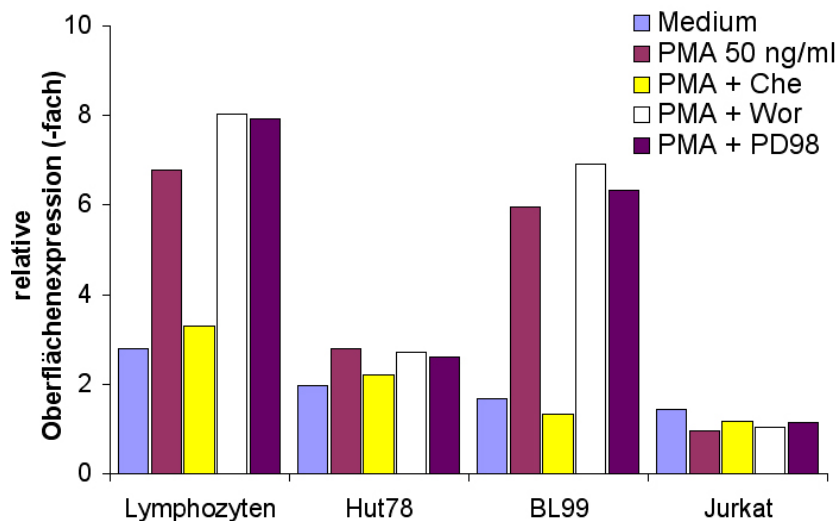


Abb. 8: Einfluß verschiedener Inhibitoren auf die PMA-induzierte relative Oberflächenexpression von CCR7 verschiedener hämatopoetischer Zellen. Zellen wurden für 20 Stunden mit 50 ng/ml PMA inkubiert und des weiteren für 6 Stunden mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Über den Quotienten der mittleren Fluoreszenz-Intensität aus der Färbung mit anti-CCR7 und entsprechenden Isotypkontroll-Antikörper wurde im FACS die relative Oberflächenexpression ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, in denen Doppelwerte bestimmt wurden. Che: 5 µM Chelerythrin Chlorid, Wor: 200 nM Wortmannin; PD98: 50 µM PD98059.

5.2 Funktionelle Charakterisierung Chemokinrezeptor- und Chemokin-exprimierender Transfektanden der humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB435S1

Für das geplante Metastasierungsmodell war es entscheidend, daß die humanen Brustkrebszellen weder CCR7 noch dessen Agonisten CCL19 oder CCL21 exprimieren. Es wurde für dieses Modell in der Nacktmaus die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB435S1 (Meiners et al., 1998) verwendet, da die Zellen endogen weder CCR7 noch CCL21 und CCL19 exprimieren (Tab. 2). Diese Zellen scheinen besonders geeignet, sowohl die Rolle von

CCR7 für die Metastasierung in Nacktmäusen zu untersuchen als auch zu analysieren, ob eine konstitutive autokrine Stimulation von CCR7 das metastatische Potential erhöhen kann.

Exemplarisch sollte zudem *in vitro* vorweg geklärt werden, ob es Tumorzellen gibt, die potentiell ebenfalls endogen CCR7 und einen seiner Liganden exprimieren. Dazu wurden verschiedene Tumorzelllinien hinsichtlich des Expressionsprofils in der RT-PCR analysiert. Es zeigte sich, daß Burkitt-Lymphomzellen, wie die Raji-Zellen, sowohl CCL19 auf mRNA-Ebene (Tab. 2) und zusätzlich CCR7 auf der Oberfläche exprimieren (Daten nicht gezeigt). Die Expressionshöhe der CCL19 mRNA in Raji-Zellen ist dabei sehr niedrig und nur in der RT-PCR nachweisbar, nicht aber im Northern-Blot. Trotz der Koexpression von Chemokin-RNA und dem entsprechenden Rezeptor, bleibt der Rezeptor CCR7 weiterhin durch exogene CCR7-Liganden stimulierbar (eigene Beobachtung).

In Kooperation mit Prof. H. Kettenmann wurden auch stabile Primärkulturen von Glioblastomen hinsichtlich des Expressionsprofils von Chemokinen untersucht. Es gelang über RT-PCR CCL21 mRNA, nicht aber CCL19 mRNA, in Primärkulturen von verschiedenen Gliomen (Tab. 2) nachzuweisen. Es wurde im Laufe dieser Experimente gezeigt, daß unter Hypoxie gehaltene Neurone CCL21 exprimieren. Ebenfalls exprimieren Endothelzellen der Bluthirnschranke während einer experimentellen allergischen Enzephalomyelitis im Tiermodell das Chemokin CCL21 (Alt et al., 2002; Biber et al., 2002; Biber et al., 2001). Dies läßt darauf schließen, daß auch CCL21 während Entzündungen und neuronalen Krankheiten in diese Prozesse involviert sein könnte.

Tabelle 2: Nachweis der endogenen mRNA Expression von Chemokinen in der RT-PCR mit spezifischen Primern.

	CXCL8	CXCL12	CXCL13	CCL17	CCL19	CCL21	CCL22
MDA-MB435S1	+	-	-	+	-	-	+
Raji	+	-	+		+	-	
Primärkultur von Glioblastomen	+	+	+	+	-	+	

5.2.1 CCR7-exprimierende MDA-MB435S1-Zellen

Trotz geringer Transfektionseffizienz (unabhängig von der Transfektionsmethode) einer transienten Transfektion von MDA-MB435S1-Zellen mit CCR7-kodierenden Plasmiden konnten zwei CCR7-exprimierende Zellklone (Klon 1 und 3) kloniert werden. Das Oberflächenexpressionsniveau von CCR7 auf diesen stabil exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen war vergleichbar dem Expressionsniveau von ebenfalls CCR7 transifizierten HEK293-Zellen.

Die Expression des humanen Rezeptors CCR7 wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 3D12 in FACS-Analysen (Abb. 9) und auch im Western Blot (Abb. 11b-c) nachgewiesen. Weitere Chemokinrezeptoren wie CXCR2, CXCR3 und CXCR4 konnten auf den MDA-MB435S1-Zellen per FACS-Analyse intrazellulär (Daten nicht gezeigt) und auf der Zelloberfläche (Abb. 9) nachgewiesen werden. Obwohl die Oberflächenexpression von

CXCR2 und CXCR4 auf den MDA-MB435S1-Zellen nur schwach ist, konnte intrazellulär eine hohe Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im *in vitro* Migrations-Assay konnte gezeigt werden, daß CXCR4 funktionell aktiv ist (Daten nicht gezeigt). Der Rezeptor CXCR3 wurde auch auf anderen Tumoren nachgewiesen, wie z.B. auf Primärkulturen von Glioblastomen (Daten nicht gezeigt). Die heterophilen Adhäsionsmoleküle CD54 und CD155, der Immunglobulin-Superfamilie zugehörig, wurden auf den MDA-MB435S1-Zellen hoch exprimiert, wohingegen die Expression von CD62L negativ war (Abb. 9).

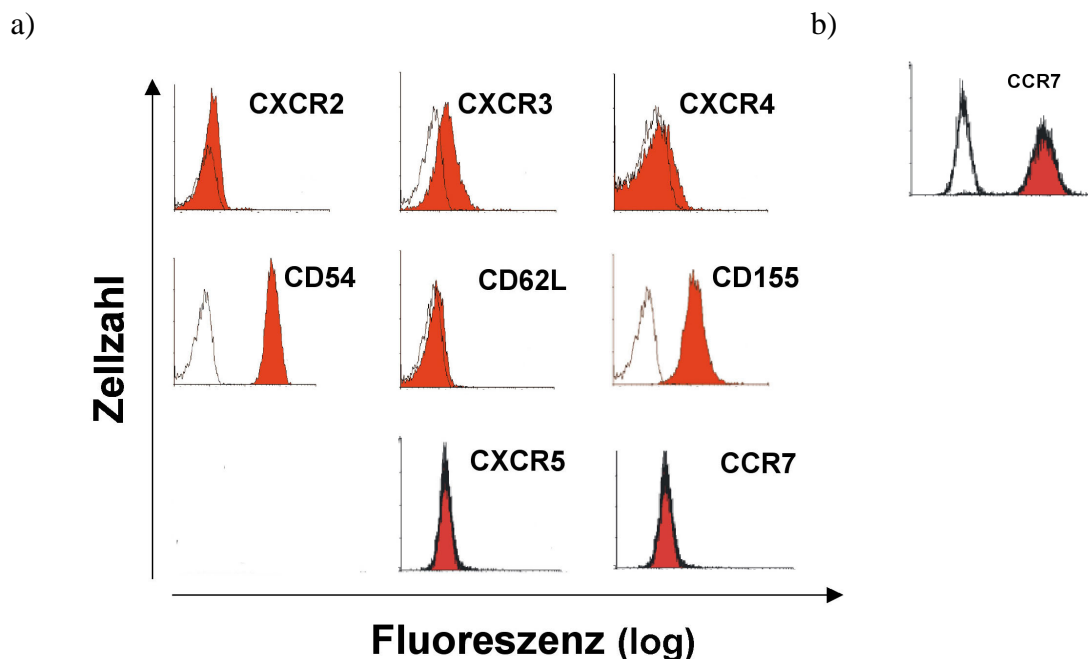


Abb. 9: Expression verschiedener Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle auf den humanen MDA-MB435S1-Zellen. a) Durchflußzytometrische Analyse der untransfizierten MDA-MB435S1-Zellen: Färbung mit einem Isotypkontroll-Antikörper ist als schwarz umrandeter Graph dargestellt; grau unterlegten Flächen entsprechen Färbungen mit spezifischen Antikörpern für CXCR2, CXCR3, CXCR4, CD54, CD62L, CD155, CCR7 und CXCR5; b) Durchflußzytometrische Analyse der stabil CCR7-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen (CCR7 Klon 1). Die Detektion der primären Antikörper und Isotypkontrollen im FACS erfolgte mit PE-markierten Esel-anti-Ratte oder anti-Maus F(ab')₂-Fragmenten.

Die funktionelle Aktivität von ektopischem CCR7 auf stabil exprimierenden Klonen wurde über den Liganden-induzierten Kalzium-Einstrom (Abb. 17) und Aktin-Polymerisierung (Abb. 10) untersucht. Kalzium-Influx und Aktin-Polymerisierung sind schnelle Reaktionen der Zelle auf die Stimulierung verschiedener Chemokinrezeptoren, die an Migrationsprozessen beteiligt sind. Es konnte gezeigt werden, daß CCR7 nach Stimulation durch humanen oder murinen CCL19 (1) einen transienten Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration (Daten nicht gezeigt) und (2) eine Aktin-Polymerisierung induzierte (Abb. 10). 20 min nach Stimulation mit humanen CCL19 von ektopisch CCR7-exprimierenden Tumorzellen ist eine starke F-Aktin-Polymerisierung in der Peripherie der Zelle zu erkennen;

zudem sind die Lamellipodien und Podosomen erkennbar. Stimulation von stabil CXCR5-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen durch CCL19 induzierte keine Zunahme der Aktin-Polymerisierung in der Peripherie (Abb. 10).

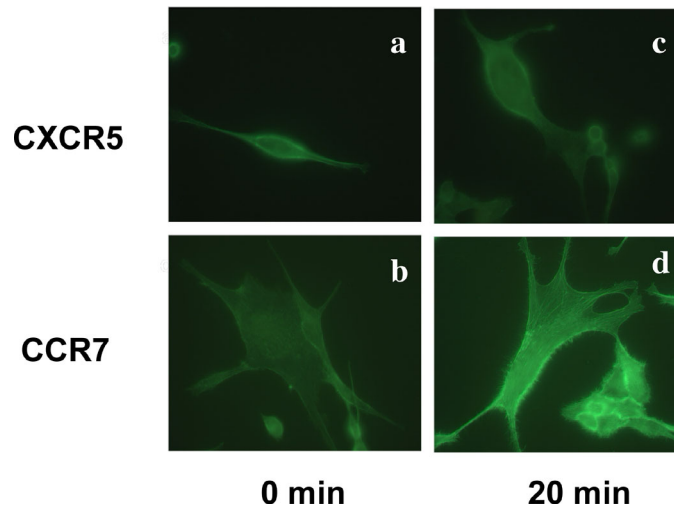


Abb. 10: F-Aktin-Polymerisierung in der Peripherie adhärent wachsender MDA-MB435S1-Zellen, die ektopisch a+c) CXCR5 oder b+d) CCR7 exprimieren. Mikroskopische Aufnahme der Zellen vor (a und b) und nach (c und d) der Stimulation mit 100 nM huCCL19 für 20 min.

5.2.2 N-Glykosylierung von CCR7 in MDA-MB4325S1-Zellen

Die ektopische Expression von CCR7 auf MDA-MB435S1-Zellen wurde nicht nur in der FACS-Analyse (Abb. 9b) sondern auch im Western Blot nachgewiesen. Da das Zellysat im einfachen Western Blot kein eindeutiges Signal gab, wurde CCR7 aus dem Zellysat exprimierender MDA-MB435S1-Zellen zuerst immunpräzipitiert und dann im Western Blot analysiert. Im Western Blot wurden dann für das immunpräzipitierte CCR7-Protein im SDS-Gellauf drei Gelbanden unterschiedlicher Größe detektiert.

Um den im Western Blot nach Verwendung des 3D12-Antikörpers auftretenden drei Gelbanden (Abb. 11) bestimmte Rezeptorzustände zuordnen zu können, wurde CCR7 auf potentielle Glykosylierungen untersucht. Eine posttranslative Modifizierung von GPCRs wie die N-Glykosylierung ist sowohl für die korrekte Prozessierung durch das endoplasmatische Retikulum notwendig als auch für die Orientierung des Rezeptors in der Plasmamembran (Murphy, 1994; Probst et al., 1992). Veränderungen des Glykosylierungsmusters sind oftmals mit verschiedenen pathologischen Prozessen verknüpft, so z.B. bei malignen Transformationen bei Mammakarzinomen (Asada et al., 1997). Unter Verwendung von Tunicamycin sollte das Glykosylierungsmuster von CCR7 untersucht werden. Tunicamycin unterbindet die Bildung von Glukosamin-Pyrophosphat-Dolichol, so daß dem Rezeptor N-glykosidische Äste fehlen. CCR7 besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungssequenzen (AS-Strukturmotiv: (Asn-X-Thr/Ser)- Sequenzen), die in der extrazellulären Domäne I (AS 37 NTTV-Motiv) und III (AS 293 NITS-Motiv) zu finden sind. Es zeigte sich, daß der ektopisch exprimierte Rezeptor CCR7 in MDA-MB435S1-Zellen, wie in HEK293-Zellen, in drei Zuständen vorkommt: in

den N-glykosylierten Formen (laufen bei ca. 36 und ca. 44 kDa im SDS-Gel) und der unglykosylierten Form (läuft bei ca. 34 kDa im SDS-Gel) (Abb. 11).

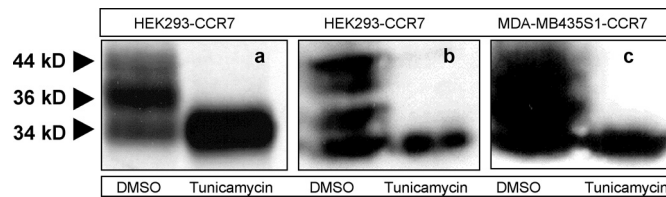


Abb. 11: N-Glykosylierung von ektopisch exprimierten CCR7 in HEK293- oder MDA-MB435S1-Zellen. Die molekulare Masse von CCR7 verringerte sich nach Behandlung mit Tunicamycin. Immunpräzipitation und Immundetektion von CCR7 aus Zellysat DMSO- oder Tunicamycin-behandelter Zellen. A) Immunpräzipitat von metabolisch markierten HEK293-Zellen und b) bzw. c) Nachweis von CCR7 nach Immunpräzipitation im Western Blot; a) Autoradiographie mit anti-CCR7 (3D12) immunpräzipitierten CCR7-Protein aus metabolisch S³⁵-markierten HEK293-Zellen, die transient mit CCR7-cDNA transfiziert wurden; Western Blot mit anti-CCR7 gegen das Immunpräzipitat aus dem Zellysat der stabil exprimierenden b) HEK293-Zellen oder c) MDA-MB435S1-Zellen (CCR7 Klon 1) nach Behandlung mit DMSO oder Tunicamycin. Experiment a) wurde einmal durchgeführt, Experiment (b) und (c) zweimal.

5.2.3 Internalisierung des Rezeptors CCR7

Entscheidend für das migratorische Verhalten von CCR7-exprimierenden Tumorzellen im Organismus ist die Oberflächenexpression der Rezeptoren. Da die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren sowohl über die Zelle selbst als auch durch die Umgebung verändert werden kann (Claing et al., 2002; Signoret et al., 1998), war es von Interesse zu klären, inwieweit exogene Agonisten von CCR7 die Oberflächenexpression von CCR7 auf Tumorzellen regulieren kann. Weiterhin war zu differenzieren, ob CCR7, abhängig von der Stimulation durch CCL19 oder CCL21, unterschiedliches Internalisierungsverhalten zeigt. Beide Agonisten von CCR7 haben eine ähnliche Affinität zum Rezeptor (Sullivan et al., 1999; Willmann et al., 1998), zeigten aber leichte Unterschiede in der Chemotaxis und Kalzium-Mobilisierung in verschiedenen Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Messungen zur Internalisierung von CCR7 wurden mit Zelllinien durchgeführt, die CCR7 entweder endogen exprimierten, wie CMLT1-Zellen (Abb. 13b), oder heterolog, wie der MDA-MB435S1-Zellklon CCR7 Klon 1 (Abb. 12 und 13a).

Die Internalisierung von CCR7 nach Stimulation mit den Agonisten wurde über die Abnahme der Zahl der an der Oberfläche verbliebenen Rezeptoren in verschiedenen Zeitintervallen bestimmt. Der relative Rezeptoranteil auf der Zelloberfläche wurde per FACS bestimmt. Über die Differenz zwischen der mittleren Fluoreszenz-Intensität, gemessen mit anti-CCR7 Antikörper (3D12) und mit anti-CXCR5 als Kontrollantikörper (8B2), wurde die verbliebene Zahl von Rezeptoren auf der Oberfläche, bezogen auf den Startzeitpunkt, berechnet. Die Ergebnisse sind in der Abb. 12 und 13 dargestellt. Sowohl der ektopisch wie der endogen exprimierte CCR7 wurde in Abhängigkeit vom Agonisten CCL19 oder CCL21 internalisiert. CCL19 induzierte eine kontinuierliche Internalisierung von CCR7, wohingegen CCL21 keine signifikante Internalisierung auslöste. Eine deutliche Abnahme der Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche war bereits 5 min nach Stimulation durch CCL19 zu erkennen (Abb. 12).

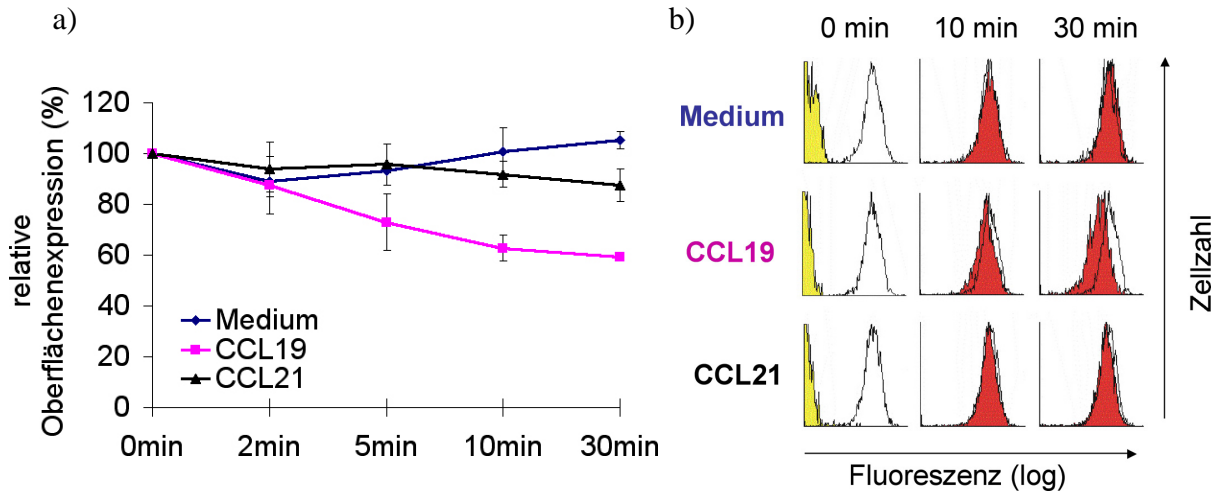


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Liganden-induzierten Internalisierung von stabil CCR7-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen (CCR7 Klon 1). a) Dargestellt ist die relative Änderung der relativen Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche bezogen auf den Zeitpunkt t=0, d.h. auf die Rezeptorzahl vor der Stimulation. Die CCR7-Oberflächenexpression errechnet sich aus der mittleren Fluoreszenz-Intensität der mit anti-CCR7 (3D12) und dem Kontrollantikörper (8B2) im FACS analysierten Proben zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 4 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Meßwerten errechnet. b) Exemplarische Kinetik der Internalisierung nach Inkubation mit Medium, 100 nM rekombinatem human CCL19 (CCL19) oder CCL21 (CCL21). Gelb dargestellte Flächen entsprechen der Färbung mit den Kontrollantikörper (anti-CXCR5), rot schattierten Kurven entsprechen der Färbung mit anti-CCR7 nach 10 bzw. 30 min und schwarz umrissene Kurven zeigen die Färbung mit anti-CCR7 zum Zeitpunkt t=0 min.

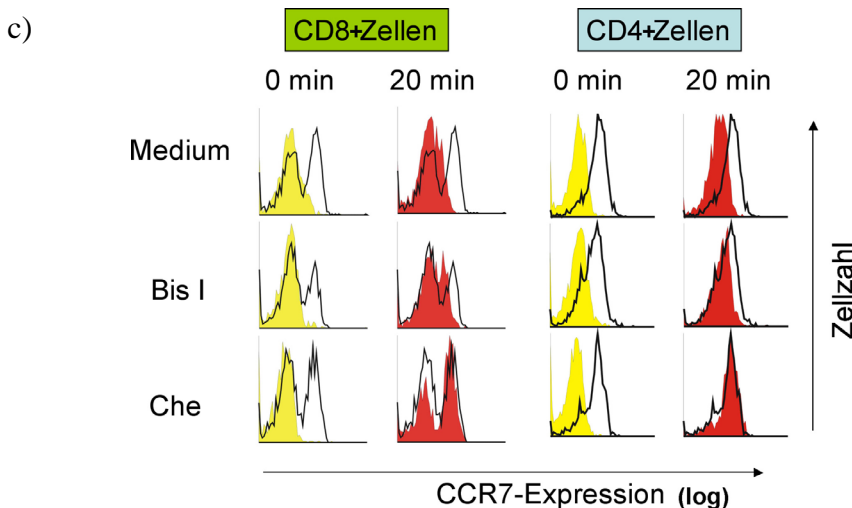
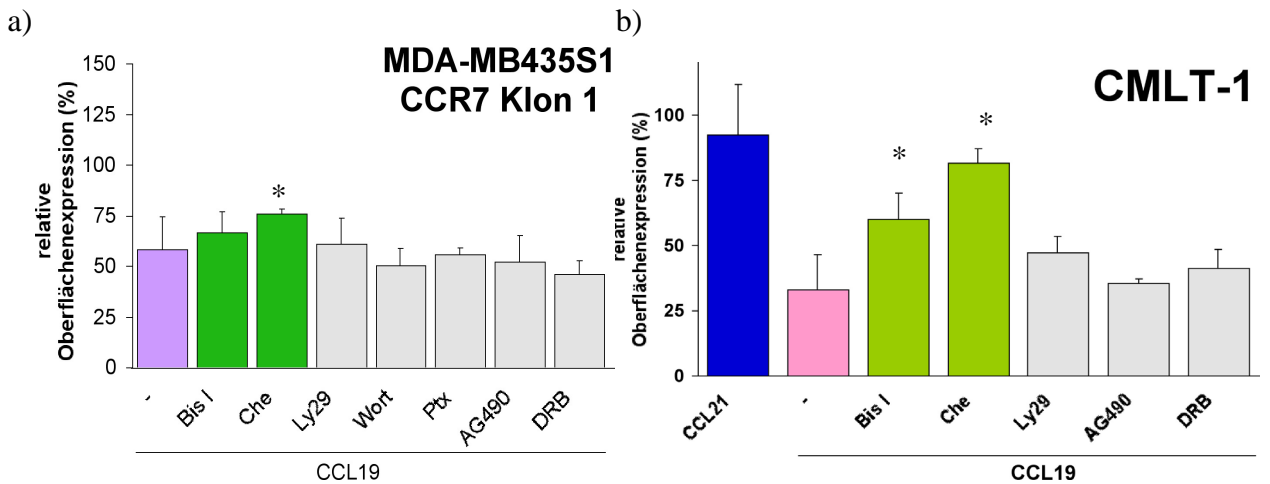


Abb. 13: Einfluß verschiedener Inhibitoren intrazellulärer Effektormoleküle auf die Liganden-induzierte Internalisierung des Rezeptors CCR7. Nach 20 min wird die Oberflächenexpression von CCR7 auf a) MDA-MB435S1-Zellen (CCR7 Klon 1), b) CMLT1-Zellen und c) CD4- und CD8-positiven Zellen aus peripheren Blut gemessen. In a) und b) ist die relative Oberflächenexpression des Rezeptors CCR7 dargestellt, errechnet aus dem Quotienten der mittleren Fluoreszenz-Intensität stimulierter (100 nM CCL19 oder CCL21) und unstimulierter Zellen zum Zeitpunkt $t=20$ min; dunkel markierte Balken: Inhibition mit Bis I: 4 μ M Bisindolylmaleimid; Che: 5 μ M Chelerythrin Chlorid, Wort: 200 nM Wortmannin, Ly29: 5 μ M Ly294002, Ptx: 100 ng/ml Pertussis-Toxin, DRB: 30 μ M 5,6-Dichloro-1 β -D-ribofuranosyl-benzimidazol; AG490: 25 μ M α -Cyano-(3,4-dihydrox)-N-benzylcinnamid. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten errechnet. In c) ist die Kinetik der CCL19-abhängigen Internalisierung von Blutlymphozyten dargestellt, die in 2 unabhängigen Experimenten bestimmt wurde. Gelb ausgefüllte Kurven entsprechen der Färbung mit der Isotypkontrolle, die rot schattierten Kurven entsprechen der Färbung mit anti-CCR7 20 min nach Stimulation, und schwarz umrissene Kurven zeigen die Färbung mit anti-CCR7 zum Zeitpunkt $t=0$ min. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten errechnet. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe von t-Tests für die Inhibition der CCL19-vermittelten Internalisierung von CCR7 bestimmt, wobei jeweils die Werte mit und ohne Inhibition für die Berechnung des p-Wertes verwendet wurden. Sofern sich p-Werte von $\leq 0,05$ ergaben, sind diese in a) und b) mit einem Stern markiert.

Mit frisch isolierten humanen CD4- und CD8-positiven peripheren T-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, daß CCR7 spezifisch durch CCL19 (Abb. 13c) und nicht durch CCL21 (Daten nicht gezeigt) internalisiert wurde.

Die Geschwindigkeit der Internalisierung nach Stimulation mit CCL19 ist bei 37 °C konstant, wohingegen die Stimulation der Zellen mit CCL19 oder CCL21 bei 4 °C keine Abnahme der Rezeptorzahl induzierte (Daten nicht gezeigt). Somit blockieren die Agonisten von CCR7, CCL19 und CCL21, nicht die Bindungsstellen für den verwendeten anti-CCR7 Antikörper 3D12.

Es wurde für verschiedene Chemokinrezeptoren bereits gezeigt, daß die Liganden-induzierte Internalisierung durch intrazelluläre Effektormoleküle reguliert werden kann (Förster et al., 1998). Damit war auch für CCR7 zu klären, inwieweit die Blockierung verschiedener intrazelluläre Effektormoleküle Einfluß auf die CCL19-induzierte Internalisierung von CCR7 nehmen. Die Beteiligung von verschiedenen Proteinkinasen am Vorgang der CCL19-abhängigen. Dazu wurden CCR7-exprimierende Zellen 1 h vor Stimulation mit rekombinanten CCR7-Liganden (100 nM) unter Zusatz der Inhibitoren bei 37 °C kultiviert.

Abb. 13 zeigt die Ergebnisse der CCL19-induzierten Internalisierung 20 min nach Stimulation. Auf MDA-MB435S1-Zellen (CCR7 Klon 1) bewirkte nur Chelerythrin Chlorid (Che) eine signifikante Reduktion der CCL19-abhängigen Internalisierung von 41 % auf 24 % (Abb. 13a). Die Inhibitoren (IH) verschiedener Effektormoleküle wie z.B. Wortmannin (IH für PI3-Kinasen), AG490 (IH für Tyrosinkinasen), DRB (IH für Kaseinkinasen CK2) oder Pertussis-Toxin (IH für G α i) hatten keinen signifikanten Einfluß auf die CCL19-abhängige Internalisierung (Abb. 13a).

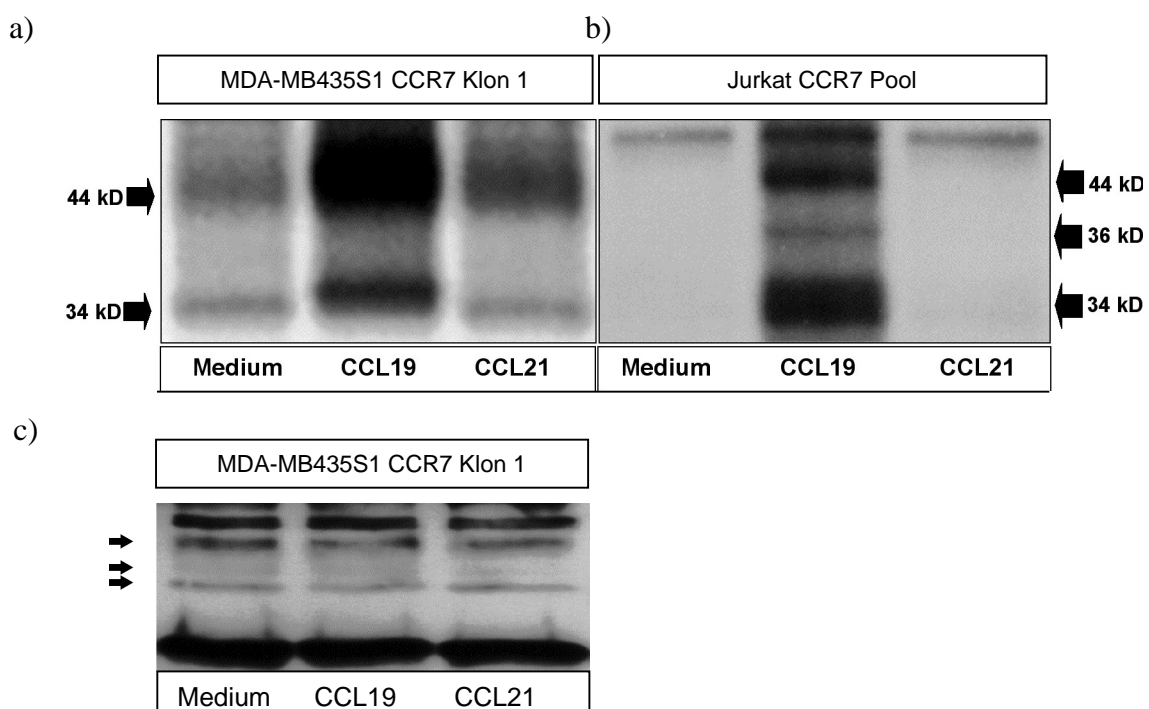
Entsprechende Beobachtungen waren auch bei der Verwendung von CMLT1-Zellen (Abb. 13b) und von frisch isolierten peripheren CD4- und CD8-positiven Blutlymphozyten (PBLs) (Abb. 13c) gemacht worden. Bei CMLT1-Zellen reduzierte sich die CCL19-abhängige Internalisierung von CCR7 nach Inkubation mit Chelerythrin Chlorid (Che) signifikant von

67 % auf 18 % (Abb. 13b), wohingegen auf CD4- oder CD8-positiven T-Zellen die CCL19-abhängige Internalisierung fast vollständig ausblieb (Abb. 13c).

Unter Verwendung eines weiteren PKC-Inhibitors, Bisindolylmaleimid I, konnte die Internalisierung von CCR7 auf MDA-MB435S1-Zellen nicht signifikant blockiert werden. Obwohl auf CMLT1-Zellen und CD4- und CD8-positiven Blutlymphozyten Bisindolylmaleimid I (Bis I) die CCL19-abhängige Internalisierung von CCR7 inhibieren konnte (Abb. 13b und c), war diese nicht so ausgeprägt wie bei der Chelerythrin Chlorid-Behandlung.

5.1.4 Phosphorylierung des Rezeptors CCR7

Eine Liganden-induzierte Internalisierung wurde bereits für verschiedene Chemokinrezeptoren beschrieben. Der Endozytose der Chemokinrezeptoren geht eine Phosphorylierung durch Proteinkinasen im Bereich der intrazellulären Domänen voraus. Die internalisierten Rezeptoren werden in Endosomen dephosphoryliert; danach werden sie entweder erneut an die Zelloberfläche transportiert oder intrazellulär abgebaut (Claing et al., 2002; König und Edwardson, 1997). CCR7 besitzt wie viele andere Chemokinrezeptoren in der C-terminalen Region eine Vielzahl potentieller Phosphorylierungssequenzen, die spezifisch von verschiedenen Isoformen der Proteinkinase C (AS 358-359) und der cAMP-abhängige Proteinkinase (AS 364-365) phosphoryliert werden können (Abb. 14c). Zudem befinden sich am C-Terminus noch weitere Serine (AS 348, 367 und 377) und Threonine (AS 372-375), die potentiell über GRKs phosphoryliert werden können (Abb. 14c). Da CCR7 spezifisch über CCL19 internalisiert wurde, sollte geklärt werden, inwieweit CCR7 ebenfalls Ligandenabhängig phosphoryliert wird. Zur Untersuchung der durch CCL19 und CCL21 induzierten Phosphorylierung wurden stabil CCR7-exprimierende MDA-MB435S1- und Jurkat-Zellen in Gegenwart von $^{32}\text{P}_4^{2-}$ inkubiert und dann für jeweils 5 Minuten mit 100 nM CCL19 oder CCL21 stimuliert.



d)

QLRQW₃₅₈**SSCRHRR**₃₆₄**SSMSVEAETTTTFSP**
 PKC cAMP-Kinase

Abb. 14: Phosphorylierung von ektopisch exprimierten CCR7 nach Stimulation mit CCL19 und CCL21. Autoradiogramm der Immunpräzipitation und anschließende Gelelektrophorese des Rezeptors CCR7 aus unterschiedlich stimulierten ektopisch CCR7-exprimierenden a) MDA-MB435S1-Zellen (CCR7 Klon 1) und b) Jurkat-Zellen (CCR7 Pool). Die ³²P-markierten Zellen wurden für 5 min mit 100 nM CCL19 oder CCL21 stimuliert. Abbildung c) zeigt exemplarisch, daß jeweils die gleiche Menge CCR7 Protein für die in a) dargestellte Immunpräzipitation verwendet worden war. Im Western Blot wurde dafür 1/3 des Immunpräzipitats verwendet und CCR7 mit Hilfe des Antikörpers 3D12 nachgewiesen. In d) ist die Proteinsequenz des C-Terminus des humanen Rezeptors CCR7 mit potentiellen Erkennungsstellen für verschiedene Kinasen dargestellt. Fett markierte Serine und Threonine am C-Terminus sind über weitere Serin/Threonin-Kinasen für potentielle Phosphorylierung zugänglich.

Im Vergleich zur Basalphosphorylierung von ektopischem CCR7 in unstimulierten MDA-MB435-Zellen (CCR7 Klon 1), war nach Stimulation durch CCL19 die Intensität der Phosphorylierung des unglykosylierten (34 kDa) und glykosylierten CCR7-Proteins (44 kDa) um den Faktor 1,6 verstärkt. CCL21 induzierte im Vergleich nur eine sehr schwache Phosphorylierung der glykosylierten Form um den Faktor 1,3, jedoch keine Phosphorylierung der unglykosylierten Form nach 5 min (Abb. 14a). Die 36 kDa-glykosylierte CCR7-Form wurde in MDA-MB435S1-Zellen nicht phosphoryliert, obwohl diese im Western Blot detektiert werden konnte (Abb. 14c). Die Abb. 14c zeigt exemplarisch, daß jeweils die gleiche Menge des CCR7 Proteins für die in Abb. 14a dargestellte Immunpräzipitation verwendet worden war.

Der stabil ektopisch CCR7-exprimierende Pool von Jurkat-Zellen zeigte keine Basalphosphorylierung des Rezeptors, während nach Stimulation durch CCL19 CCR7 phosphoryliert wurde, und zwar sowohl beide glykosylierten (36 und 44 kDa) als auch die unglykosylierten (34 kDa) Formen von CCR7. Wie in MDA-MB435S1-Zellen, CCR7 Klon 1, wurde die unglykosylierte CCR7-Form in Jurkat-Zellen, CCR7 Pool, auch bei CCL21-Zugabe nur sehr schwach phosphoryliert (Abb. 14b). Beide Experimente wurden nur einmalig ausgeführt und gaben erste Hinweise auf eine mögliche CCL19-induzierte Phosphorylierung von ektopisch exprimiertem CCR7 im Überexpressionssystem.

5.3 Klonierung von CCR7 und CCL19- oder CCL21-koexprimierenden Zellen

Nachdem die stabile ektoische Expression von CCR7 auch durch funktionelle Assays bestätigt wurde, konnten diese Zellen weiter mit Expressionsplasmide kotransfiziert werden, die die cDNA für CCL19 oder CCL21 kodieren. Für weitere Kotransfektionen mit CCL19- oder CCL21-kodierenden Vektoren wurde der stabil CCR7-exprimierende Klon 1 (MDA-MB435S1) verwendet. Die stabile Expression von CCL19 und CCL21 wurde im Northern Blot (Daten nicht gezeigt), in FACS-Analysen (Abb. 15d), im Western Blot (Abb. 15b-c) und mittels RT-PCR (Abb. 15a) überprüft.

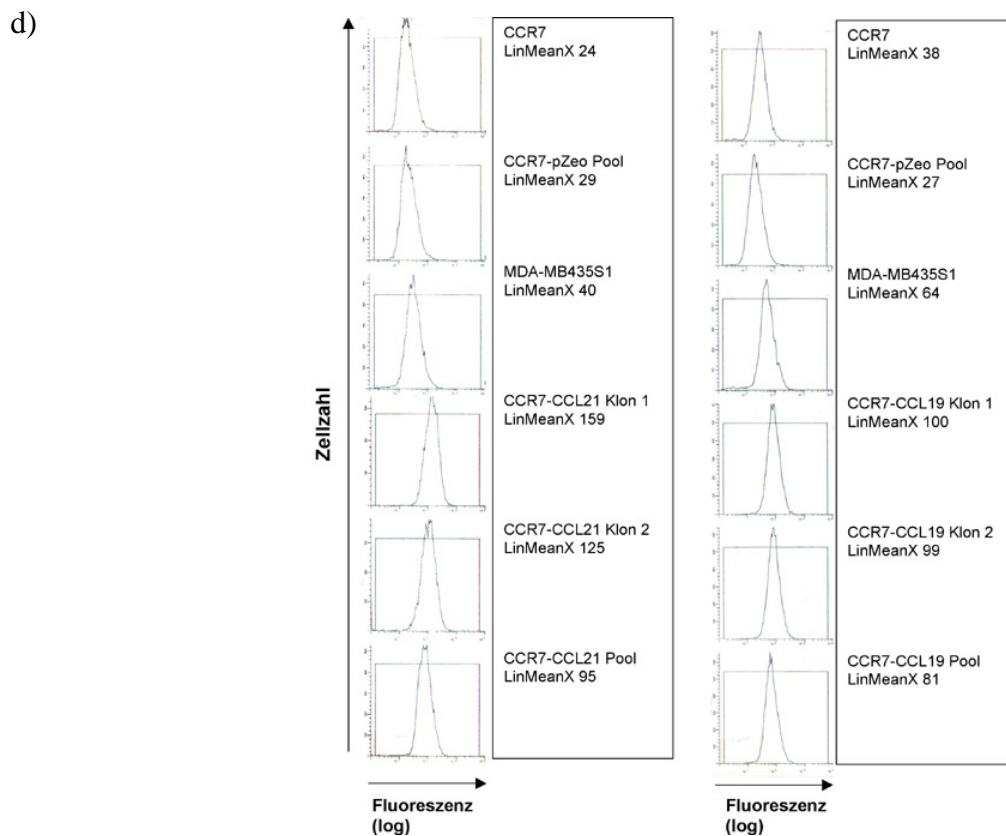
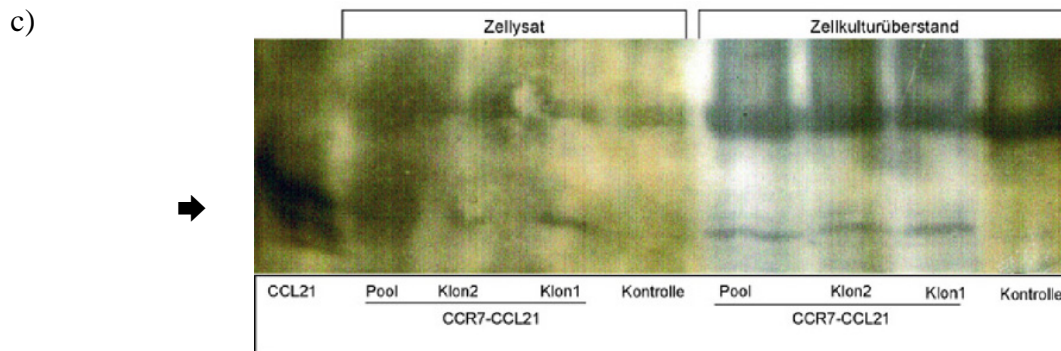
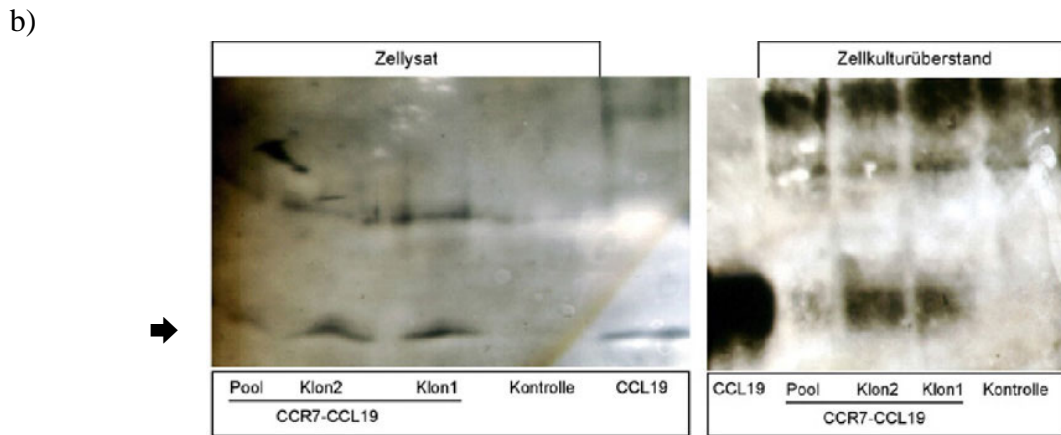
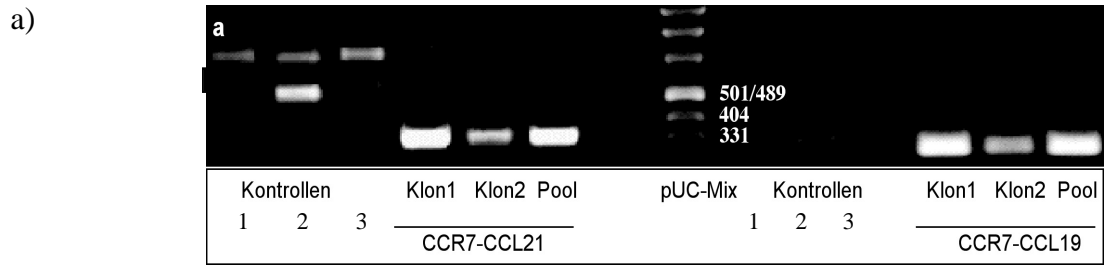
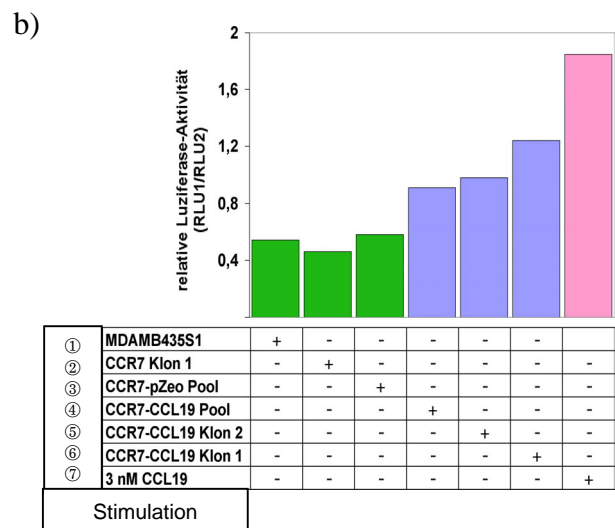
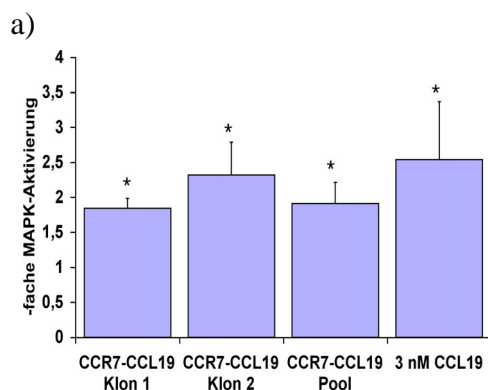


Abb. 15: Expression von humanem CCL19 und CCL21 in stabil Chemokin- und CCR7-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen. a) Amplifizierung der cDNA von CCL19 (262 bp) und CCL21 (354 bp) mit spezifischen Primern in einer RT-PCR. Die Kontroll-Spuren 1-3 repräsentieren: Parentalzellen (1), CCR7 Klon 1 (2) und CCR7-pZeo Pool (3); mittig im Gel wurde der pUC-Mix Marker aufgetragen; die 501/489 bp, 404 bp und 331 bp Basenpaarbanden sind entsprechend markiert. Unspezifische Banden in den Kontrollspuren (1-3) der Abb. 15a traten nur einmalig auf und entstanden möglicherweise über Verunreinigung mit genomischer DNA. b) Western Blot mit Antikörper gegen humanes CCL19 und c) humanes CCL21 aus dem Immunpräzipitat von Zellysate oder Zellkulturüberständen der stabil CCL19- und CCL21-exprimierenden Zellklone. Kontrollspur entspricht dem Überstand der Mock-Kontrolle CCR7-pZeo Pool. Kontrollspur für die Überstände der Parentalzellen und Zellpopulation CCR7 Klon 1 zeigen gleiches Ergebnis wie der Überstand der Zellpopulation CCR7-pZeo Pool. d) Expression von ektopisch exprimierten CCL19 oder CCL21 auf den humanen MDA-MB435S1-Zellen. Durchflußzytometrische Analyse der untransfizierten MDA-MB435S1-Zellen: Graph entspricht der Färbungen mit spezifischen Antikörpern für humanes CCL19 oder CCL21. Die Zellen wurden vor der Färbung mit BrefeldinA (für 2 h) blockiert, dann mit 5% Paraformaldehyd fixiert und mit 0,0025% Digitonin permeabilisiert (siehe Kapitel 4.4.4). Fluoreszenz-Intensität wurde als Wert aus LinMeanX dargestellt. Die Ergebnisse aus (b), (c) und (d) wurden in je zwei unabhängigen Experimenten bestätigt. Pfeile in (b) und (c) markieren spezifische Signale für CCL19 oder CCL21. Als Positivkontrolle ist rekombinantes CCL19 oder CCL21 aufgetragen.

In der RT-PCR konnte die spezifische mRNA für humanes CCL19 bzw. CCL21 nur in den ektopisch Chemokin-(sowie CCR7) exprimierenden Zellklonen, nicht aber in der Parentalzelllinie bzw. den einfach CCR7-exprimierenden Klonen nachgewiesen werden. Alternativ zur Kotransfektion von MDA-MB435S1-Zellen mit zwei separaten Expressionsplasmiden für CCR7 (pcDNA3-CCR7) und CCL19 (pZeo-CCL19) bzw. CCL21 (pZeo-CCL21) wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, in denen nur ein Vektor zur Transfektion mit Rezeptor und Ligand eingesetzt wurde. Die Expression der Konstrukte erfolgte entweder über den bidirektionalen Histonpromotor H2A-H2B oder die cDNAs wurden unter Verwendung von IRES (interne ribosomale Eintrittsequenz)-Sequenzen getrennt. Stabil exprimierende Klone zeigten keine dauerhafte konstante Rezeptor-Expression in Zellkultur, so daß diese Versuchsansätze nicht weiter verfolgt wurden.

Der Überstand einer dicht gewachsenen 20 cm Zellkulturschale (DMEM-Medium mit 5 % FKS) wurde nach 48 Stunden Inkubation gesammelt und in den verschiedenen Assays analysiert. Intrazelluläres (Abb. 15b, c und d) und sezerniertes CCL19 oder CCL21 (im Zellkulturüberstand befindliches Protein) wurde mittels Immunpräzipitation und Western Blot oder FACS-Analyse detektiert (Abb. 15b und c).



①	MDAMB435S1	+	-	-	-	-	-
②	CCR7 Klon 1	-	+	-	-	-	-
③	CCR7-pZeo Pool	-	-	+	-	-	-
④	CCR7-CCL19 Pool	-	-	-	+	-	-
⑤	CCR7-CCL19 Klon 2	-	-	-	-	+	-
⑥	CCR7-CCL19 Klon 1	-	-	-	-	-	+
⑦	3 nM CCL19	-	-	-	-	-	+
Stimulation							

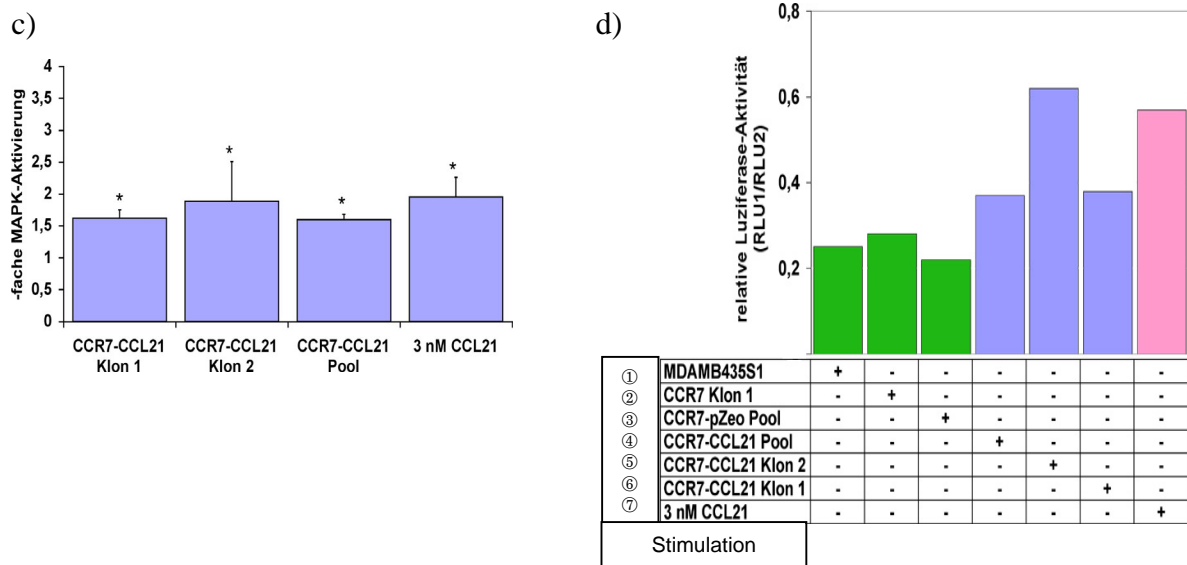


Abb. 16: Bestimmung der biologischen Aktivität des von MDA-MB435S1-Zellen sezernierten CCL19 (a,b) und CCL21 (c,d) in MAPK-Assays. Es wurden die mit Reporterplasmiden (siehe Kapitel 4.11) und CCR7 transient transfizierten CHO-K1-Zellen mit den Überständen der CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21-Zellpopulationen oder zum Vergleich mit humanem rekombinanten CCL19 bzw. CCL21 (3 nM) inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellkulturüberstände von den MDA-MB435S1- (①), CCR7 Klon 1-(②) und CCR7-pZeo (③)- Zellen verwendet, die nicht ektopisch CCL19 oder CCL21 exprimieren. Nach 6stündiger Stimulation erfolgte die Messung der Luciferase-Aktivitäten. Die relative Luciferase-Aktivität von RLU1 und RLU2 ist ein Maß für die Phosphorylierung von Elk-1 und damit für die MAP-Kinase Aktivierung. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Meßwerten errechnet. Die Ergebnisse in a) und b) sind auf die Messwerte der Zellen normalisiert (=1), die mit den Referenzproben (①,② und ③) inkubiert wurden. Die Signifikanz der Ergebnisse für die MAPK-Aktivierung mit Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe von t-Tests bestimmt, wobei die Stimulation mit Referenzüberständen und Überständen der CCR7-CCL19- bzw. CCR7-CCL21-Zellpopulationen für die Berechnung des p-Wertes verwendet wurden. Sofern sich p-Werte von $\leq 0,05$ ergaben, sind diese in a) und b) mit einem Stern markiert. b, d) Exemplarische Darstellung des Quotienten der Luciferase-Aktivität der *firefly*-Luciferase (RLU1-Wert) und der kotransfizierten *renilla*-Luciferase (RLU2-Wert), die als interner Standard für die Effizienz der Transfektion verwendet wurde. Die Experimente in b) und d) wurden unabhängig voneinander an verschiedenen Tagen durchgeführt.

Zellkulturüberstände der verschiedenen stabil CCL19- und CCL21-exprimierenden Zellen wurden unverdünnt im MAP-Kinase-Assay auf biologische Aktivität der sezernierten Proteine getestet (Abb. 16). Dazu wurden CHO-K1-Zellen mit Reporterplasmiden und alternativ mit CCR7 oder CXCR5 kotransfiziert (Methode in Kapitel 4.11 beschrieben).

Es wurde bereits in Abb. 7 gezeigt, daß über transient exprimiertes CCR7 in CHO-K1-Zellen eine Aktivierung von Elk-1 nach Stimulation mit rekombinanten CCL19 oder CCL21 induziert werden kann. Sowohl CCR7- (Abb. 16) oder CXCR5- (Daten nicht gezeigt) transfizierten CHO-K1-Zellen wurden für 6 Stunden mit den Überständen der verschiedenen Zellpopulationen inkubiert, und dann wurde die Aktivierung von Elk-1 mittels der Luciferase-Aktivität ermittelt. Als Referenzwerte wurden die Messungen mit Zellkulturüberständen von den MDA-MB435S1-Zellen und CCR7-Zellpopulationen verwendet.

Die unverdünnten Überstände der einzelnen CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21-Populationen verstärkten nicht die Aktivität von Elk-1 auf CXCR5-kotransfizierten CHO-K1-Zellen (Daten nicht gezeigt). Wohingegen die unverdünnten Überstände der CCR7-CCL19- oder CCR7-

CCL21-Zellpopulationen eine schwache CCR7-abhängige Aktivierung von Elk-1 im MAPK-Assay induzierten. Die Menge an sezerniertem Protein von CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21-Zellen lag dabei in der Nähe der Nachweisgrenze des Assays, die ungefähr 3 nM CCL19 oder CCL21 entsprach. Im direkten ELISA und im Zell-ELISA konnten CCL19 und CCL21 in den Zellkulturüberständen nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ein Sandwich-ELISA konnte zu diesen Zeitpunkt nicht durchgeführt werden, da für CCL19 und CCL21 keine zwei Antikörper, die gegen unterschiedliche Epitope des jeweiligen Chemokins gerichtet sind, verfügbar waren. In Zusammenarbeit mit Dr. Kremmer wurde für die Herstellung von weiteren CCL19- und CXCL13-Antikörpern his-markierte Fusionsproteine hergestellt, jedoch konnten keine Hybridome gewonnen werden, die funktionelle Antikörper produzierten (Daten nicht gezeigt).

Die Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der aus den verschiedenen Transfektionen entstandenen Zellklone und Poole, die weiter im Metastasierungsmodell verwendet wurden.

Tabelle 3: Klonliste der generierten Zellpopulationen aus MDA-MB435S1-Zellen; Pool besteht aus gleichen Teilen verschiedener Zellklone, die auf Expression von CCR7 und Koexpression von CCL19 oder CCL21 getestet wurden.

Zelllinie	Transfektion	Name der Zellen	Name der Zellpopulation
MDA-MB435S1	-	MDA-MB435S1	MDA-MB435S1
MDA-MB435S1	pcDNA3-CCR7	CCR7 Klon 1	CCR7
	pcDNA3-CCR7; pZeoSV2+	CCR7-pZeo Pool	
MDA-MB435S1	pcDNA3-CCR7; pZeo-CCL19	CCR7-CCL19 Klon 1	CCR7-CCL19
	pcDNA3-CCR7; pZeo-CCL19	CCR7-CCL19 Klon 2	
	pcDNA3-CCR7; pZeo-CCL19	CCR7-CCL19 Pool	
MDA-MB435S1	pcDNA3-CCR7; pZeo-CCL21	CCR7-CCL21 Klon 1	CCR7-CCL21
	pcDNA3-CCR7; pZeo-CCL21	CCR7-CCL21 Klon 2	
	pcDNA3-CCR7; pZeo-CCL21	CCR7-CCL21 Pool	

5.4 Biologische Aktivität von CCR7- und CCL19- oder CCL21-koexprimierenden Zellen im Vergleich

5.4.1 Kalzium-Mobilisierung durch CCL19 oder CCL21

Bei Sullivan *et al.* (1999) wurde bereits gezeigt, daß kurz nach erneuter Stimulation von CCR7 mit exogenem rekombinantem CCL19 und CCL21 die Kalzium-Mobilisierung unterbunden wird. Zu untersuchen war, ob die Koexpression von Ligand und Rezeptor ebenfalls eine Rezeptor-Desensitivierung verursacht (Yoshida *et al.*, 1998a; Yoshida *et al.*,

1998b). Dazu wurden die Kotransfektanden mit rekombinantem CCL19 stimuliert und der Kalzium-Influx nach exogener Stimulation gemessen. Dieser Anstieg ist die Folge der Stimulation von Phospholipase C-Isoformen und der Bindung von Phosphatidylinositol-1,4,5-Triphosphat (IP₃) an IP₃-Rezeptoren in den Membranen der Ca²⁺-Speicherorganellen, die den Einstrom von Ca²⁺ in das Zytosol auslösen.

Die verschiedenen Zellklone wurden hinsichtlich ihrer CCL19-induzierten Kalzium-Mobilisierung getestet und verglichen. In Abb. 17 ist ein repräsentativer Kalzium-Influx für die entsprechende Zellpopulation gezeigt. Die Kalziummessung wurde für die verschiedenen Zellpopulationen mindestens zweimal durchgeführt, wobei in allen Durchführungen bei allen CCR7-exprimierenden Zellpopulationen nach Zugabe von CCL19 ein Kalziuminflux zu beobachten war. Nach Stimulation mit CCL19 zeigten alle CCR7-exprimierenden Zellpopulationen einen vergleichbaren transienten Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Das Kalziumsignal wurde nicht durch endogene CCL19- oder CCL21-Koexpression der CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21-Zellpopulation inhibiert.

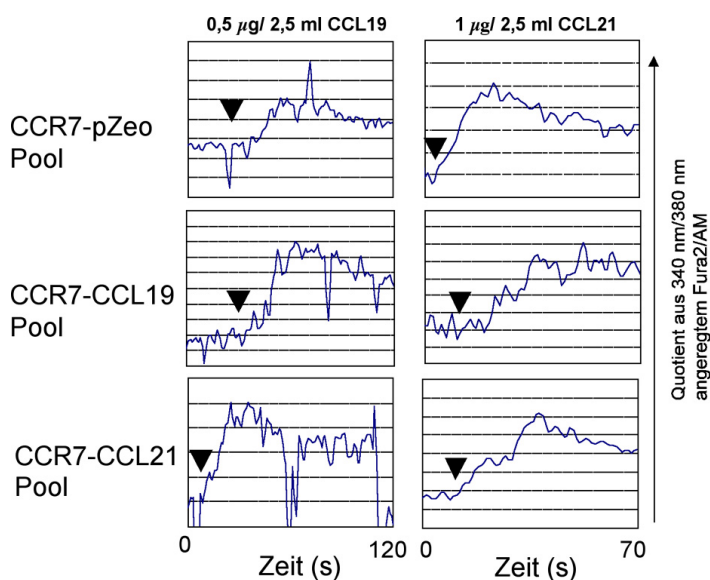


Abb. 17: Transienter Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration nach Stimulation von ektopisch exprimiertem CCR7 auf MDA-MB435S1-Zellen mit 0,5 µg/2,5 ml huCCL19 und 1 µg/2,5 ml huCCL21. Verschiedene Fura2/AM-beladene Zellpopulationen, die CCR7 (CCR7-pZeo Pool) alleine oder in Kombination mit humanem CCL19 (CCR7-CCL19 Pool) oder CCL21 (CCR7-CCL21 Pool) exprimieren, wurden hinsichtlich der Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration im Zeitverlauf verglichen. Repräsentativ für die verschiedenen Zellpopulationen wird hier nur das Ergebnis nach Stimulation von CCR7-pZeo Pool, CCR7-CCL19 Pool und CCR7-CCL21 Pool gezeigt. ▼: Zugabe von rekombinantem Chemokin.

5.4.2 Internalisierung von CCR7 bei den CCL19- und CCL21-koexprimierenden Zellen nach exogener CCL19-Stimulation

Da bereits die CCL19-abhängige Internalisierung von CCR7 auf stabil exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen untersucht wurde, war im vorliegenden Fall zu klären, ob endogen exprimiertes CCL19 oder CCL21 einen desensitivierenden Effekt auf die CCL19-induzierte Internalisierung hat.

In diesen Experimenten konnte keine Desensitivierung der CCL19-induzierten Internalisierung bei den untersuchten Zellklonen, unabhängig von der endogenen Expression des CCL19 (der CCR7-CCL19-Zellpopulation) oder CCL21 (der CCR7-CCL21-Zellpopulation) (Abb. 18) festgestellt werden.

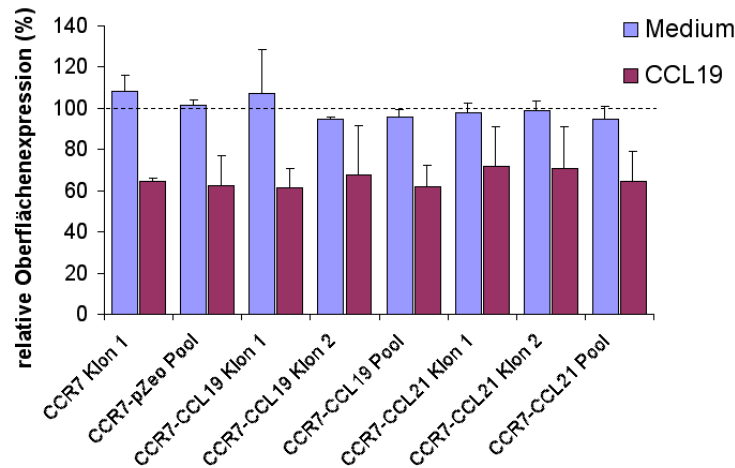


Abb. 18: CCL19-abhängige Internalisierung des Rezeptors CCR7 auf Einfach- und Doppeltransfektanden nach exogener Stimulation mit humanem CCL19. Vergleich der CCL19-induzierten Internalisierung von CCR7 verschiedener Zellpopulationen nach 30 min. Dargestellt ist der Anteil an verbliebenen Rezeptoren auf der Oberfläche nach Stimulation mit 100 nM CCL19 im Vergleich zum Zeitpunkt t=0 min. Der relative Oberflächenanteil entspricht dem Quotienten aus der mittlerer Fluoreszenz-Intensität der mit anti-CCR7 bzw. Kontrollantikörper 8B2 gefärbten, unstimulierten und stimulierten Zellen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

5.4.3 Gerichtete Migration von CCR7-exprimierenden adhärennten Zellen

Obwohl die homöostatischer Chemokine, wie CCL19 und CCL21, im wesentlichen die Migration von Leukozyten steuern, wird vermutet, daß die Liganden ebenfalls die Migration von CCR7-exprimierende Tumorzellen steuern können (Förster et al., 1999; Till et al., 2002). Um zu klären, ob die Migration von CCR7-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen *in vitro* über exogene CCR7-Liganden reguliert werden kann, wird in der Boyden-Kammer die CCL19- bzw. CCL21-induzierte Migration gemessen (Abb. 19). Somit konnte zum einen die biologische Funktionalität des ektopisch exprimierten CCR7 auf den Brustkrebszellen und zum anderen der Einfluß der Koexpression von CCR7 und eines seiner Liganden auf die CCR7-vermittelte Migration von Tumorzellen untersucht werden. Im nächsten Abschnitt soll geklärt werden, ob ein PKC-abhängiger Signalweg am migratorischen Prozeß beteiligt ist (siehe Kapitel 5.1.1.1).

Für den Migrations-Assay (Kapitel 4.10) wurden MDA-MB435S1-Zellpopulationen verwendet, die CCR7 oder CCR7 in Kombination mit CCL19 oder CCL21 exprimieren. Die gerichtete Migration wurde in einer modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt, wobei die Tumorzellen durch eine Polykarbonatmembran mit 10 µm Porendurchmesser von der Kammer mit exogenem Chemokin (humanes 100 nM CCL21 oder CCL19) getrennt waren. Diese Tumorzellen transmigrieren aufgrund eines haptotaktischen oder kurzzeitig chemotaktischen Gradienten in den Kammern. Der Migrationsindex errechnet sich aus dem Quotienten der Zahl migrierter Zellen in Anwesenheit von Chemokinen und der Zahl spontan migrierter Zellen in Abwesenheit von Chemokinen. Die Zahl der migrierten Zellen wurde indirekt densitometrisch bestimmt (siehe Kapitel 4.10). Untransfizierte und Mock-transfizierte MDA-MB435S1-Zellen zeigten keine chemo- oder haptotaktische Aktivität in Richtung

exogenem CCL19 oder CCL21. Nur ektoptisch CCR7-exprimierende MDA-MB435S1-Zellen migrierten gerichtet auf CCL19 oder CCL21. Zellen, die mit dem Leervektor pZeoSV40 kotransfiziert wurden, zeigten die gleiche migratorische Aktivität wie einfach-CCR7 transfizierte Zellen. Die migratorische Antwort der koexprimierenden CCR7-CCL19 Klone und deren Pool auf rekombinantes humanes CCL19 oder CCL21 (je 100 nM) zeigte eine signifikante Verdoppelung des Migrationsindexes gegenüber Zellen, in denen ektoptisch nur CCR7 exprimieren (CCR7 Klon 1 und CCR7-pZeo Pool), wohingegen beide CCR7-CCL21 Klone und deren Pool keine erhöhte migratorische Antwort auf rekombinantes humanes CCL19 oder CCL21 gegenüber Zellen zeigten, die nur CCR7 überexprimierten (Abb. 19).

a)

	CCL19	Stabw	CCL21	Stabw
MDA-MB435S1	1,3	0,2	1,4	0,2
CXCR5 Klon1	1	0,2	1,2	0,1
CCR7 Klon 1	3,6	0,7	3,4	0,8
CCR7-pZeo Pool	3	0,3	3,3	0,7
CCR7-CCL19 Klon 1	7,9	3,4	6,1	1,2
CCR7-CCL19 Klon 2	8,6	4	6,6	2,1
CCR7-CCL19 Pool	8,2	3,6	8,4	3,5
CCR7-CCL21 Klon 1	4,1	1,4	4,4	1,3
CCR7-CCL21 Klon 2	2,7	0,5	3,1	0,4
CCR7-CCL21 Pool	9,3	5,2	6	2,3

b)

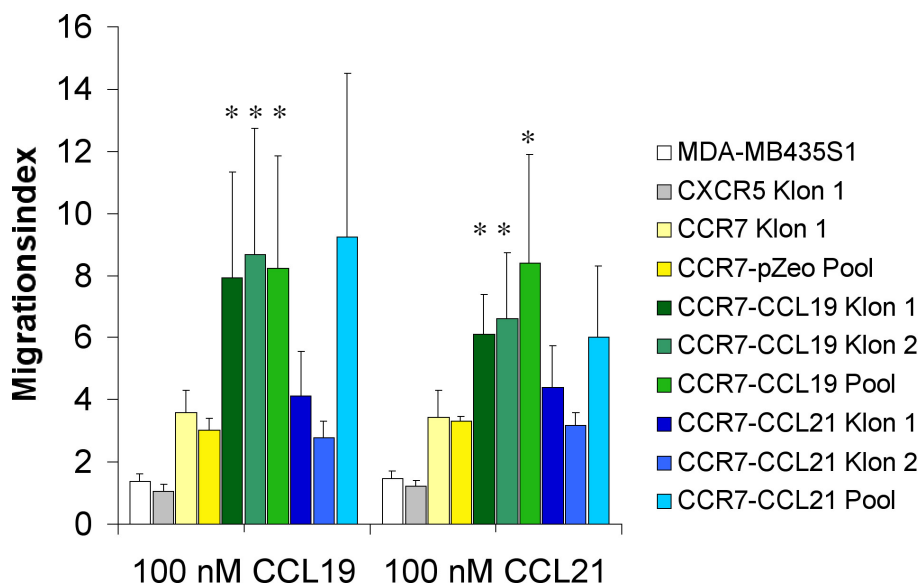


Abb. 19: CCR7-vermittelte Migration von MDA-MB435S1-Zellen, in denen CCR7 allein oder in Kombination mit CCL19 und CCL21 exprimiert wird. Die unterschiedlichen Zellpopulationen ($2,5 \times 10^4$ Zellen pro Kammer) wurden für 16 Stunden in der Boyden-Kammer mit rekombinantem CCL19 oder CCL21 inkubiert. Die migratorische Antwort auf CCL19 oder CCL21 (je 100 nM) ist in Form des Migrationsindex (siehe Kapitel 4.10) gezeigt. In a) sind die Ergebnisse der Migration mit Standardabweichung in einer tabellarische Übersicht aufgelistet. In b) sind die Ergebnisse der Migration auf die Meßwerte für unstimulierte (=1) Zellen normalisiert. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Meßwerten errechnet. Die Signifikanz der Ergebnisse für die durch rekombinantem CCL19- bzw. CCL21-induzierte Migration wurde mit Hilfe von t-Tests bestimmt, wobei jeweils die Werte von einfach-CCR7 exprimierenden Zellen (CCR7 Klon 1; CCR7-pZeo Pool) mit koexprimierenden CCR7-CCL19- bzw. CCR7-CCL21-Zellpopulationen für die Berechnung des p-Wertes verwendet wurden. Sofern sich p-Werte von $\leq 0,05$ ergaben, sind diese mit einem Stern markiert.

5.1.1.1 Untersuchung des Einflusses von Bisindolylmaleimid I und Chelerythrin Chlorid auf die CCR7-induzierte Migration

Nach Aktivierung von Chemokinrezeptoren zeigen die Zellen einschneidende Veränderungen hinsichtlich der Reorganisation des Zytoskeletts sowie der Aktivierung und Lokalisation von verschiedenen Adhäsionsmolekülen. Um den Einfluß der PKC auf die gerichtete Migration zu testen, wurden die PKC-Inhibitoren Bisindolylmaleimid I und Chelerythrin Chlorid im Migrations-Assay eingesetzt. Der CCR7 Klon 1 (MDA-MB435S1-Zellen) wurde eine Stunde mit 4 µM Bisindolylmaleimid I oder 10 µM Chelerythrin Chlorid oder DMSO bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in der Boyden-Kammer mit 100 nM CCL19 oder CCL21 für 8 Stunden stimuliert und die Werte für die Migration von unbehandelten und den mit den PKC-Inhibitoren, Bisindolylmaleimid I (Bis I) und Chelerythrin Chlorid (Che) behandelten Zellen parallel ermittelt (Abb. 20).

In den Kontrollproben wurde die gleiche Menge DMSO eingesetzt wie in den mit Bis I oder Che inkubierten Proben. Bisindolylmaleimid I zeigt keinen Einfluß auf die CCL19- und CCL21-induzierte Migration der Zellen, wohingegen Chelerythrin Chlorid wahrscheinlich die Adhäsionsstabilität auf der Polykarbonatmembran störte (Sadhu et al., 1998), wodurch keine Migration auf CCL19 und CCL21 zu beobachten war. Im Falle von Chelerythrin Chlorid adhärten nur wenige Zellen auf der mit Kollagen IV beschichteten Polykarbonatmembran, unabhängig von der Stimulation des Rezeptors CCR7 über einen Chemokin-Gradienten. Da Integrine an der Chemotaxis bzw. Migration wesentlich beteiligt sind, könnten wiederum unterschiedliche PKC-Formen die Aktivität der Kollagen-spezifischen Integrine und damit die migratorische Antwort der Zellen beeinflussen (Mogi et al., 1995; Sadhu et al., 1998). Für Bis I konnte gezeigt werden, daß die durch Bis I inhibierten PKC-Formen nicht an der CCR7-vermittelten Migration involviert sind.

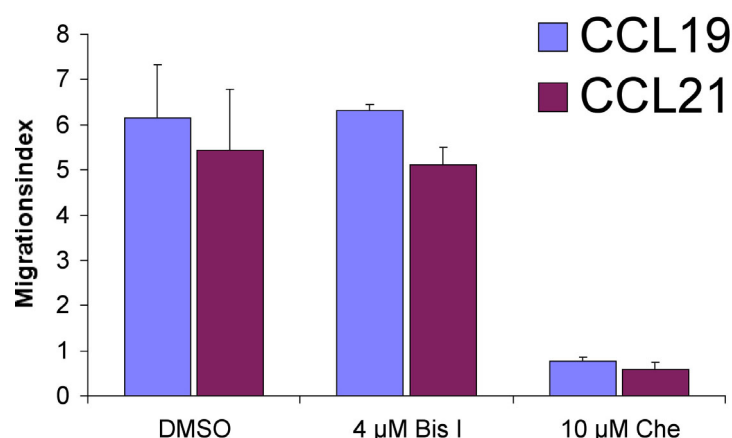


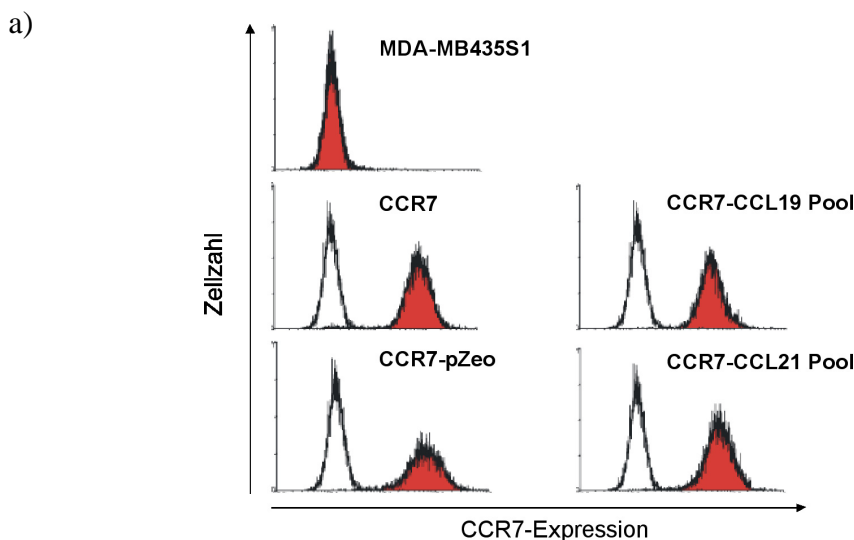
Abb. 20: Einfluß von zwei verschiedenen PKC-Inhibitoren auf das Liganden-induzierte Migrationsverhalten von CCR7-exprimierenden Zellen, CCR7 Klon 1. Nachdem die Zellen für 1 Stunde mit den Inhibitoren oder DMSO präinkubiert worden waren, wurde die migratorische Antwort auf CCL19 und CCL21 (je 100 nM) in der Boyden-Kammer für 8 Stunden gemessen. Während des ganzen Versuchs wurden die Zellen mit den Inhibitoren oder DMSO inkubiert. Die Ergebnisse sind auf die Meßwerte unstimulierter Zellen normalisiert (=1), die ebenfalls im gleichen Puffer gehalten wurden. Standardabweichung bezieht sich auf Triplikatwerte, wobei das Experiment einmal durchgeführt wurde.

5.1.4 Charakterisierung der heterologen Koexpression von CCR7 und CCL19 oder CCL21 auf MDA-MB435S1-Zellen

Wie in Abb. 12 dargestellt, wird CCR7 nach exogener Stimulation durch CCL19 internalisiert. Daher wurde untersucht, inwieweit die Koexpression von CCL19 oder CCL21 die Expression von CCR7 auf der Zelloberfläche verändert. Nach stabiler Transfektion der Tumorzellen zeigte sich, daß die Expressionsstärke von CCR7 unabhängig von der Kotransfektion für alle Zellpopulationen gleich blieb (Abb. 21a).

An der transendothelialen Migration (TEM) von Zellen über HEVs sind maßgeblich Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Integrine, und verschiedene GPCRs, unter anderem CCR7, beteiligt. Die Aktivierung der Integrine von Lymphozyten im Prozeß der TEM ist wichtig, damit die Zellen an den Endothelzellen arretieren können. Charakteristische Eigenschaft der Integrine ist ihre Fähigkeit, ihre Affinität als Reaktion auf eine Stimulation der Zellen mit Liganden für GPCRs zu modulieren (Butcher und Picker, 1996). Verstärkt gibt es auch Hinweise für eine Interaktion von Chemokinrezeptoren und Integrinen (Stein et al., 2002). Beispielsweise wurde eine erhöhte Expression von alpha4-Integrin und CCR7 in Patienten mit Lymphadenopathie gefunden (Till et al., 2002). In diesen Zusammenhang sollte geklärt werden, ob die Kotransfektion von CCR7 und einen seiner Liganden die Expression von Integrinen verändert hat, so daß möglicherweise über diesen Mechanismus die migratorische Aktivität der CCR7-CCL19 Zellpopulationen (Abb. 19) moduliert wurde. Da die gerichtete Migration von Zellen über die Kollagen-beschichtete Polykarbonatmembran vermutlich auch von der Expression oder Aktivierung der α -Integrin-Untereinheiten, α 1-6 und α v, abhängig ist, wurde die Expression dieser Integrin-Untereinheiten auf den Zellpopulationen mittels Antikörpern per FACS gemessen.

In der FACS-Analyse konnte gezeigt werden, daß die verschieden stabil CCR7-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CCR7 keinen Unterschied zeigten, unabhängig davon, ob sie CCL19 oder CCL21 koexprimieren. Es konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen den Einzelklonen und den Pools festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In bezug auf die Expression von Integrin-Untereinheiten gab es keinen Unterschied zwischen den untersuchten Zellpopulationen (Abb. 21b).



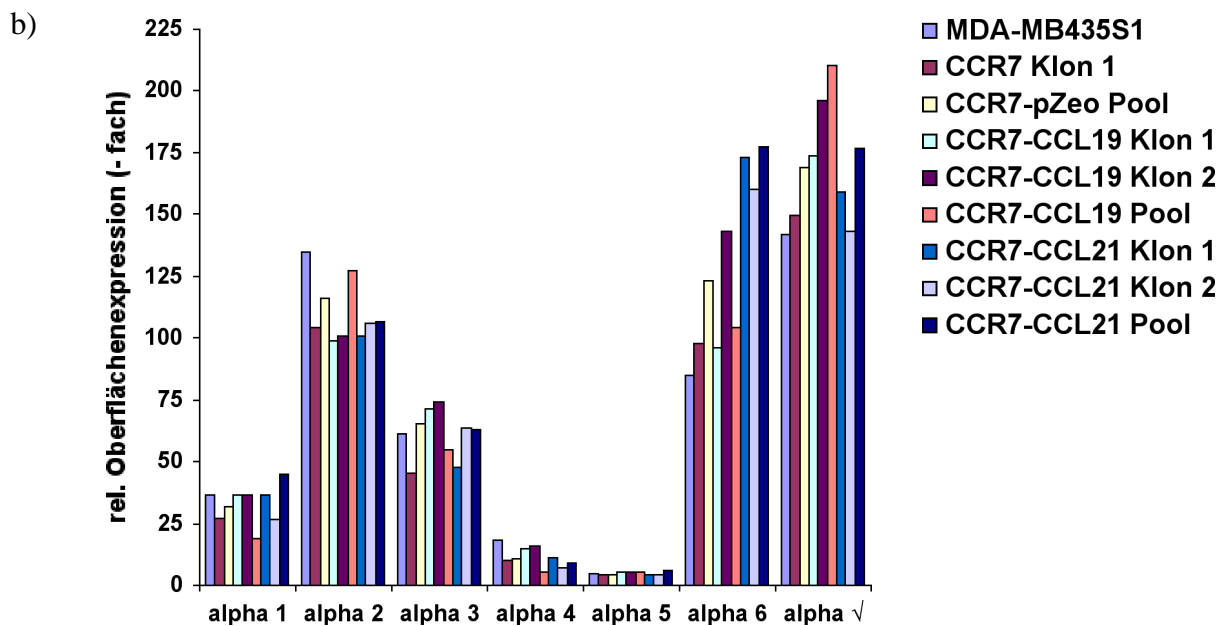


Abb. 21: FACS-Analyse der Expression von CCR7 und Integrin-Untereinheiten auf stabil CCR7-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen und Parentalzellen. In a) ist die Stärke der Expression von CCR7 auf den verschiedenen Zellpopulationen dargestellt. Die schwarze Linie entspricht der Färbung mit den Isotyp-Antikörper, die rote Fläche entspricht der Färbung mit anti-CCR7 Antikörper 3D12. In b) wurde die relative Oberflächenexpression für verschiedene Untereinheiten von Integrinen, die Kollagen binden (alpha1-alpha6; alphav, beta1 und beta3), analysiert. Die Balken stellen den Quotienten der mittleren Fluoreszenz-Intensität der Färbung mit spezifischen Antikörpern und Isotypkontrollen dar.

Für T-Zellen wurde gezeigt, daß CCL21 über CCR7 beispielsweise $\alpha 4$ oder αL -Integrine aktiviert (Till et al., 2002). Die verwendeten Antikörpern erlauben nicht zwischen den Aktivierungszustände von Kollagen-bindenden Integrinen zu unterscheiden; entsprechend konnte die Aktivierung der Integrine auf MDA-MB435S1-Zellen nicht untersucht werden, da mit den für die FACS-Messung verwendeten Antikörpern die Aktivierung der Integrine nicht untersucht werden konnte. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Bindungsaffinität der Integrine für das Kollagen, mit der die Polykarbonatmembran beschichtet wurde, durch die Transfektion oder Koexpression moduliert wurde.

5.1.5 Kurzzeitmigrationsexperimente in BALB/c-Mäusen

Kurzzeitmigrationsexperimente sollten Aufschluß geben, inwieweit adoptiv transferierte Tumorzellen verschiedene Organe von BALB/c-Mäuse infiltrieren. Dazu wurden MDA-MB435S1-Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff CFSE für 30 min bei 37 °C in PBS markiert und nach mehrmaligem Waschen in PBS/ 2 mM EDTA aufgenommen. Pro Tier wurden 4×10^6 Zellen in die Schwanzvene injiziert. Die BALB/c-Mäuse wurden 3 h nach Injektion getötet und verschiedene Organe (Lunge, Leber, Niere, Milz, 2 brachiale Lymphknoten (BLN); 2 axiläre Lymphknoten (ALN); 2 inguinale Lymphknoten (ILN); 2 mandibuläre Lymphknoten (MaLN) und 3 Peyer'schen Plaques (PP)) wurden entnommen. Einzelzell-suspensionen der isolierten Organe wurden per FACS-Analyse analysiert.

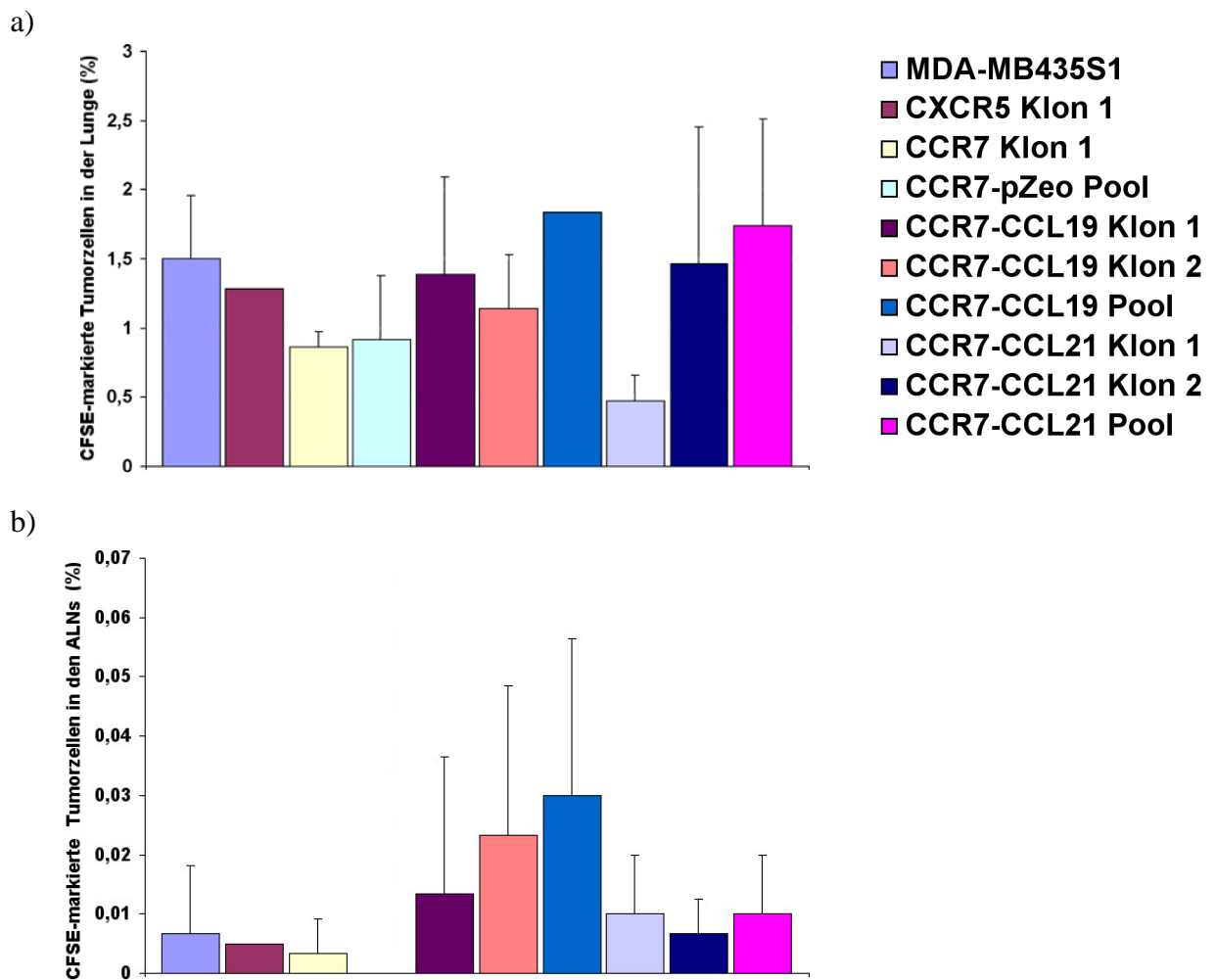


Abb. 22: Anteil transferierter Brustkrebszellen an der Gesamtzahl von Zellen der Lunge bzw. ALNs von BALB/c Mäusen. Die Zellen wurden i.v. in die Schwanzvene der Mäuse injiziert und die Organe wurden nach 3 Stunden entnommen. Die Tumorzellen wurden vor dem Transfer mit CFSE markiert und konnten so im FACS detektiert werden. Dargestellt sind in a) der Prozentanteil an Tumorzellen in der Lunge sowie (b) in den ALNs (wie im Kapitel 4.13.2 berechnet). Die Balken stellen Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten (insgesamt 2-3 Tiere) dar. Die Standardabweichung wurde für Ergebnisse, auf der Grundlage von 3 Tieren, errechnet.

Bei der Kurzzeitmigration von Tumorzellen in BALB/c-Mäusen zeigte sich, daß im Vergleich zu anderen Organen die Lunge am stärksten von transferierten Tumorzellen infiltriert wurde. Diese Infiltration der Lunge wie der axilären Lymphknoten (ALN) war nach 3 Stunden unabhängig von CCR7 (Abb. 22). Andere Organe wie Niere, Milz, BLN, MLN, MaLN, ILN und PP ließen ebenfalls keine klonspezifische Dissemination erkennen, so daß die Migration der MDA-MB435S1-Zellen auch in diese Organe als von CCR7 unabhängig angesehen werden kann. Auch die Koexpression von CCR7 und CCL19 oder CCL21 veränderte nicht das Potential der Tumorzellen die Lunge oder die ALN zu infiltrieren (Abb. 22).

CXCR5 ist ebenfalls ein *homing*-Rezeptor wie CCR7, der beispielsweise für die Migration von B-Lymphozyten in die Follikel der peripheren Lymphknoten wichtig ist. Die ektopische

Expression von CXCR5 auf den Tumorzellen hatte aber keinen Einfluß auf die Migration transferierter Zellen zu den ALNs im Vergleich zu den Parentalzellen.

5.1.6 Analyse der MDA-MB435S1 Transfektanden im Metastasierungs-Assay

Ziel der Experimente war, in einem Mausmodell mit Nacktmäusen herauszuarbeiten, inwieweit CCR7 am Prozeß der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt ist. Bei Meiners *et al.* (1998) wurde bereits das Tumormodell mit den MDA-MB435S1-Zellen in seiner Eignung als orthotopes Modell bestätigt. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine autokrine Stimulation über CCR7 das Metastasierungspotential der MDA-MB435S1-Zellen verändert und der Tumor daraufhin verschiedene Organe infiltriert und Metastasen bildet.

5.1.6.1 FACS-Analyse von unterschiedlichen Organen der Nacktmaus

Die Applikation der Tumorzellen erfolgte in die Brustdrüse von 6 Wochen alten jungfräulichen Nacktmäusen. Die MDA-MB435S1-Zellen sind im Brustgewebe zu einem Tumor herangewachsen.

Tabelle 4: Detektion von Tumorzellen in verschiedenen Organen nach orthotoper Applikation in Nacktmäuse. Aus den Organen wurden eine Einzelzellsuspension hergestellt und in der Zellkultur gehalten. Bei dieser groben Analyse kann weder eine Aussage über die genaue Lokalisation (außerhalb und im Gewebe, Blut- und Lymphgefäße) von Tumorzellen noch über die Bildung von Metastasen gemacht werden. Die Analyse beschränkt sich auf den Nachweis von Tumorzellen in der präparierten Zellsuspension nach Kultivierung. Angegeben wurde die Zahl der Tiere mit Tumorzellen (Zellpopulation) im entsprechenden Organ (Tumor/Tier). Es wurden die Zellpopulationen gleicher ektopischer Expression als Gruppe zusammengefaßt: CCR7 repräsentiert CCR7-pZeo Pool; CCR7-CCL19 repräsentiert CCR7-CCL19 Klon 1 und Klon 2; CCR7-CCL21 repräsentiert CCR7-CCL21 Klon 1, Klon 2 und Pool.

injizierte Zellpopulation	Lunge	Milz	Leber	Niere	ALN	PP
MDA-MB435S1	3/4	0/4	0/4	1/4	4/4	3/4
CCR7	2/3	1/3	1/3	1/3	3/3	3/3
CCR7-CCL19	3/3	0/3	0/3	2/3	3/3	2/3
CCR7-CCL21	8/8	0/8	0/8	7/8	7/8	8/8

Die Tumormasse füllte das umliegende Mammafettgewebe fast vollständig aus und wurde vereinzelt von Fettzellen durchzogen. Die Tumorzellen erscheinen generell polymorphkernig mit großen Kernen und verhältnismäßig geringem zytoplasmatischem Anteil, was auf teilungsaktive und polyploide Zellen hinweist. Nekrotische Bereiche innerhalb des Tumors waren an den kondensierten Zellkernen und an der Abwesenheit von Zytoplasma zu erkennen. Die Tiere wurden bei einer Tumorgröße von 15-20 mm im Durchmesser abgetötet und auf Metastasenbildung in verschiedenen Organe im FACS (Abb. 23; Tab. 4) und in

Gefrierschnitten (Abb. 24-26; Tab. 5) untersucht. Der Tumor wuchs in den meisten Fällen lokal begrenzt, und nach Öffnen des Thorax waren nur selten makroskopische Metastasen auf der Lunge zu erkennen. Eine starke Durchblutung des Tumors deutet auf eine induzierte Angiogenese hin. So überexprimieren MDA-MB435S1-Zellen CXCL8 (Tab. 2; ELISA-Daten nicht gezeigt), welches mitogen bzw. angiogen auf Endothelzellen wirkt (Bar-Eli, 1999).

Für die FACS-Analyse wurde eine Hälfte von Lunge, Milz und Leber verwendet, während die andere Hälfte in Gefrierschnitten analysiert wurde. Bei Niere, ALN und PP wurde für die Analyse jeweils ein Organ entnommen (Tab. 4).

Die Ausbildung von Metastasen in drainierenden Lymphknoten, Lunge und anderen Organen wurde mit seriellen Gefrierschnitten in einer Immunfluoreszenz-Analyse untersucht. Mittels RT-PCR (Daten nicht gezeigt) und FACS-Analyse der Organe (Abb. 23; Tab. 4) konnten Tumorzellen in den verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Mit beiden Techniken konnte zudem die Rezeptor- und Chemokinexpression der Metastasen und Primärtumore untersucht werden.

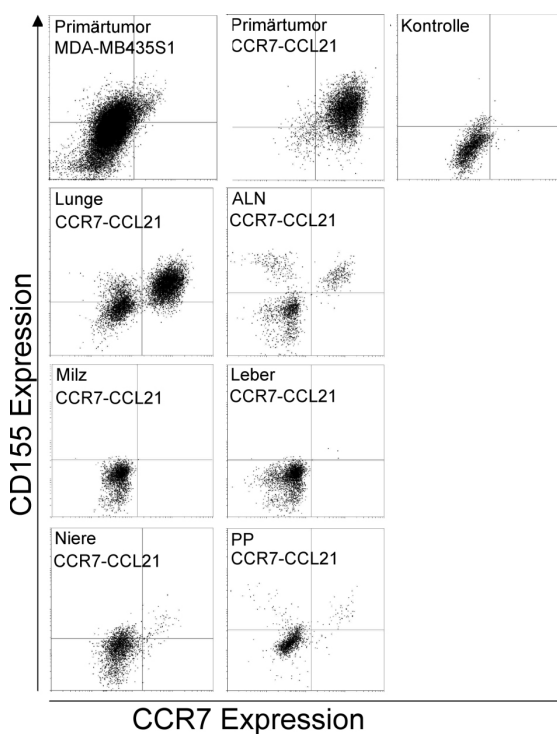


Abb. 23: FACS-Analyse kultivierter Zellen aus Organsuspensionen der Tabelle 4. Exemplarisch sind FACS-Analysen von Lunge, ALN, Nieren, Milz, Leber und PP einer Maus dargestellt, der Tumorzellen des CCR7-CCL21 Pools oder der Parentalzellen MDA-MB435S1 appliziert wurden; Tumorzellen sind mit anti-human CCR7 (3D12) und anti-human CD155 (D171) im FACS detektiert worden, wobei der Antikörper anti-CD155 spezifisch MDA-MB435S1-Zellen erkennt. Die Kontrolle zeigt die exemplarische Färbung eines Primärtumors mit Isotypkontroll-Antikörpern für anti-CD155 und anti-CCR7.

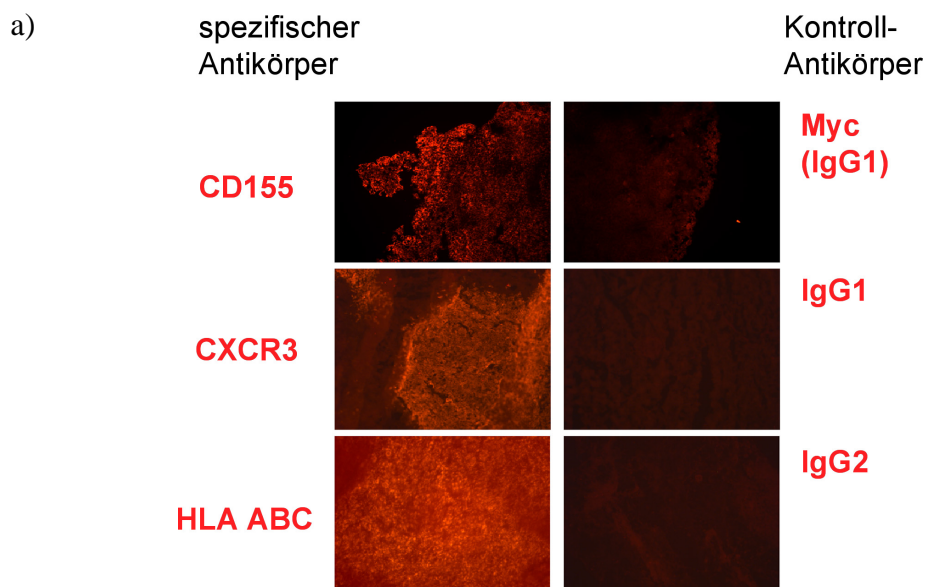
Tumorzellen, die die Lunge, Milz, Leber, Niere, ALN und PP infiltrierte, wurden aus den Organen herausgelöst und in der Durchflußzytometrie mittels Antikörper gegen humanes CCR7 und CD155 detektiert (Abb. 23 und Tab. 4). In der FACS-Analyse wurden in fast allen Lungen, PP und ALN der Versuchstiere Tumorzellen detektiert; nicht aber in Leber und Milz. In den Nieren nur weniger Tiere wurden Tumorzellen detektiert, mit Ausnahme der Tiere mit Tumoren aus koexprimierenden Zellen, wie CCR7-CCL19 (66,7 %) und CCR7-CCL21 (87,5 %).

Aus diesen kultivierten Organpräparationen konnte mit Hilfe der FACS-Analyse geschlossen werden, daß die MDA-MB435S1-Zellen unabhängig von der Expression von CCR7 das Potential haben, die Lunge, die Niere, die ALN und PP zu infiltrieren. Augenfällig war zudem, daß CCR7-CCL21-Kotransfektanten im Vergleich zu den anderen Zellpopulationen verstärkt in der Niere zu finden waren (Tab. 4). Dennoch vermag diese FACS-Analyse nicht auszuschließen, daß auch im Blut oder der Lymphe verschleppte Tumorzellen nach Kultivierung detektiert wurden.

Erst die Gefrierschnitte (Abb. 24 und 25) ermöglichten eine genauere Deutung dieser FACS-Daten (Tab. 4, Abb. 23), da am Beispiel der Lymphknoten in Gefrierschnitten gezeigt wurde, daß die Tumorzellen in nur wenigen Fällen überhaupt den Lymphknoten infiltrierten und sich sonst außerhalb der Kapsel des Lymphknotens befanden (Abb. 24d).

5.1.6.2 *Histologische Analyse von Tumor- und Lungengewebe der Nacktmäuse*

In den Gefrierschnitten wurden humane Tumorzellen mittels Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen humanes CXCR3 oder HLA ABC detektiert (Abb. 24). Diese Antikörper ermöglichten eine spezifische Detektion von Tumorzellen in den verschiedenen Organen aufgrund der geringen Hintergrundfärbung in Lunge und Lymphknoten und aufgrund eines hohen spezifischen Signals auf MDA-MB435S1-Zellen. Allerdings gaben diese Antikörper hohe Hintergrundsignale in PP, Leber und Niere, so daß in diesen Geweben keine Analyse möglich war. Zur Expressionskontrolle der Tumore und Metastasen wurde diese Gewebe mit Antikörper gegen humanes CCR7, humanes CCL19 und humanes CCL21 gefärbt (Abb. 24). Die Spezifität der humanen und murinen Antikörper anti-CCL19 und CCL21 wurde in Gefrierschnitten humaner Tonsillen und murinen Milzen überprüft. Die Antikörper zeigten eine Spezies-spezifische Färbung für die Chemokine in den T-Zellzonen der Organe (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Primärtumore und Metastasen in den Nacktmäusen zeigte weiterhin eine klon-spezifische stabile Expression der Chemokine oder von CCR7.



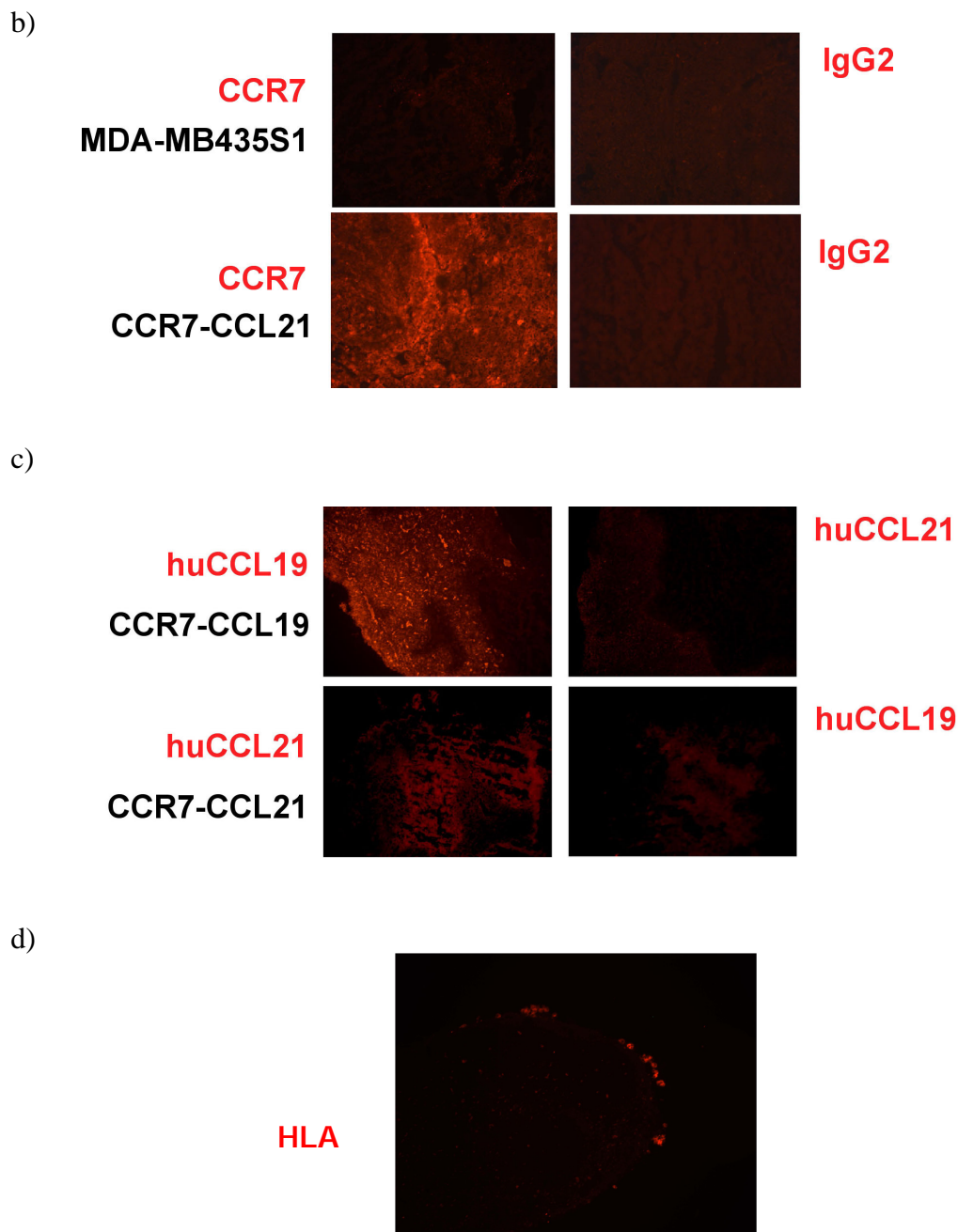


Abb. 24: Analyse von Tumorgewebe. Die Fluoreszenz-Analyse des Primärtumors wurde mit Einfach-fluoreszenz-Analyse mit spezifischen Antikörpern und Kontrollantikörper durchgeführt. In a) wurden Tumorzellen mit anti-CXCR3, anti-CD155 und anti-HLA ABC im Primärtumor und in verschiedenen Organen detektiert. In b) wurden repräsentative Tumorzellen aus CCR7-exprimierenden Primärtumoren oder Parentalzellen (schwarze Schrift) mit anti-CCR7 Antikörpern (rote Schrift) hinsichtlich ihrer Expression von CCR7 kontrolliert. In c) wurden Tumorzellen mit anti-huCCL19 (rote Schrift) und anti-huCCL21 (rote Schrift) Antikörpern hinsichtlich einer stabilen Expression von humanen CCL19 auf repräsentativer CCR7-CCL19-Zellpopulation (schwarze Schrift) oder CCL21 auf repräsentativer CCR7-CCL21-Zellpopulation (schwarze Schrift) kontrolliert. In d) ist exemplarisch eine unspezifische Lokalisation von Tumorzellen (exemplarisch CCR7-CCL19 Klon 1) außerhalb des Lymphknotens gezeigt; Tumorzellen wurden mit anti-human HLA angefärbt. Sequenzielle Gefrierschnitte von Tumorgewebe wurden zur histologischen Untersuchung mit Hämatoxylin/ Eosin angefärbt.

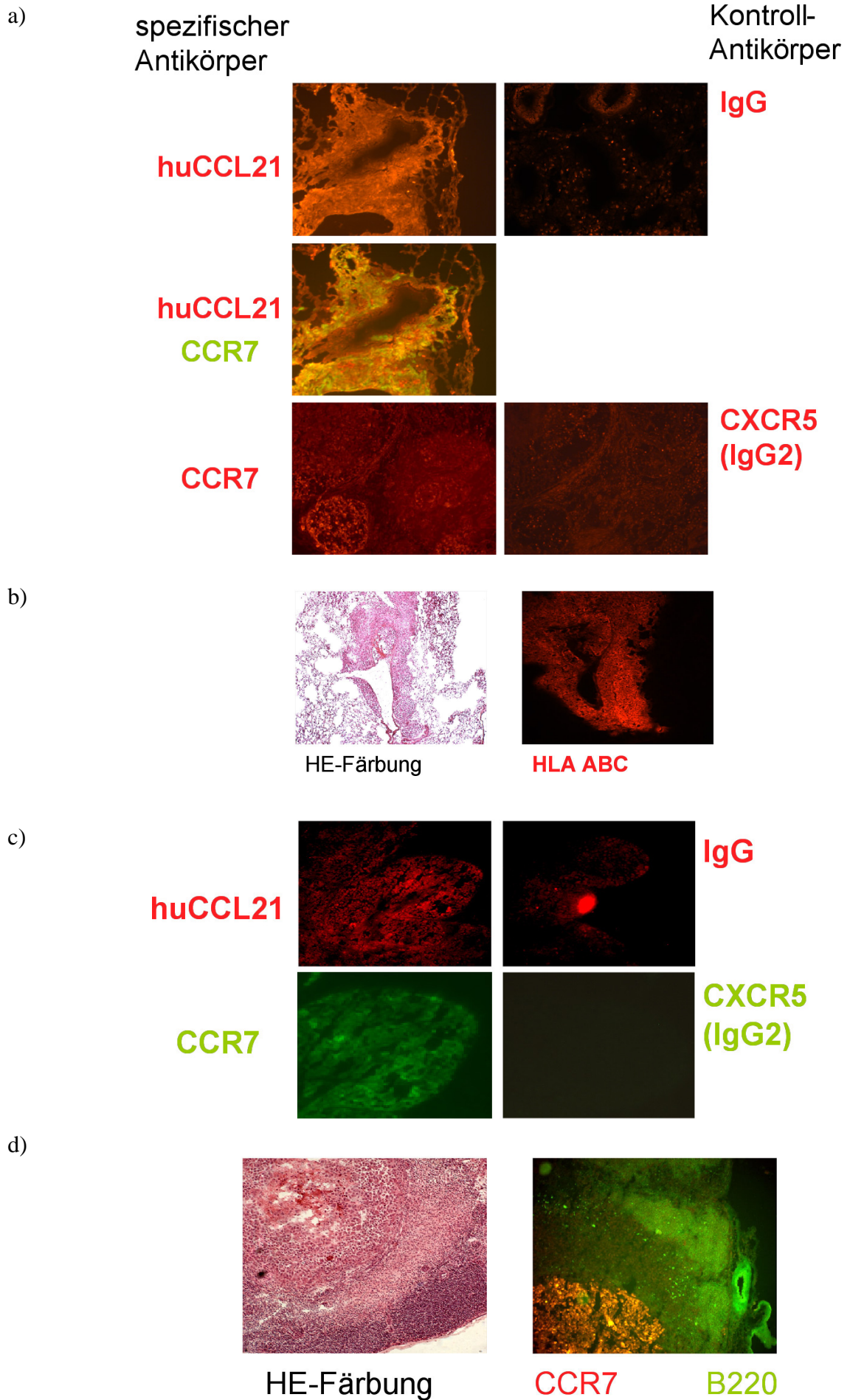


Abb. 25: Analyse von Lungen- und axilären Lymphknoten-Metastasen. Sequenzielle Gefrierschnitte von a-b) Lungen- und d-c) axilärem Lymphknotengewebe wurden zur histologischen Untersuchung mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt. Die Fluoreszenz-Analyse von Metastasen aus dem Ausschnitt in a) und c) werden mit spezifischen Antikörpern in einer Einfachfluoreszenz-Analyse dargestellt. Repräsentative Metastasen, die aus Zellen der CCR7-CCL21 Zellpopulation bestehen, wurden mit anti-CCL21 (rot) und anti-CCR7 (grün bei Doppelfärbung oder rot bei Einfachfärbung) hinsichtlich ihrer Expression kontrolliert. Sequenzielle Gefrierschnitte von Lungen- b) und Lymphknotengewebe d) wurden zur histologischen Untersuchung mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt.

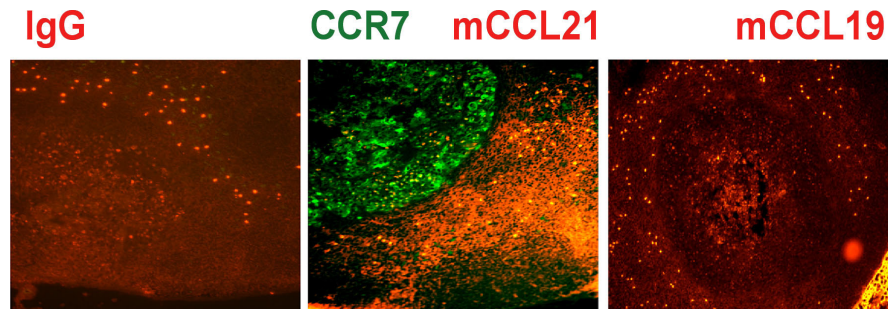


Abb. 26: Immunfluoreszenz-Analyse von den mit Metastasen befallenen Lymphknoten hinsichtlich der Expression von murinem CCL19 und CCL21. Zweifachfluoreszenz-Analyse mit Tumor-infiltrierten Lymphknoten aus der Maus mit CCR7-CCL21 Klon 2 transplantierten Zellen, wobei endogenes murines CCL21 mit anti-murine CCL21 (mCCL21) und endogenes murines CCL19 (mCCL19) mit anti-murine CCL19 angefärbt wurde. Grüne Färbung mit anti-CCR7 stellt Metastase dar. IgG entspricht Isotyp-Antikörper für anti-mCCL19 oder anti-mCCL21.

Primärtumore und Metastasen, die sich nur aus Zellen zusammensetzten, die heterolog CCR7 exprimierten, zeigten eine deutliche Oberflächenexpression von CCR7 (Abb. 24a). Primärtumore und Lungen-Metastasen aus Parentalzellen, CCR7 Klon 1 oder CCR7-pZeo Pool zeigten keine humane CCL19- oder CCL21-Färbung (Daten nicht gezeigt). Wohingegen die Expression von humanem CCL19 oder CCL21 in den Primärtumoren (Abb. 24c) und Metastasen (Abb. 25b) aus entsprechenden CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21-koexprimierenden Tumorzellen bestätigt werden konnte. Die Tumore und Metastasen weisen oftmals im Zentrum nekrotische Zonen auf (Abb. 25d und 26), die eine erhöhte unspezifische Färbung in der Immunfluoreszenz erzeugten.

In den Lungen waren makroskopisch in wenigen Fällen Metastasen auszumachen, so daß nur mikroskopische Untersuchungen mittels Gefrierschnitten Aufschluß über den Befall des Organs geben konnten (eigene Beobachtung). Eine Färbung mittels anti-murinem CCL19- (mCCL19) und CCL21-Antikörper (mCCL21) zeigte, daß die murinen Chemokine ein unterschiedliches Expressionsniveau im Parakortex der Lymphknoten besitzen; insbesondere murines CCL21 gab ein starkes Signal (Abb. 26). In Follikeln konnten B-Zellen über den Antikörper B220-Fitc gezeigt werden. Lediglich in Mäusen mit CCR7-CCL21-koexprimierenden Tumoren (CCR7-CCL21 Zellpopulation) waren auch die mit der Milchdrüse assoziierten Lymphknoten, die drainierenden ALNs, von Metastasen ausgefüllt, was auf eine lokale Invasion des Lymphknotens durch umliegende Tumorzellen zurückzuführen ist (Abb. 25, 26). Die Metastasen befanden sich nicht in den Follikeln,

sondern in der Nähe des Sinus. In allen anderen Tieren waren Tumorzellen um die Lymphknoten verteilt zu finden, ohne diese jedoch zu infiltrieren.

Tabelle 5: Tabellarische Übersicht zur Metastasenbildung in Tumor-tragenden Nacktmäusen. Es wurden in zwei unabhängigen Experimenten 10⁶ Tumorzellen zu Beginn des Versuchs orthotop in das Mammafettgewebe appliziert, die zu einen Primärtumor heranwuchsen. Bei einer finalen Länge des Primärtumors von mindestens 15 mm wurden die Tiere getötet, unabhängig von der Dauer des Versuchs. n° gibt die Zahl der Tiere mit Metastasen im Verhältnis zur Gesamtzahl von untersuchten Tieren. a) Auflistung der Einzeldaten hinsichtlich der Metastasenbildung; b) Zusammenfassendes Ergebnis der Metastasenbildung: Klone und Pool mit gleicher Expression von CCR7, CCL19 und CCL21 werden als Zellpopulation zusammengefaßt.

a)		Mäuse mit Lungen-Metastasen		Mäuse mit ALN-Metastasen	
		n°	%	n°	%
injizierte Zellen					
MDA-MB435S1		2/5	40	0/5	0
CCR7 Klon 1		2/7	29	0/7	0
Kotransfektanden	CCR7-pZeo Pool	4/6	67	0/6	0
	CCR7-CCL19 Klon 1	3/4	75	0/4	0
	CCR7-CCL19 Klon 2	4/4	100	0/4	0
	CCR7-CCL19 Pool	3/6	50	0/6	0
	CCR7-CCL21 Klon 1	4/10	40	1/7	13
	CCR7-CCL21 Klon 2	4/4	100	0/4	0
	CCR7-CCL21 Pool	6/6	100	3/6	50

b)		Mäuse mit Lungen-Metastasen		Mäuse mit ALN-Metastasen	
		n°	%	n°	%
Zellpopulation					
MDA-MB435S1		2 / 5	40	0 / 5	0
CCR7		6 / 13	46	0 / 13	0
CCR7-CCL19		10 / 14	71	0 / 14	0
CCR7-CCL21		14 / 20	70	4 / 17	24

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Parentalzellen MDA-MB435S1 in den Nacktmäusen in der Lage waren, spontan in das Lungengewebe zu metastasieren, unabhängig von einer heterologen Expression des Chemokinrezeptors CCR7. Somit verstärkte die Expression von CCR7 die Lungen-Metastasierung von Brustkrebszellen nicht, obwohl seine potentiellen Liganden, murines CCL19 oder CCL21, ebenso wie CXCL12 (CXCR4-Ligand), in der Lunge exprimiert werden. Dieses Ergebnis wurde sowohl durch die FACS-Analyse (Tab. 4), als auch durch die Analyse der Gefrierschnitte belegt (Abb. 25c und Tab. 5). Dennoch muß beim Vergleich von Parentalzellen und CCR7-exprimierender Zellpopulation (CCR7 Klon 1 und CCR7-pZeo Pool) berücksichtigt werden, daß die Versuchszahl mit Parentalzellen sehr niedrig war. Auch die stabile Koexpression von CCR7 und CCL19 (in der CCR7-CCL19 Zellpopulation) oder CCL21 (in der CCR7-CCL21 Zellpopulation) auf den MDA-MB435S1-Zellen erhöhte nicht die Infiltration bzw. die Bildung von Lungen-Metastasen signifikant (Tab. 5).

Die Analyse der ALN ergab, daß alleine die Überexpression von CCR7 auf Brustkrebszellen nicht ausreicht, damit diese Zellen in den axilären Lymphknoten metastasieren konnten.

Dennoch wurden Metastasen der koexprimierenden CCR7-CCL21-Zellpopulationen in den Gefrierschnitten von axillären Lymphknoten detektiert. Die Tumorfärbung war in den Gefrierschnitten als Infiltration der Lymphknoten zu erkennen (Abb. 25 und 26), alle anderen Zellpopulationen waren unspezifisch um den Lymphknoten angesiedelt, was die FACS-Daten widerspiegeln (Tab. 4).

Obwohl der CCR7-CCL19 Klon 1 in *in vitro* Analysen (Abb. 19) vergleichbar war mit dem Klon 2 und dem Pool, war dieser nur nach Replantation sehr schlecht in den Nacktmäusen angewachsen und zeigte deswegen wahrscheinlich keine 100 %ige Metastasierung in der Lunge; gleiches gilt auch für den Klon 2 der CCR7-CCL21 Zellpopulation, der ebenfalls schlecht in der Maus angewachsen war. Dies könnte auch der Grund sein, warum Tiere mit Primärtumoren aus dem CCR7-CCL21 Klon 2 keine Metastasen im drainierenden Lymphknoten bildeten.

5.5 Chemokinrezeptor-abhängige Mechanismen von FTY720

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde eine mögliche Wechselwirkung der beiden *homing*-Rezeptoren, CXCR5 und CCR7, mit den immunmodulatorischen Effekten der synthetischen Substanz FTY720 *in vitro* und *in vivo* untersucht. Der auffälligste Effekt der Applikation von FTY720 ist die reduzierte Lymphozytenzahl im peripheren Blut (Lymphopenie) und die Anreicherung dieser Zellen im lymphoiden Gewebe. Die FTY720-abhängige Anreicherung der Lymphozyten in den lymphatischen Organen führte dabei zu einer "Immunsuppression", ohne daß die Immunkompetenz der Lymphozyten kompromittiert wurde. Da CCR7- ($CCR7^{-/-}$) oder CXCR5-*knockout*-Mäuse ($CXCR5^{-/-}$) eine defekte Zellmigration und eine reduzierte Rekrutierung von Lymphozyten in sekundäre lymphatische Gewebe aufweisen, war es interessant zu untersuchen, ob FTY720 über CXCR5 oder CCR7 Einfluß auf die Lymphozyten-Migration ausübt.

Ausgehend von der Arbeitshypothese, daß FTY720 nur über CCR7 oder CXCR5 auf die Migration peripherer Lymphozyten wirkt, würde die FTY720-induzierte Lymphopenie in den *knockout*-Mäusen ausbleiben. Falls die Rezeptoren nicht alleine für die FTY720-induzierte Lymphopenie verantwortlich und nur peripher involviert sind bzw. ihre Funktion durch andere Rezeptoren kompensiert werden kann, würden die Gendefekte in $CCR7^{-/-}$ - und $CXCR5^{-/-}$ -Mäusen eine Lymphopenie verzögern oder die Migration in die sekundären lymphatischen Organe beeinflussen. Zunächst wurde der Wirkmechanismus von FTY720 in verschiedenen Assays in Abhängigkeit von CCR7 und CXCR5 *in vitro*, wie z.B. MAPK-, Internalisierungs- und Chemotaxis-Assays, sowie *in vivo* in Kurzzeitmigrationsexperimenten und in den $CCR7^{-/-}$ - oder $CXCR5^{-/-}$ -Mäusen untersucht.

5.5.1 FTY720 und Chemokinrezeptor-Funktionen *in vitro*

Um den Wirkmechanismus von FTY720 auf das CCR7-abhängige Lymphozyten-*homing in vivo* zu untersuchen, wurde vorweg *in vitro* geklärt, inwieweit die Aktivität von CCR7 im funktionellen Zusammenhang mit der MAPK-Aktivierung, der CCL19-abhängigen Internalisierung und der Chemotaxis durch FTY720 verändert wird.

5.5.1.1 Aktivierung des MAPK-Signalwegs über CCR7 oder CXCR5 in Zusammenhang mit FTY720

Es wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, daß FTY720 die Aktivität von CXCL13, CCL19 oder CCL21 im MAPK-Assay moduliert, indem es entweder den Schwellenwert einer Initiativstimulation mit einer minimal-effektiven Liganden-Konzentration von 2 nM oder mit einer effektiven Signalstärke von 20 nM verändert.

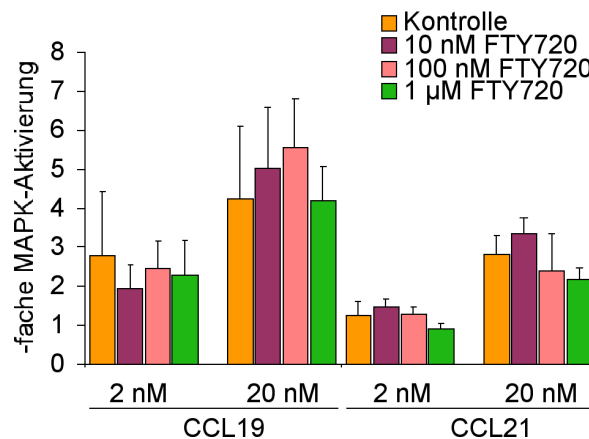


Abb. 27: MAPK-Assay zur Untersuchung des Einflusses von FTY720 auf die Aktivierung der MAPK-Kaskade über CCR7. Die relative Luziferase-Aktivität von RLU1 und RLU2 ist ein Maß für die Phosphorylierung von Elk-1 und damit für die MAP-Kinase Aktivierung (siehe Kapitel 4.11). CHO-K1-Zellen wurden transient mit den Reporterplasmiden und dem CCR7-kodierenden Plasmid kotransfiziert. Mit verschiedenen Konzentrationen von FTY720 wurden die Zellen für 1 Stunde präinkubiert und 6 Stunden über CCR7 mit 2 nM oder 20 nM CCL19 oder CCL21 stimuliert. Während der 6 Stunden wurden die Zellen weiterhin mit FTY720 inkubiert. Die Ergebnisse sind auf die Messung unstimulierter Zellen normalisiert (=1). Die Standardabweichung wurde aus 3 unabhängigen Experimenten errechnet.

Bei einer konzentrationsabhängigen Sensibilisierung des MAPK-Signalwegs durch FTY720 würden die CCR7-kotransfizierten CHO-K1-Zellen mit einer Erhöhung der Aktivität von Elk-1 bereits auf geringste Konzentrationen von CXCL13 oder CCL19/ CCL21 reagieren. Andererseits könnte FTY720 insgesamt die Elk-1 Aktivität verändern. Dazu wurden CHO-K1-Zellen mit CCR7 oder CXCR5 transient transfiziert und eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen von FTY720 präinkubiert. Diese Zellen wurden anschließend mit den entsprechenden Liganden für CCR7 oder CXCR5 stimuliert. Im Elk-1-Assay (MAPK-Stimulation) wurden verschiedene Konzentrationen der jeweiligen Chemokine, CXCL13, CCL19 und CCL21, verwendet, die zur höchsten oder niedrigsten nachweisbaren MAPK-

Stimulation führten, um zu testen, ob sich durch die FTY720-Behandlung die Empfindlichkeit des Assays verändert. Das Ergebnis dieser Untersuchung war, daß FTY720 unabhängig von den jeweiligen Konzentrationen die Aktivität von CCL19 / CCL21 (Abb. 27) oder CXCL13 (Daten nicht gezeigt) im MAP-Kinase Assay nicht signifikant beeinflusste.

5.5.2 Internalisierung des heterologen Rezeptors CCR7 in Anwesenheit von FTY720

Da die Oberflächenexpression verschiedener GPCRs durch Induktoren wie PMA (Abb. 8) verändert werden kann, galt es zu klären, inwieweit FTY720 die Expression von CCR7 beeinflusst. Hierzu wurden verschiedene hämatopoetische Zelllinien (Raji-, CMLT1-, L591-, ESIII-Zellen) unter Zugabe von 100 nM oder 1 µM FTY720 kultiviert und die endogene Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5 im FACS gemessen. Eine 6stündige Inkubation mit FTY720 (100 nM und 1 µM) hatte keinen Effekt auf die endogene Expression von CXCR5 oder CCR7 der hämatopoetischen Zelllinien (Daten nicht gezeigt).

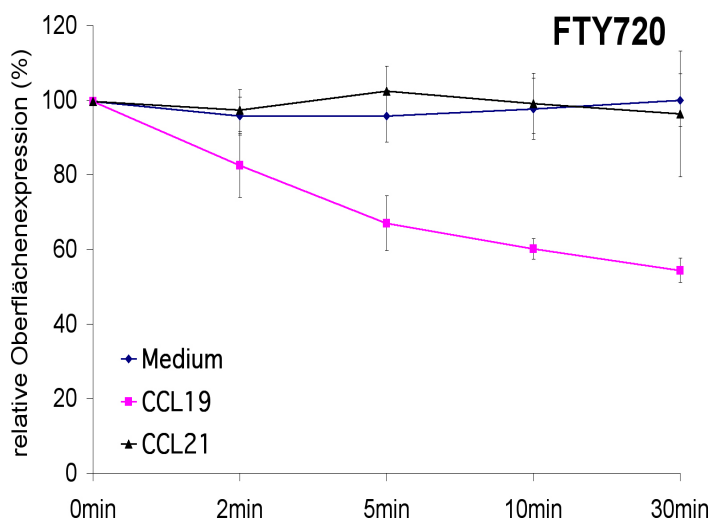


Abb. 28: Einfluß von 0,1 µM FTY720 auf die Internalisierung von CCR7. Im FACS wurde mit anti-CCR7 die Oberflächenexpression des ektopisch exprimierten CCR7 auf stabil exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen (CCR7 Klon 1) nach Stimulation mit CCL19 analysiert. Die Zellen wurden 1 Stunde zuvor mit 100 nM FTY720 präinkubiert. Die relative Oberflächenexpression wird für die verschiedenen Zeitpunkte aus Quotienten der CCR7-Oberflächenexpression vor (=100 %) und nach Stimulation berechnet. a) Kinetik der CCL19- und CCL21-induzierten Internalisierung. Standardabweichung wurde aus 3 unabhängigen Experimenten berechnet.

Weiterhin war noch ungeklärt, inwieweit die CCL19-abhängige Internalisierung von CCR7 durch eine Behandlung mit FTY720 verändert werden kann. Dazu wurden CCR7-exprimierende MDA-MB435S1-Zellen vor Stimulation durch CCL19 für 1 Stunde mit 100 nM FTY720 präinkubiert und anschließend die Kinetik der CCL19-induzierten Internalisierung von CCR7 per FACS gemessen (Abb. 28). Es ist deutlich zu sehen, daß die Behandlung mit FTY720 keinen Einfluß auf die Internalisierung von heterologem CCR7 hat. Die Aktivität von CCL19 und CCL21 in bezug auf die Internalisierung zeigt in beiden Fällen keinen Unterschied zu unbehandelten Zellen (Abb. 12). Eine Wechselwirkung von FTY720 und CCR7 kann aus diesen Experimenten nicht abgeleitet werden. Da FTY720 keine Internalisierung von CCR7 induziert, bindet möglicherweise FTY720 nicht an CCR7. Zudem zeigte FTY720 keine antagonistische bzw. inhibierende Wirkung auf die CCL19-abhängige

Internalisierung von CCR7. Diese Daten geben aber noch keinen Beweis dafür, ob FTY720 ein Agonist oder Antagonist von CCR7 ist.

5.5.3 Migrationseffekte von stabil CCR7-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen nach Stimulation mit FTY720

Zur Klärung der Frage, inwieweit FTY720 die CCR7-abhängige Migration beeinflusst, wurden stabile Zellklone (MDA-MB435S1-Zellen) verwendet, die entweder CCR7 (CCR7 Klon 1) oder CXCR5 (CXCR5 Klon 1) exprimierten. Die CXCR5-transfizierten Zellen dienten als Mock-Kontrolle. Dabei zeigte sich, daß CCL19 oder CCL21 die Migration von CCR7-exprimierenden Zellen stimuliert, und daß FTY720 diese chemo- oder haptotaktische Antwort auf 100 nM CCL21 nach 8 Stunden um den Faktor 2 erhöhte (Abb. 29).

Diese FTY720-abhängige Verstärkung der Chemo- oder Haptotaxis konnte jedoch nicht im selben Umfang mit 100 nM CCL19 beobachtet werden. Die Behandlung mit 100 nM FTY720 von unstimulierten CXCR5- und CCR7-exprimierenden Zellen hatte keinen Einfluß auf Spontanmigration der Zellen. Der verstärkende Effekt von FTY720 im Transwell-Assay auf die CCL21-induzierte Chemotaxis wurde auch auf CCR7-exprimierenden CMLT1- und CCR7-exprimierende Jurkat-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

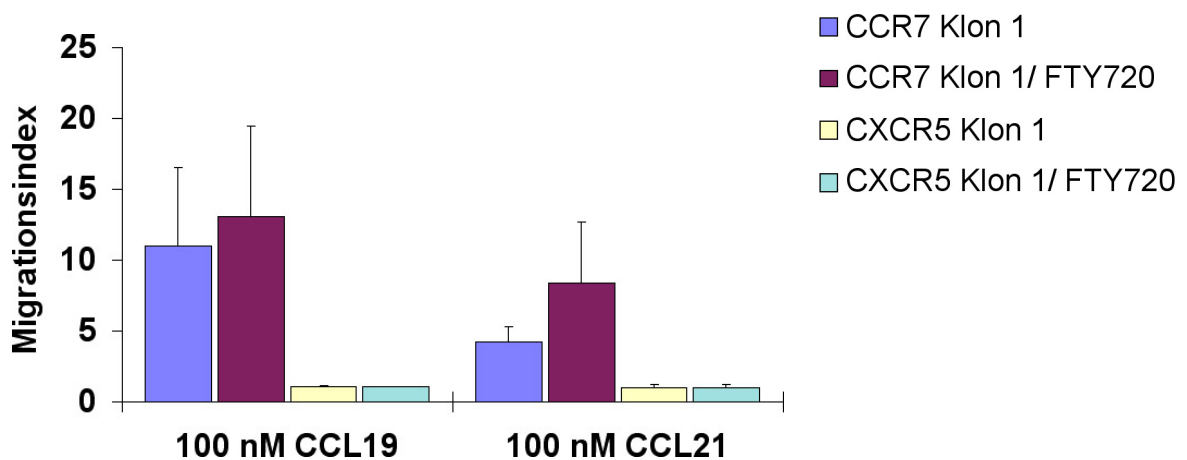


Abb. 29: Einfluß von 100 nM FTY720 auf die durch CCL19- oder CCL21-vermittelte gerichtete Migration in der Boyden-Kammer. MDA-MB435S1-Zellen, die stabil CCR7 (CCR7 Klon 1) oder CXCR5 (CXCR5 Klon 1) exprimieren, wurden für 1 Stunde mit FTY720 inkubiert, bevor sie im Migrations-Assay eingesetzt wurden. Die FTY720-behandelten Zellen wurden auch während des ganzen Versuchs weiterhin mit FTY720 der gleichen Konzentration inkubiert. Die migratorische Antwort auf exogenes humanes CCL19 oder CCL21 (je 100 nM) ist in Form des Migrationsindex, dem Verhältnis aus Chemokinin-induzierter Migration und Spontanmigration dargestellt. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 3 Meßwerten errechnet.

5.5.4 Kurzzeitmigration von Splenozyten aus Wildtyp- und CCR7^{-/-}-Mäusen im Vergleich unter Zugabe von FTY720

Um zu bestimmen, inwieweit die FTY720-induzierte Lymphozyten-Depletion aus dem Blut und ihre gleichzeitige Anreicherung in den lymphatischen Organen vom CCR7^{-/-}-spezifischen *homing*-Defekt beeinflusst wird, wurden 10⁷ Splenozyten aus den Wildtyp (wt; BALB/c-

Tiere)- und CCR7^{-/-}-Tieren (Tiere mit gemischten Hintergrund aus BALB/c und SV129/EV) mit CFSE markiert, mit FTY720 oder Puffer (Wasser) *ex vivo* behandelt und in einen BALB/c-Rezipienten (wt) i.v. in die Schwanzvene injiziert. Den Tieren wurde 30 min vor der i.v. Injektion der Splenozyten alternativ oral 0,3 mg/kg gelöstes FTY720 oder Puffer (Wasser) verabreicht. Die Tiere wurden 3 Stunden nach dem Transfer der Splenozyten in Ether getötet.

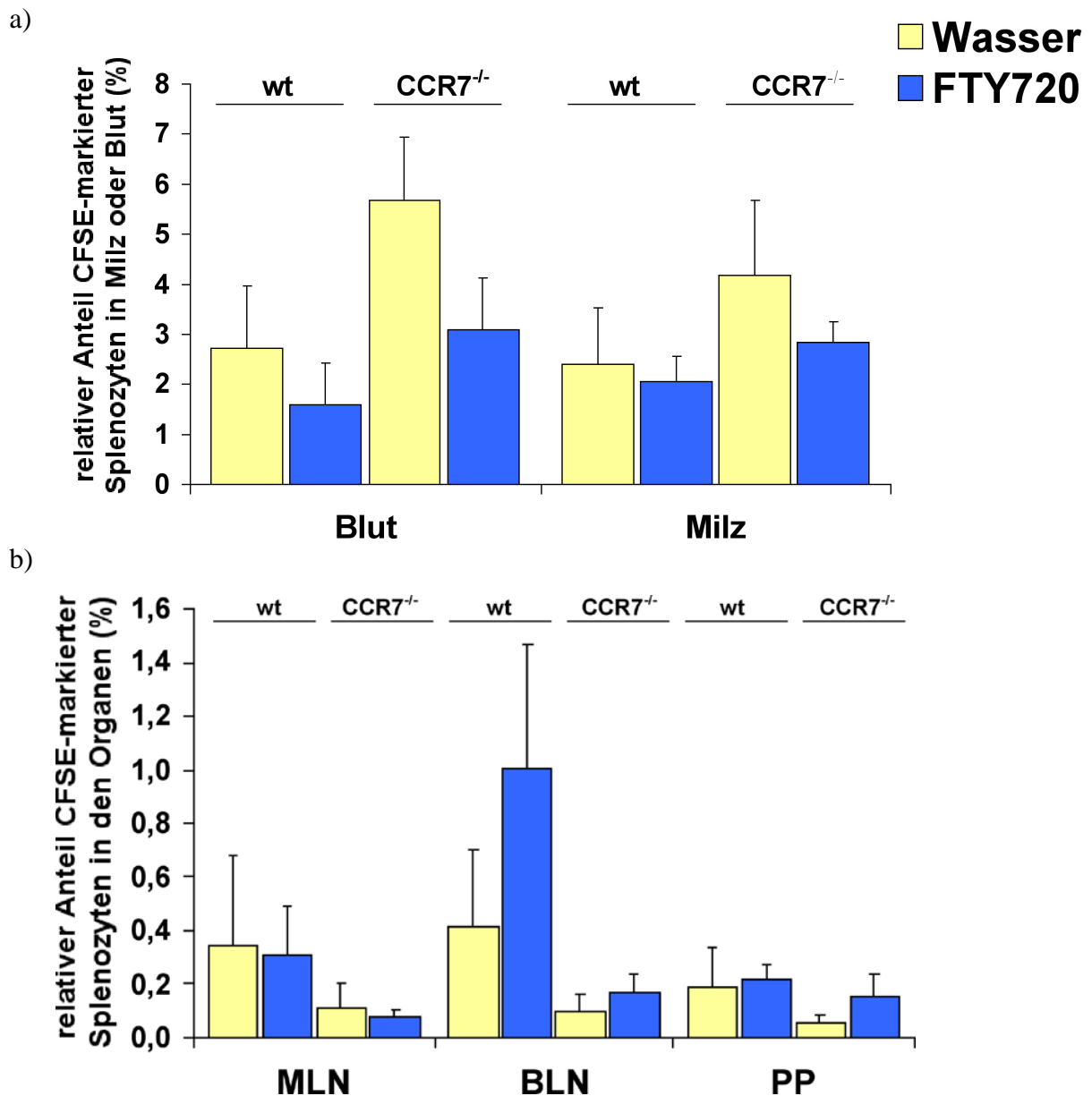


Abb. 30: Verteilungsmuster von i.v. injizierten CFSE-markierten Splenozyten aus Wildtyp- und CCR7^{-/-}-Mäusen. 3 Stunden nach oraler Administration von 0,3 mg/kg FTY720 wurden die Organe der Empfängertiere, BALB/c-Mäuse, hinsichtlich der Infiltration von CFSE-markierten Zellen untersucht. Der Anteil transferierter CFSE-markierter Splenozyten, die in einer Organsuspension mittels FACS-Analyse detektiert wurden, wurde wie im Kapitel 4.13.1 berechnet. Der Mittelwert repräsentiert die Auswertung aus 2 unabhängigen Experimenten mit mindestens 3 Tieren. wt: Wildtyp-Mäuse; CCR7^{-/-}: CCR7-defiziente Mäuse.

Der Lymphozytenanteil an CFSE-markierten Splenozyten in den Organen wurde mit der Zellzahl an Leukozyten aus den suspendierten Organen/dem Blut verrechnet. Es wurde das periphere Blut, die Milz, die Niere, mesenteriale (MLN) und brachiale Lymphknoten (BLN), die Lunge und die PPs hinsichtlich infiltrierender CFSE-markierter Splenozyten untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 30 dargestellt.

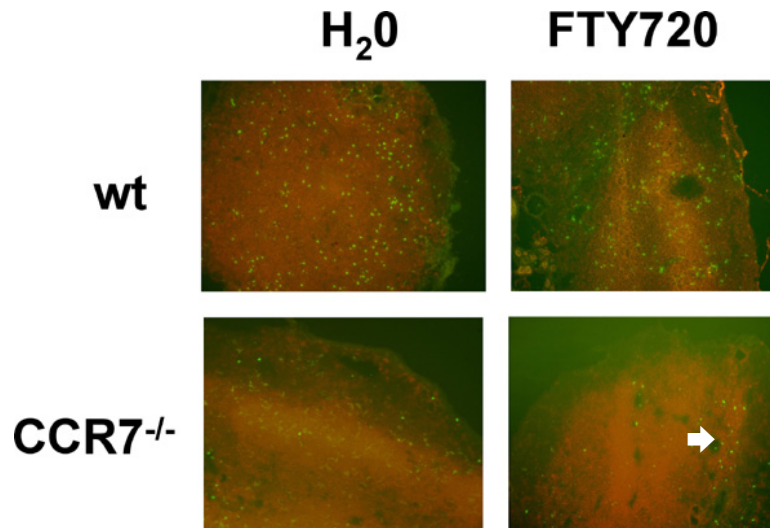


Abb. 31: Einfluß von FTY720 auf die Migration von wt- oder CCR7^{-/-}-Splenozyten über HEVs in Lymphknoten. Splenozyten von Donor-Tieren wurden mit CFSE markiert, vor der Injektion in BALB/c-Mäuse *ex vivo* mit FTY720 (100 nM, 37 °C, 30 min) oder, zur Kontrolle, mit Medium bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Mäuse wurden ebenfalls vor Injektion mit FTY720 oder Wasser behandelt. Nach 2,5 h wurden den Tieren die Lymphknoten entnommen und Kryoschnitte dieser Organe analysiert. Immunhistologische Bilder repräsentieren Schnitte brachialer Lymphknoten von BALB/c-Mäusen nach oraler Applikation von Wasser (H₂O) oder FTY720. T-Zellen wurden mit CD3-PE (rot) angefärbt. FTY720-behandelte CCR7^{-/-}-Splenozyten migrierten wahrscheinlich über die HEVs in das lymphoide Gewebe. Unbehandelte CCR7^{-/-}-Splenozyten migrierten nicht in das Gewebe. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils einem behandelten und unbehandelten Tier.

Die Migration von transferierten CCR7^{-/-}-Splenozyten in lymphatische Organe wie MLN, BLN und PP der BALB/c-Maus war gestört, so daß im Verhältnis zu BALB/c-Splenozyten (wt) weniger CFSE-markierte CCR7^{-/-}-Splenozyten die Organe infiltrierten. Die Migration der wt-Splenozyten in FTY720-behandelten Mäusen war gegenüber Puffer-behandelten Mäusen FTY720 in die BLNs (Faktor 2,4) und den PPs (Faktor 1,1) nur tendenziell verstärkt, die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Das gleiche gilt für transferierte CCR7^{-/-}-Splenozyten (BLNs: Faktor 1,6; PPs: Faktor 3).

Im Gegensatz dazu war der Anteil injizierter wt- oder CCR7^{-/-}-Splenozyten im Blut von FTY720-behandelten Tieren um ca. 40 % reduziert; in der Milz und im MLN war hingegen keine deutlich Veränderung erkennbar.

Im Kurzzeitmigrationsexperiment konnte gezeigt werden, daß die FTY720-induzierte Migration von CFSE-markierten transferierten wt- oder CCR7^{-/-}-Splenozyten in die BLNs und PPs nach 3 h nicht signifikant verstärkt war. Gefrierschnitte zeigten eine Kolo-kalisation von CFSE-markierten CCR7^{-/-}-Zellen und den HEVs nach FTY720-Behandlung, was vermuten läßt, daß die transferierten Lymphozyten unabhängig von der Expression des CCR7

wahrscheinlich über die HEVs in die peripheren Lymphknoten und PPs migrieren können (Abb. 31).

5.6 Modulierte Lymphozyten-Migration in CXCR5^{-/-}- und CCR7^{-/-}-Maus nach oraler Behandlung mit FTY720

Um die Wirkung von FTY720 auf das *homing* von B- und T-Zellen in lymphatische Organe besser untersuchen zu können, wurde Wildtyp-, CCR7^{-/-}- und CXCR5^{-/-}-Mäusen oral alternativ 0,3 mg/kg FTY720 oder Puffer verabreicht. Diese Tiere wurden dann hinsichtlich der FTY720-induzierten Veränderung der Lymphozyten-Populationsanteile im Blut und lymphatischen Organ untersucht. Damit sollte geklärt werden, inwieweit die FTY720-induzierte Reduktion peripherer Lymphozyten nach 6 und 12 Stunden (Abb. 32b) über die Expression von CCR7 oder CXCR5 gesteuert wird. Im zweiten Abschnitt wurden dann die lymphatischen Organe hinsichtlich der Anreicherung verschiedener Lymphozyten-Populationen untersucht. Den Mäusen wurde über einen Zeitraum von 6 Stunden FTY720 verabreicht und der Anteil an CD3⁻, CD45R⁻, CD4⁻, CD8⁻, CD4⁺CD62L^{high}-positiven Zellen im Blut und lymphatischen Organen wie Milz, MLN, BLN und PP bestimmt. In den aufgezeigten Experimenten werden in dieser Arbeit nur die SV129/EV-Tiere als Wildtyp-Tiere angegeben, da es zwischen den Stämmen SV129/EV- und SV129/EV-BALB/c- als Wildtyp-Tieren keine Unterschiede gab (Daten nicht gezeigt).

5.6.1 Lymphozyten-*homing* von peripheren Blutzellen, induziert durch FTY720 in Wildtyp-, den CXCR5^{-/-}- und CCR7^{-/-}-Mäusen

Um zu klären, inwieweit die Rezeptor-Defizienz der CXCR5^{-/-}- und CCR7^{-/-}-Mäuse die FTY720-induzierte Lymphopenie beeinflusst, wurde das Blut von mindestens vier Tieren zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Stunden nach Administration von Puffer oder 0,3 mg/kg FTY720 entnommen. Die Zellzahl aller Leukozyten im Blut wurde mit dem Anteil von spezifischen Lymphozyten-Populationen korreliert. Die FTY720-behandelten Lymphozyten-Populationen wurden auf die Puffer-behandelten Tiere bezogen und dargestellt.

Tabelle 6: Populationsanteil von peripheren CD3⁺B220⁺ Blutzellen nach 6stündiger Behandlung mit FTY720 und Puffer. Mittelwert mit Standardabweichung repräsentiert Werte aus mindestens 3 Mäusen.

Mäuse	Wildtyp	CCR7 ^{-/-}	CXCR5 ^{-/-}
FTY720-Behandlung	35,6 ± 8,4	43,3 ± 5,8	34,3 ± 5,1
Wasser-Behandlung	16,7 ± 7,1	24 ± 4,6	18,7 ± 4,2

Interessanterweise war über einen Zeitraum von 6 h die Zahl an CD3-positiven T-Zellen und CD45R-positiven B-Zellen im Blut nur bei den Wildtyp- (CD3: 59 %; B220: 45%) und den CXCR5^{-/-}-Mäusen (CD3: 56 %; B220: 63 %) nach FTY720-Administration reduziert; d.h. die

Zahl der B- und T-Lymphozyten war 6 h nach FTY720-Administration depletiert worden. CCR7^{-/-}-Mäuse zeigten nur eine geringe Abnahme an CD3- (7 %) und CD45R-positiven Zellen (8 %) im Blut nach FTY720-Administration (Abb. 32a). Somit nahm nach 6 h FTY720-Behandlung der Anteil an B- und T-Zellen im Blut in den Wildtyp- und CXCR5^{-/-}-Mäusen stärker ab als in CCR7^{-/-}-Mäusen (Abb. 32a).

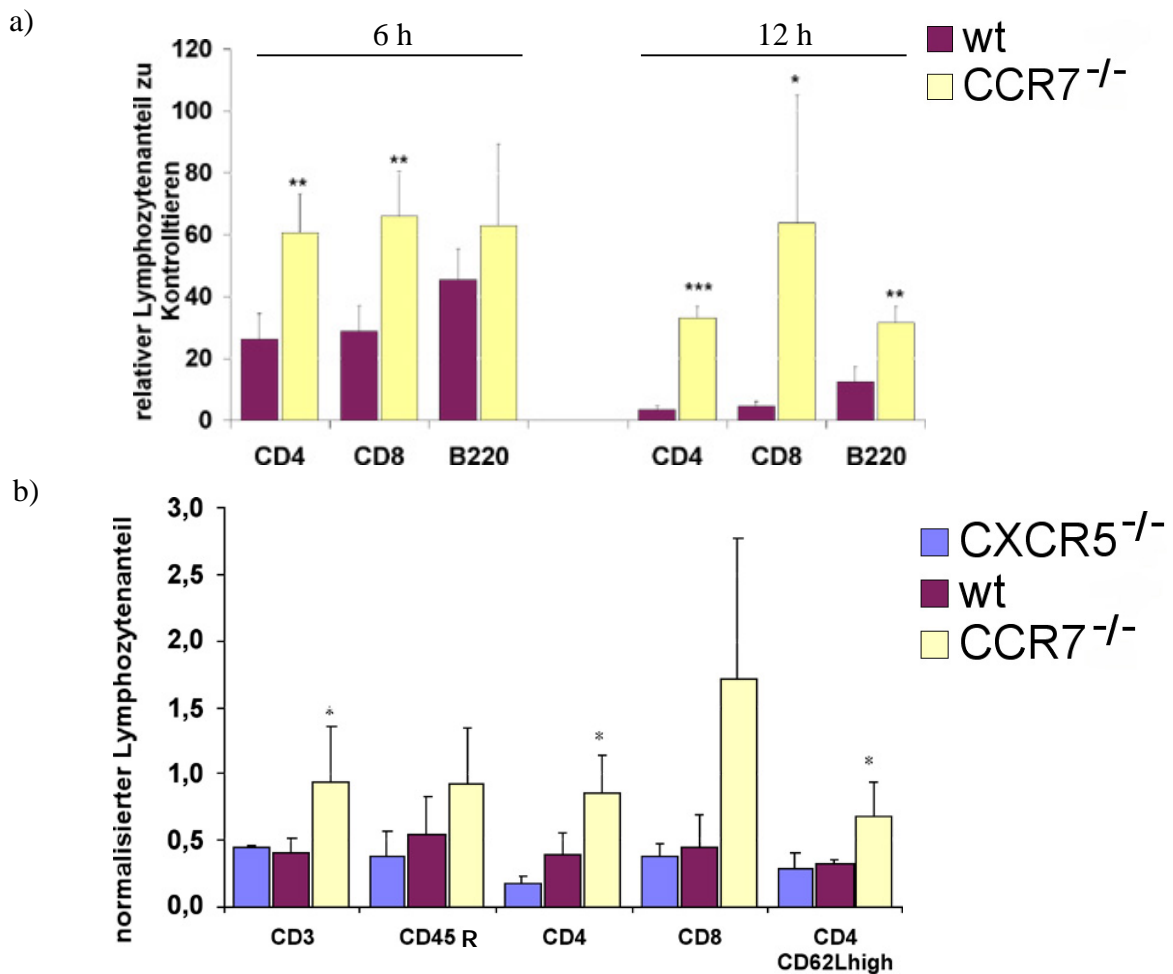


Abb. 32: Einfluß von FTY720 auf verschiedene periphere Lymphozytenpopulationen in Wildtyp-, CXCR5^{-/-}- und CCR7^{-/-}-Mäusen. Den Versuchstieren wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach oraler Administration von 0,3 mg/kg FTY720 Blut entnommen und die Zahl der Lymphozyten mittels Antikörpern im FACS analysiert (wie im Kapitel 4.14.2 berechnet). a) Kinetik der FTY720-induzierten Lymphopenie von B-Zellen und T-Zellen. Der relative Populationsanteil errechnet sich für die verschiedenen Zellpopulationen aus Puffer- und FTY720-behandelten Tieren. Die Standardabweichung bezieht sich auf vier Tiere eines Experimentes. b) Dargestellt ist der relative Anteil von Zellpopulationen im Blut nach 6 Stunden Inkubation mit FTY720 im Vergleich zu Puffer-behandelten Tieren (Kontrolltieren). Die Ergebnisse sind auf die Messung Puffer-behandelter Tiere normalisiert (=1). Der Quotient errechnet sich für die verschiedenen Zellpopulationen aus Puffer- und FTY720-behandelten Tieren. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten mit Puffer- oder FTY720-Behandlung errechnet. Sofern sich p-Werte von ≤0,05 ergaben, sind diese mit einem Stern markiert.

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß CD4-, CD8- und B220-positive Zellen nach einer Inkubation für 12 h in den Wildtyp-Tieren durch FTY720 fast vollständig aus dem Blut

depletiert wurden (Abb. 32b); die FTY720-induzierte Depletion peripherer Blutlymphozyten in den CCR7^{-/-}-Mäusen war hingegen drastisch verlangsamt (Abb. 32b). In allen Tieren hatte FTY720 eine stärkere Präferenz für CD4-positive T-Zellen als im Vergleich zu CD8-positiven T-Zellen oder B-Zellen (Abb. 32).

Zusätzlich konnte sowohl in den Wildtyp- wie in den *knockout*-Mäusen nach FTY720-Behandlung beobachtet werden, daß sich der Lymphozyten-Populationsanteil von CD3⁺B220⁺ Zellen im Blut erhöhte (Tab. 6). Diese Zellen wurden in dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert und es bedarf noch einer genaueren Untersuchung, um welche Zellen es sich hier handelt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in FTY720-behandelten wt- und CXCR5^{-/-}-Tieren Lymphozyten den peripheren Blutstrom verlassen und die FTY720-induzierte Lymphopenie vermutlich CXCR5-unabhängig ist.

In der CCR7^{-/-}-Maus war der Vorgang der Depletion verzögert, so daß vermutlich eine Abhängigkeit von CCR7 für einen Zeitraum von 12 h besteht. Die Meßwerte zum Zeitpunkt 24 h, publiziert in Henning *et al.* (2001), zeigten jedoch einen weiteren Abfall der CCR7^{-/-}-Lymphozyten im Blut, so daß die FTY720-abhängige Depletion auch unabhängig von CCR7 erfolgen kann. In Wildtyp-Tieren waren die T- und B-Zellen bereits nach 6 h fast vollständig durch FTY720 depletiert worden (Abb. 32b).

5.1.2 Veränderte Homöostase von T- und B-Zellen in sekundären lymphatischen Organen durch Injektion von FTY720

Bei der Analyse der lymphatischen Organe wie Milz, MLN, BLN und PP wurden wie bei der Analyse peripheren Blutes, die relativen Anteile der Zellpopulationen berechnet. In diesem Abschnitt werden zunächst Milz, dann mesenteriale und der brachiale Lymphknoten miteinander verglichen.

5.1.2.1 Homöostase der Milz verändert durch Behandlung mit FTY720

Das Volumen der Milzen von Wildtyp- und CXCR5^{-/-}-Mäuse war einheitlich, auch unabhängig von der Behandlung mit FTY720, wohingegen das Volumen der CCR7^{-/-}-Milzen stark variierte. Damit war der Vergleich von Milzen der CCR7^{-/-}-Mäuse stark abhängig von der Variabilität der individuellen Milzen, wobei die Milz der CCR7^{-/-}-Mäuse stets größer war als die der wt- oder CXCR5^{-/-}-Mäuse.

Im Vergleich zu Puffer-behandelten Tieren veränderte sich nach Behandlung mit FTY720 die Gesamtzahl aller Leukozyten in der Milz von Wildtyp-, CCR7^{-/-}- und CXCR5^{-/-}-Mäusen nicht signifikant. Es gibt eine geringe Tendenz zur Abnahme der Leukozytenzahl nach FTY720-Administration in den CCR7^{-/-}-Mäusen und eine Tendenz zur Zunahme in CXCR5^{-/-}-Mäusen. Nach 6stündiger Behandlung mit FTY720 gab es keine signifikante Veränderung der Zahl der T-Zellen (11 %) und B-Zellen (19 %) in Milz der Wildtyp-Mäuse (Abb. 33). Das FTY720-

induzierte *homing* von Lymphozyten in die Milz ist nach 6 Stunden nicht sehr ausgeprägt und hatte daher vermutlich keinen Einfluß auf B- oder T-Zellen.

In der Milz von CCR7^{-/-}-Mäusen hingegen nahm die T-Zellzahl (48 %) nach 6stündiger Behandlung mit FTY720 ab, wohingegen der B-Zellanteil (1 %) weitgehend konstant blieb (Abb. 33). Das bedeutet, daß verstärkt CD3-positive T-Zellen, vor allem CD4-positive T-Zellen (48 %), aus der Milz wanderten bzw. nicht zurückgehalten wurden und damit die CD3⁺CCR7^{-/-}-Zellzahl abnahm.

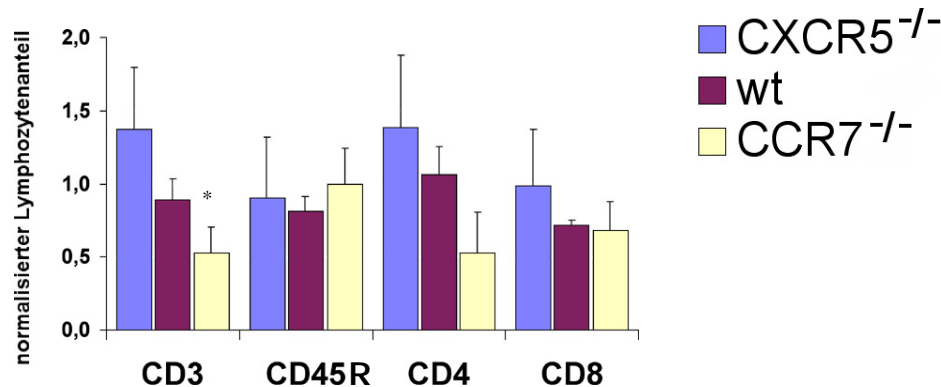


Abb. 33: Einfluß von FTY720 auf verschiedene Lymphozytenpopulationen in der Milz von Wildtyp-, CXCR5^{-/-}- und CCR7^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist der relative Anteil von Zellpopulationen in der Milz nach 6 Stunden Inkubation mit FTY720 im Vergleich zu Puffer-behandelten Tieren (Kontrolltieren). Die Ergebnisse sind auf die Messung Puffer-behandelter Tiere normalisiert (=1). Der Quotient errechnet sich für die verschiedenen Zellpopulationen aus FTY720- und Puffer-behandelten Tieren (wie im Kapitel 4.14.2 berechnet). Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Puffer- und FTY720-behandelten Tieren errechnet. Sofern sich p-Werte von ≤0,05 ergaben, sind diese mit einem Stern markiert.

Bei CXCR5^{-/-}-Mäusen war zu beobachten, daß vor allem die Zahl der CD4-positiven T-Zellen (Faktor 1,38) leicht zunahm, wohingegen sich die B-Zellzahl durch FTY720 sowohl im Wildtyp-, als auch in den CXCR5^{-/-}-Mäusen nicht veränderte (Abb. 33). Vermutlich wird durch FTY720 die Migration von B-Zellen in die Milz inhibiert oder die T-Zell-abhängige Infiltration verstärkt.

5.1.1.2 *Veränderte FTY720-induzierte Homöostase in den Lymphknoten*

In den brachialen (BLN) Lymphknoten von CCR7^{-/-}-Mäusen war die Zahl der Leukozyten im Vergleich zu Wildtyp- und CXCR5^{-/-}-Mäusen reduziert. Da die Größe sowie die Anzahl der axilären Lymphknoten (ALN) in CCR7^{-/-}-Mäusen reduziert war, wurde die Analyse für periphere LN an Hand des BLNs vollzogen. In einer Vergleichsstudie von Ansel *et al.* (2001) wurde beobachtet, daß die Zahl der BLN in CXCR5^{-/-}-Mäusen reduziert ist; dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden (8 von 9 Tieren besaßen beide BLNs).

Homöostase im mesenterialen Lymphknoten

Im Vergleich zu Puffer-behandelten Tieren veränderte sich nach Behandlung mit FTY720 die Gesamtzahl aller Leukozyten in den mesenterialen Lymphknoten (MLN) der Wildtyp- und CXCR5^{-/-}-Mäuse nicht signifikant, nur in den CCR7^{-/-}-Mäusen war eine Reduzierung der Zellzahl um fast 50 % zu beobachten. Dennoch gibt es eine geringe Tendenz zur Abnahme der Leukozytenzahl nach FTY720-Administration in den Wildtyp-Mäusen und eine Zunahme in CXCR5^{-/-}-Mäusen.

Nach 6stündiger Behandlung mit FTY720 veränderte sich die Zahl der T-Zellen und B-Zellen in den MLN der Wildtyp-Tiere nicht signifikant.

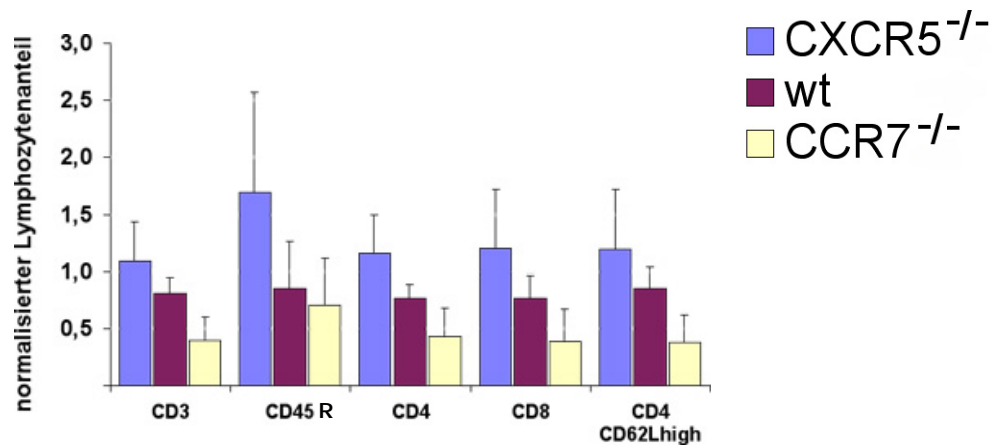


Abb. 34: Einfluß von FTY720 auf verschiedene Lymphozyten-Populationen im superior mesenterialen Lymphknoten (MLN) von Wildtyp-, CXCR5^{-/-}- und CCR7^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist der relative Anteil von Zellpopulationen nach 6 Stunden der oralen Injektion mit FTY720 im Vergleich zu Puffer-behandelten (Kontrolltieren) Tieren (wie im Kapitel 4.14.2 berechnet). Die Ergebnisse sind auf die Messung Puffer-behandelter Tiere normalisiert (=1). Der Quotient errechnet sich für die verschiedenen Zellpopulationen aus Puffer- und FTY720-behandelten Tieren. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Tieren pro Puffer- oder FTY720-Behandlung errechnet. Sofern sich p-Werte von $\leq 0,05$ ergaben, sind diese mit einem Stern markiert.

In CXCR5^{-/-}-Mäusen blieb die T-Zellzahl nach FTY720-Gabe unverändert. Im Gegensatz dazu sammelten sich nach Behandlung mit FTY720 B-Zellen (Faktor 1,7) im MLN an.

In CCR7^{-/-}-Mäusen machte sich der *homing*-Defekt für B- und in stärkerem Maße noch für T-Zellen bemerkbar, da der Anteil an T-Zellen nach Behandlung mit FTY720 abnahm (Abb. 34).

Homöostase in den brachialen Lymphknoten

Im Vergleich zu Puffer-behandelten Tieren, erhöhte sich nach Behandlung mit FTY720 die Gesamtzahl aller Leukozyten in den brachialen Lymphknoten (BLN) von Wildtyp- und CCR7^{-/-}-Mäusen, jedoch nicht in den BLN der CXCR5^{-/-}-Mäuse. Tatsächlich reduzierte sich in den BLN von CXCR5^{-/-}-Mäusen sogar die Leukozytenzahl nach Behandlung mit FTY720.

In Wildtyp-Mäusen kam es nach Behandlung mit FTY720 wie in den CCR7^{-/-}-Mäusen zu einer gleichmäßigen Anreicherung von B- und T-Zellen im BLN, wobei die Ansammlung für

B- und T-Zellen in CCR7^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen vermindert war (Abb. 35). In den Wildtyp-Tieren induzierte FTY720 das *homing* von T- (Faktor 2,2) und B-Zellen (Faktor 2,6) verstärkt in die BLN. Interessanterweise zeigte sich bei den CXCR5^{-/-}-Mäusen ein drastischer Migrationsdefekt nach 6 h der oralen FTY720-Gabe, unabhängig von der T- und B-Zellpopulation, so daß sich der Anteil an B- und T-Zellen nach Behandlung mit FTY720 stark verringerte (Abb. 35).

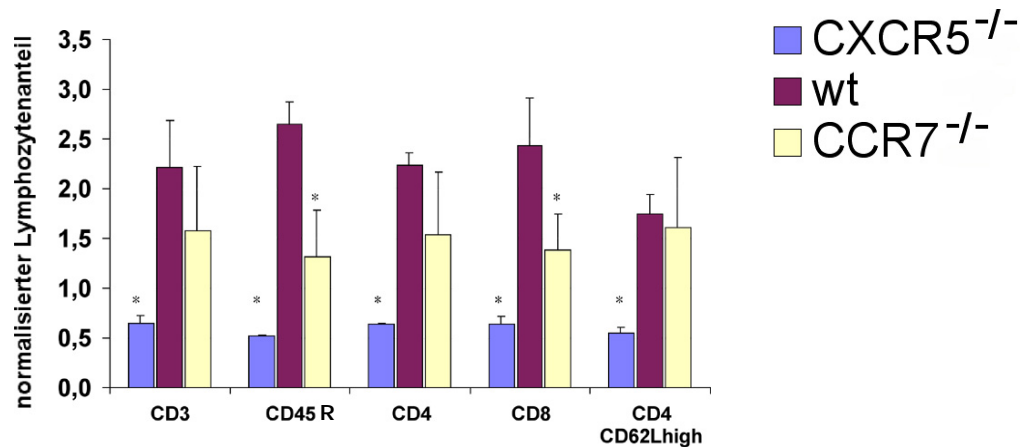


Abb. 35: Einfluß von FTY720 auf verschiedene Lymphozyten-Populationen in die brachialen Lymphknoten (BLN) von Wildtyp-, CXCR5^{-/-}- und CCR7^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist der relative Anteil von Zellpopulationen nach 6 Stunden der oralen Injektion mit FTY720 im Vergleich zu Puffer-behandelten (Kontrolltieren) Tieren (wie im Kapitel 4.14.2 berechnet). Die Ergebnisse sind auf die Messung Puffer-behandelter Tiere normalisiert (=1). Der Quotient errechnet sich für die verschiedenen Zellpopulationen aus Puffer- und FTY720-behandelten Tieren. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Tieren pro Puffer- oder FTY720-Behandlung errechnet. Sofern sich p-Werte von $\leq 0,05$ ergaben, sind diese mit einem Stern markiert.

Damit ist die FTY720-induzierte Migration peripherer Lymphozyten in die BLNs der CXCR5^{-/-}-Mäuse gestört. Entweder wurde die FTY720-induzierte Infiltration des BLNs durch das Fehlen von CXCR5 auf B- und T-Zellen blockiert oder B- und T-Zellen konnten nicht im Organ zurückgehalten werden, so daß diese wieder in den Blutkreislauf eingeschleust wurden. In CCR7^{-/-}-Mäusen konnte gezeigt werden, daß die Zellzahl von B- (Faktor 1,3) und T-Zellen (Faktor 1,6) in den BLN nach Behandlung mit FTY720 zunahm, dennoch war die Zunahme abgeschwächer als in den FTY720-behandelten Wildtyp-Mäusen (Abb. 35). FTY720 war somit in der Lage, auch unabhängig von CCR7 die Migration in den BLN zu steuern. Jedoch scheint FTY720 keinen Einfluß auf die Migration von Gedächtniszellen (CD3⁺CD62L^{low}CD45RB^{low}), sowohl in den Wildtyp- als auch CCR7^{-/-}-Mäusen (Daten nicht gezeigt).

5.1.1.3 *Veränderte FTY720-induzierte Homöostase in den Peyer'schen Plaques*

Die Analyse der Peyer'schen Plaques (PP) aus CCR7^{-/-}-Mäusen wurde dadurch erschwert, daß die Struktur der Anlage in CCR7^{-/-}-Mäusen stark verkleinert war. Die Gesamtanzahl der PP-Anlagen war in CXCR5^{-/-}-als auch CCR7^{-/-}-Mäusen insofern eingeschränkt, als die Tiere

oftmals nicht mehr als drei PP-Anlagen aufwiesen. Für diese Ergebnisse wurden immer 3 PPs eines Tieres gepoolt und in der FACS-Analyse ausgewertet.

Im Vergleich zu Puffer-behandelten Tieren erhöhte sich nach Behandlung mit FTY720 die Gesamtzahl aller Leukozyten in den PPs von Wildtyp- und CXCR5^{-/-}-Mäusen, wohingegen dieser Effekt bei den CCR7^{-/-}-Mäusen ausblieb (Daten nicht gezeigt).

In den Wildtyp-Tieren nahm die Zahl der B- (Faktor 2,5) und T-Zellen (Faktor 2,3) nach FTY720-Administration in PPs gleichmäßig zu. Vor allem naive CD4-positive T-Zellen (CD4⁺CD62L^{high}) infiltrierte nach Behandlung mit FTY720 die PPs (Faktor 7) (Abb. 36).

In CXCR5^{-/-}-Mäusen war diese Infiltration für die CD3- (Faktor 1,8) und B-Zellen (Faktor 1,6) vergleichbar mit den Wildtyp-Tieren, wohingegen die PPs nach FTY720-Administration von naiven T-Zellen (CD4⁺CD62L^{high}) nicht mehr so stark infiltrierte wurden (Faktor 1,5) (Abb. 36).

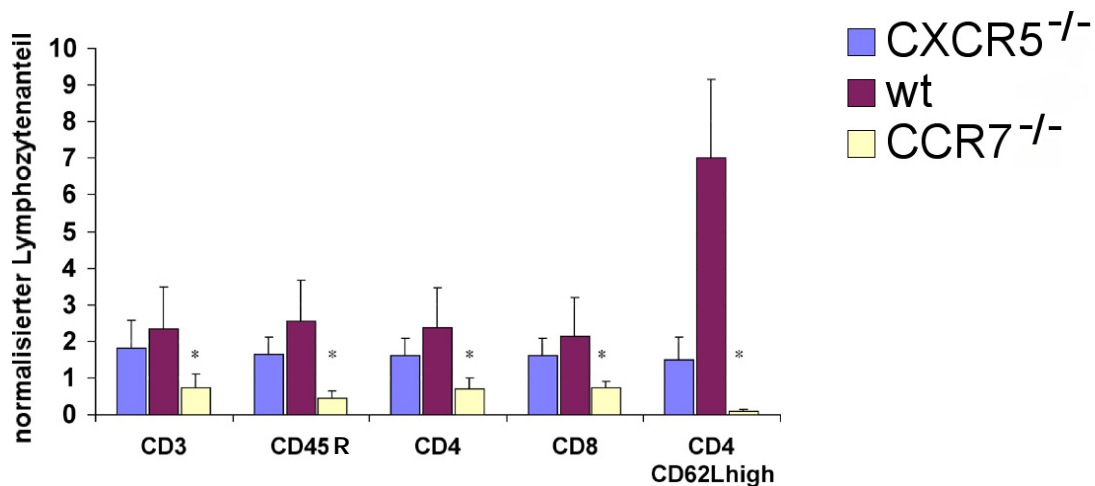


Abb. 36: Einfluß von FTY720 auf verschiedene Lymphozyten-Populationen in die Peyer'schen Plaques (PP) von Wildtyp-, CXCR5^{-/-}- und CCR7^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist der relative Anteil von Zellpopulationen 6 Stunden nach der oralen Injektion mit FTY720 im Vergleich zu Puffer-behandelten (Kontrolltieren) Tieren (wie im Kapitel 4.14.2 berechnet). Die Ergebnisse sind auf die Messung Puffer-behandelter Tiere normalisiert (=1). Der Quotient errechnet sich für die verschiedenen Zellpopulationen aus Puffer- und FTY720-behandelten Tieren. Die Standardabweichung wurde aus den Ergebnissen von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Tieren pro Puffer- oder FTY720-Behandlung errechnet. Sofern sich p-Werte von ≤0,05 ergaben, sind diese mit einem Stern markiert.

In den CCR7^{-/-}-Mäusen ist das FTY720-induzierte *homing* von T- und B-Zellen soweit reduziert, daß die Zahl der B- (42 %) und T-Zellen (78 %) geringer ist als im Vergleich zu Puffer-behandelten Tieren. Vor allem wurde die FTY720-induzierte Infiltration von naiven T-Zellen in den PPs in den CCR7^{-/-}-Mäusen auf 9 % reduziert. Damit ist die FTY720-induzierte Migration peripherer Lymphozyten in die PPs der CCR7^{-/-}-Mäuse gestört.