

## 6 Diskussion

Im folgenden wird die Rolle von CCR7 und seiner Liganden für die organspezifische Metastasierung genetisch modifizierter Brustkrebszellen diskutiert. Im zweiten Teil der Diskussion wird evaluiert, welche Bedeutung die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5 für die durch das immunmodulierende Molekül FTY720 induzierte Lymphopenie und Akkumulation peripherer Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen haben.

### 6.1 Funktionalität des Rezeptors CCR7

Die biochemische und funktionelle Analyse des auf verschiedenen Zelllinien ektopisch exprimierten Rezeptors CCR7 *in vitro* gab weitere Aufschlüsse über strukturelle und funktionelle Eigenschaften des Rezeptors. Diese molekularen Grundlagen bildeten wiederum die Basis für ein besseres Verständnis der biologischen Eigenschaften des ektopisch exprimierten CCR7 auf der Brustkrebszelllinie MDA-MB435S1 *in vivo*.

#### *Glykosylierung von CCR7*

CCR7 besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsmotive, das erste im N-Terminus und das zweite in der extrazellulären Domäne III. Es bestand daher die Vermutung, daß die drei in SDS-Gelen sichtbaren Banden (Abb. 11) unterschiedlich glykosylierte Formen des Rezeptors darstellen. In der Regel werden Chemokinrezeptoren, wie beispielsweise CXCR4 (Chabot et al., 2000) und CXCR5 (Emrich et al., 1994), durch O- oder N-Glykosylierung posttranslational modifiziert. Die N-Glykosylierung kann entweder durch Substitutionsmutanten oder durch die Behandlung mit Inhibitoren der N-Glykosylierung, wie dem Antibiotikum Tunicamycin, analysiert werden. Es zeigte sich, daß dem Rezeptor (34 kDa) tatsächlich unterschiedlich stark Zuckerreste angeheftet wurden (Abb. 11), da die Glykosylierung des Rezeptors durch eine Behandlung mit Tunicamycin blockiert wurde. Von den beiden unterschiedlich stark glykosylierten Formen des Rezeptors wurde die 36 kDa CCR7-Form in der Mehrzahl der Experimente nur in geringer Menge nachgewiesen, so daß sie wahrscheinlich eine Zwischenform darstellt.

Für die aus der cDNA abgeleitete Proteinsequenz von CCR7 inklusive des potentiellen Signalpeptids ergibt sich eine Molmasse von 42,8 kDa; für CCR7 ohne das Signalpeptid eine von 38,8 kDa (Burgstahler et al., 1998). Möglicherweise läuft CCR7 in SDS-Gelen auf einer Höhe von ca. 34 kDa, da das putative Signalpeptid von CCR7 abgespalten wurde.

#### *Internalisierung von CCR7*

Die Signalstärke von Chemokinen kann über verschiedene Mechanismen auf Rezeptorebene reguliert, beispielsweise über das Expressionsniveau oder die Internalisierung des Rezeptors, werden. Für eine Reihe von Chemokinrezeptoren bietet die Agonisten-abhängige Internalisierung

sierung der Rezeptoren die Möglichkeit, sowohl die durch extrazelluläre Liganden induzierte Signalstärke bzw. -dauer zu regulieren als auch im Zusammenhang mit der Endozytose intrazelluläre Signale weiterzuleiten. Die Bindung von Agonisten an Chemokinrezeptoren induziert in der Regel eine Desensitivierung der Zellen gegenüber der Stimulation mit dem Agonisten, indem die Rezeptoren zunächst phosphoryliert und dann internalisiert werden. Die Chemokinrezeptoren werden von verschiedenen intrazellulären Serin/Threonin-Kinasen wie der GPCR-Kinase (GRK), und der Proteinkinase C (PKC), oder durch Tyrosin-Kinasen wie der Januskinase (JAK) an den entsprechenden Aminosäuren des Rezeptors phosphoryliert, woraufhin der Rezeptor mit dem Liganden internalisiert wird. Allerdings wurde auch gezeigt, daß Phosphorylierungs-defiziente Mutanten nach Liganden-Bindung internalisiert werden können. Diesbezüglich wird diskutiert, ob die Internalisierung über Membranstrukturen wie Caveolae oder Clathrin-Vesikel erfolgt (Haribabu et al., 1997; Krasel et al., 2001; Le et al., 2001; Mellado et al., 1998; Mokros et al., 2002; Palczewski, 1997; Pronin und Benovic, 1997; Signoret et al., 1998; Vila-Coro et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß CCR7 (sowohl endogen wie ektopisch exprimiert) nach Stimulation durch CCL19, nicht aber nach Stimulation durch CCL21, innerhalb weniger Minuten internalisiert wird (Abb. 12 und 13). Diese Ergebnisse wurden durch Bardi *et al.* (2001) bestätigt. Möglicherweise spielt der verlängerte positiv-geladene C-Terminus von CCL21 für die unterschiedlichen Aktivitäten von CCL19 und CCL21 in bezug auf die Internalisierung von CCR7 eine Rolle (Ueno et al., 2002). Zudem wurde gezeigt, daß CCL21 über diesen C-Terminus CCL21 stärker als CCL19 an Heparin bindet. Eventuell wird CCL21 aufgrund seiner Heparin-bindenden Eigenschaften stärker an GAGs auf Endothelzellen (*in vivo*) oder auf den Zelllinien (*in vitro*) gebunden, so daß das auf der Zelloberfläche gebundene CCL21 wahrscheinlich nicht internalisiert werden kann (Hirose et al., 2002; Hirose et al., 2001; Capila und Linhardt, 2002; Olson und Ley, 2002)

Eine interessantere Erklärungsmöglichkeit, die die unterschiedlichen Internalisierungspotentiale von CCL19 oder CCL21 erklären können, ist die unterschiedlich starke Phosphorylierung von CCR7 nach Stimulation mit CCL19 oder CCL21. Eine 5minütige Stimulation von Tumorzellen (MDA-MB4345S1 CCR7 Klon 1), die ektopisch CCR7 exprimierten, mit rekombinantem CCL19 induzierte sowohl eine starke Phosphorylierung als auch Internalisierung von CCR7 (Abb. 12, 13 und 14). In MDA-MB435S1- und Jurkat-Zellen, die ektopisch CCR7 exprimierten, war nach 5minütiger Stimulation mit CCL21 lediglich eine schwache Phosphorylierung von CCR7 zu beobachten (Abb. 14), die jedoch keine signifikante Internalisierung von CCR7 induzierte (Abb. 12; für Jurkat-Zellen sind die Daten nicht gezeigt).

Der Rezeptor zeigte eine zeitabhängige und kontinuierliche, von CCL19 abhängige Internalisierung, die durch PKC-Inhibitoren blockiert werden konnte (Abb. 13). Vermutlich induziert die Bindung von CCL19 an CCR7 eine Phosphorylierung der C-terminalen PKC-abhängigen Phosphorylierungsstelle. Die CCL19-induzierte Internalisierung von CCR7 war auf stabil exprimierenden MDA-MB435S1- (Abb. 13a) und CMLT1-Zellen (Abb. 13b)

partiell, auf peripheren CD4- und CD8-positiven Zellen (Abb. 13c) hingegen stark mit Chelerythrin Chlorid inhibierbar, wohingegen Bis I nur die CCL19-abhängige Internalisierung schwach inhibierte. Die Unterschiede in der Effizienz der Blockierung der CCL19-induzierten Internalisierung (Abb. 13) könnte damit erklärt werden, daß beide PKC-Inhibitoren unterschiedliche PKC-Formen inhibieren. Chelerythrin Chlorid wirkt unspezifisch auf alle PKC-Formen, wohingegen Bis I die PKC- $\beta$ , - $\gamma$ , - $\mu$  und - $\eta$  nicht inhibiert (Eckly-Michel et al., 1997; Herbert et al., 1990; Herbert et al., 1993). Möglicherweise sind die durch den Inhibitor Bis I nicht betroffenen PKC-Formen für die Internalisierung verantwortlich. Inhibitoren für andere intrazelluläre Effektormoleküle, z.B. für PI3-Kinasen (Wortmannin, Ly294002), cAMP-Kinasen (DRB) oder Tyrosin-Kinasen (AG490) bewirkten keine Inhibition der Internalisierung von CCR7 (Abb. 13a und b).

Kritisch für die Inhibierung der PKC ist aber auch, daß in einer Reihe von Tumorentitäten, wie z.B. Brustkrebs, die PKC überexprimiert wird oder eine erhöhte Aktivität hat (Carey et al., 1999; Gordge et al., 1996; Jarzabek et al., 2002; Sliva et al., 2002). So war auch die Basalphosphorylierung von CCR7, die wahrscheinlich auf erhöhte Aktivität von PKC zurückzuführen ist, in der Brustkrebszelllinie MDA-MB435S1 (Abb. 14) stärker als in den Jurkat-Zelllinie (Gordge et al., 1996; Sliva et al., 2002). In Abb. 13a und b konnte gezeigt werden, daß der PKC-Inhibitor Chelerythrin Chlorid die CCL19-induzierte Internalisierung nicht vollständig inhibieren konnte, wahrscheinlich weil die Aktivität von PKC in den Tumorzellen (MDA-MB435S1 und CMLT-1) nicht vollständig blockiert wurde.

Die Aktivierung von PKC erfolgt jedoch nicht nur durch Chemokine, sie kann vielmehr auch durch viele Oberflächenmoleküle gesteuert werden. Dennoch zeigte sich, daß die Aktivierung von PKC für verschiedene Funktionen von CCR7 wichtig ist, wie zum Beispiel die gerichtete CCR7-vermittelte Migration (Abb. 20), die CCL19-abhängige Internalisierung (Abb. 13), die Aktivierung von Elk-1 (Abb. 7) und die PMA-induzierte Modulation der Oberflächenexpression (Abb. 14). Die PKC-induzierte Hochregulation der Expression von CCR7 könnte ein weiterer Hinweis auf den Mechanismus geben, wie die Expression auf verschiedenen Lymphomen und Tumoren reguliert wird. In diesem Zusammenhang könnte die Hochregulation von CCR7 auf verschiedenen Karzinomen, Lymphom-, Leukämie- und Hodgkin-Zellen vermutet werden. Auf Promotorebene kann die Expressionsstärke von CCR7 z.B. über konstitutive NF- $\kappa$ B-Aktivität (Höpken et al., 2002; Schweickart et al., 1994) oder über Ets-1-, Lef-1- bzw. AP-1-Aktivität, die während lymphoider Entwicklung und Differenzierung eine Rolle spielen (Burgstahler et al., 1995; Fitzsimmons und Hagman, 1996) reguliert werden. Es wurde bereits gezeigt, daß der CCR7-Promotor verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren besitzt, wie z.B. AP-1 (Burgstahler et al., 1995). Die PKC wiederum aktiviert in Brustkrebszellen über AP-1-Transkriptionsfaktoren verschiedene Gene, wie es auch z.B. für CXCL8 und VEGF gezeigt wurde (Kolch et al., 1995; Röbuck, 1999; Sliva et al., 2002).

### *CCR7-abhängige Signaltransduktion*

Für verschiedene GPCRs wurde gezeigt, daß die Internalisierung essentiell für die Aktivierung von ERK2 ist (Daaka et al., 1998). Die CCL19-induzierte Internalisierung (Abb. 12) und Desensitivierung über Phosphorylierung von CCR7 (Abb. 14) korrelierte dabei mit der Beobachtung, daß ERK2 nach Stimulation mit CCL19 nur kurzzeitig, für etwa 2 min, phosphoryliert wird (Tilton et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurde die 30minütige Aktivierung der ERK2 in ektopisch CCR7-exprimierenden HEK293-Zellen beschrieben (Sullivan et al., 1999). Diese lang anhaltende Aktivierung von ERK2 könnte die Folge einer fehlenden Desensitivierung durch Phosphorylierung und Internalisierung sein.

Bei Verwendung des „*Elk-1 TransReporting System*“ Assays konnten keine Aussagen über die Dauer der ERK1/2-Phosphorylierung gemacht werden, da keine zeitliche Auflösung der Messwerte möglich ist. Aufgrund der hohen Basalaktivität von ERK1 und 2 in MDA-MB435S1-Zellen war es zudem nicht möglich die Stimulation von CCR7 mit spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK1/2 im Western Blot zu untersuchen. Mit den hier verwendeten Zelllinien konnte im Internalisierungs-Assay (CCR7-exprimierende MDA-MB435S1- und CMLT-1-Zellen) und Elk-1-Assay (CHO-K1- und Jurkat-Zellen) nur analysiert werden, inwieweit sich Inhibitoren entweder auf die CCL19-vermittelte Internalisierung (Abb. 13) oder Elk-1-Aktivierung (Abb. 7) auswirken. Im Gegensatz zur Liganden-induzierten Aktivierung von Elk-1 ist die PKC-abhängige Aktivierung in CCR7-exprimierenden Jurkat-Zellen unabhängig von der Wahl der Liganden (Abb. 7a). Damit scheint die Internalisierung von CCR7 nicht notwendigerweise an die Aktivierung von ERK2 gekoppelt zu sein (Sullivan et al., 1999). Anders als bei CCR7 wird CXCR4 auf T-Zellen, nach Stimulation durch CXCL12 internalisiert und induziert gleichzeitig eine langandauernde Aktivierung von ERK2 (Tilton et al., 2000). Ein verlängertes ERK-Signal könnte vielleicht auch erklären, warum die Überexpression von CXCR4 oder CCR7 vielfach mit erhöhter Malignität des Primärtumors assoziiert wird. Die Aktivierung der Januskinase JAK2 über CCR7 könnte z.B. ein weiterer Mechanismus für die verlängerte CCL21-abhängige Aktivierung von ERK2 sein (Rane und Reddy, 2002; Stein et al., 2002; Vila-Coro et al., 1999). Die synergistische Aktivierung von unterschiedlichen GPCRs oder *cross talk* mit Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) könnte ebenfalls für die verlängerte CCL21-abhängige Aktivierung von ERK2 verantwortlich sein (Lowe et al., 2002).

### *Interaktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen*

Die Einwanderung in bestimmte Organe und Gewebe unterscheidet sich für die verschiedenen Zellpopulationen, insofern die Migration über ein organspezifisches Endothel beispielsweise von unterschiedlichen Chemokinen oder Adhäsionsmolekülen koordiniert und gesteuert wird (Feil und Augustin, 1998; Lin et al., 2001; Piali et al., 1998; Salvucci et al., 2002; Volin et al., 1998).

Abhängig von der Expression auf dem Endothel befindlichen Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle migrieren dendritische Zellen über die afferenten lymphatischen Gefäße

in periphere Lymphknoten ein. Hingegen wandern beispielsweise naive B- und T-Zellen über CXCR5 und CCR7 über HEVs der Lymphknoten ein. Für die T<sub>CM</sub>-Gedächtnis-Zellen wird vermutet, daß sie aufgrund der Expression von CCR7 und CD62L (L-Selektin) den Lymphknoten (wie die naiven T-Zellen) über die HEVs infiltrieren. Daß nach Agonisten-abhängiger Stimulation von CCR7 die *in vivo* und *in vitro* Migration und die Aktivierung der Integrine von CCR7-exprimierenden Zellen über Pertussis-Toxin inhibiert werden kann, konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen dokumentiert werden (Henning et al., 2001; Kim et al., 1998; Pachynski et al., 1998; Sullivan et al., 1999). Es konnte aber noch nicht gezeigt werden, daß CCR7 ebenfalls die MAPK-Stimulation über einen G $\alpha$ i-abhängigen Signalweg (Abb. 7a) aktivieren kann, auch unabhängig von der Ligandenwahl, CCL19 oder CCL21 (Girard und Springer, 1995b; Sallusto et al., 1999a). Für die MDA-MB435S1 konnte kein endogenes CD62L-Molekül weder auf der Oberfläche (Abb. 9) noch intrazellulär nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), so daß vermutet werden kann, daß CCR7-exprimierende Tumorzellen die LN über die afferenten Lymphbahnen infiltrieren und nicht über die HEVs.

Zu den Proteinen, die Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen regulieren, gehören die Familien der Integrine, Cadherine, Selektine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie) und die Leucin-reichen Glykoproteine. Die feste Adhäsion von Lymphozyten an das Endothel der HEVs sekundärer lymphatischer Organe wird meist über Mitglieder der Ig-Superfamilie vermittelt. Zu dieser Familie gehören nicht nur die Haupthistokompatibilitätskomplexe I und II, sondern auch CD54 und CD155. Mitglieder der Ig-Superfamilie sind damit nicht nur für die Zell-Erkennung, sondern auch an der Zell-Adhäsion beteiligt (Newman und Albelda, 1992). Auf den MDA-MB435S1-Zellen wurden verschiedene Adhäsionsmoleküle aus der Familie der Ig-Superfamilie in FACS-Analysen nachgewiesen, dazu gehören CD155 und CD54 (ICAM-1) (Abb. 9). Für CD155 ist jedoch nicht bekannt, welche Relevanz diesen Molekülen bei der Interaktion zwischen Endothel und Tumorzelle *in vivo* zukommt. Es wird auch diskutiert, welche Rolle der Expression von CD54 auf malignen Brustkarzinom-Zellen zukommt, ferner ist die Relevanz der löslichen ICAM-Moleküle sICAM-1 im Serum und ihrer Expression auf der Oberflächen auf Tumoren *in vivo* noch nicht endgültig geklärt (Buras et al., 2000; Ogawa et al., 1998; Regidor et al., 1998; Zhang und Adachi, 1999). CD54 und CD155 werden auf den meisten adhären Zellen in Zellkultur hoch exprimiert (eigene Beobachtung). Im Zusammenhang der EMT und Metastasenbildung ist die Funktion des CD155 Rezeptors interessant, da das morphogene Signalmolekül *Sonic Hedgehog* die Expression von CD155 regulieren kann und ebenfalls wie CD155 während der Embryonalentwicklung in mesenchymalen Geweben exprimiert wird (Hay, 1995; Solecki et al., 2000; Solecki et al., 2002). Diese Src-Kinasen werden mit Veränderungen der Zellmorphologie, einschließlich der malignen Transformation, und mit der Modulation der interzellulären Adhäsion in Zusammenhang gebracht. Da G $\beta\gamma$ -Komplexe ebenfalls Signalwege (Lemmon et al., 1996) über Tyrosinkinasen wie c-Src oder die c-Src-verwandten Kinasen Fyn, Lyn und Yes (Luttrell et al., 1996), Syk (Pachynski et al., 1998) oder Pyk2 (Lev

et al., 1995) aktivieren (Abb. 1), liegt die Vermutung nahe, daß eine konstitutive autokrine Stimulation eines Chemokinrezeptors die EMT über Src induzieren kann (Boyer et al., 2002). Dabei aktivieren Src-Kinasen nicht nur Ras, sondern auch die *focal adhesion* Kinase (FAK) (Bacon et al., 1995; Ganju et al., 1998; Sullivan et al., 1999; Wang et al., 2000). Bezüglich der Aktivierung von Src nach Stimulation von CCR7 liegen keine Daten vor, aber Liganden-Bindung an CCR7 führte zur Stimulation von G $\alpha$ i (Abb. 7a) und FAK (Daten nicht gezeigt). Da die Zellkomponenten CD155 als auch der Ligand Fibronectin (G. Bernhardt, persönliche Mitteilung) von verschiedenen Tumorzellen (G. Bernhardt, persönliche Mitteilung) exprimiert werden (Lange et al., 2001; Ridley et al., 1992), kann vermutet werden, daß die Expression des Fibronectin-bindenden CD155 auf Tumorzellen, wie es bereits für die Expression von  $\alpha$ v $\beta$ 3 Integrinen auf malignen Melanomen gezeigt wurde, den Prozeß der Metastasenbildung beeinflussen (Albelda und Buck, 1990; Natali et al., 1997).

Epithelzellen, die im Zuge der Transformation bzw. EMT mesenchymale Eigenschaften erwerben, zeichnen sich vor allem durch ein verändertes Adhäsionsverhalten aus. Diese Transformation zeigt sich, indem wie bei Mesenchymzellen eine verstärkte Expression von Vimentin auftritt (Hendrix et al., 1996). Die stabil CCR7- und CCL19- oder CCL21-koexprimierenden MDA-MB435S1-Zellen zeigten im Vergleich zu CCR7-exprimierenden Zellen *in vitro* eine erhöhte Expression von Vimentin (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wirkte die konstitutive Aktivierung von CCR7 über autokrin-wirkende CCR7-Liganden in der Zellkultur transformierend im Sinne einer EMT auf die Zelle.

Chemokine sind nach Rezeptorbindung auf Lymphozyten in der Lage, andauernde Adhäsion zu vermitteln, indem sie die Affinität von Integrinen durch Konformationsänderungen oder die Avidität von Integrinen durch *cluster*-Bildung erhöhen. Die Aktivierung der Integrine für eine feste Adhäsion an das Endothel kann neben den Chemokinen (Butcher, 1991; Oppenheim et al., 1991; Schall und Bacon, 1994), auch durch Zytokine (Schor, 1994), oder dem Komplementfaktor C5a (Gerard und Gerard, 1991) vermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Stimulation von CCR7 auf Lymphozyten  $\alpha$ 4 und  $\alpha$ L $\beta$ 2 (z.B. LFA-1) Integrine aktiviert (Pachynski et al., 1998; Stein et al., 2000). Zudem wurde gezeigt, daß die Expressionsstärke sowohl von CCR7 als auch von  $\alpha$ 4-Integrin auf chronischen lymphatischen Leukämie-Zellen (CLL), die den Lymphknoten frequentiert infiltrieren, erhöht war, und daß deren Migration *in vitro* über anti- $\alpha$ 4-Antikörpergabe blockiert werden kann (Till et al., 2002). Da Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren den Prozeß der Infiltration oder TEM koordinieren können, lag die Vermutung nahe, daß die autokrine Stimulation von CCR7 auf den Tumorzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen und damit die Migration beeinflußt. Möglicherweise führt eine autokrine Stimulation von CCR7 ebenfalls zur konstitutiven Aktivierung von Integrinen und damit zu einer verstärkten Integrin-vermittelten Adhäsion. Dies würde zur Folge haben, daß die Zellen auf einen folgenden Stimulus oder Gradienten von CCR7-Liganden entweder de- oder sensibilisiert sind. Eine endogene Koexpression der Tumorzellen von CCL21 oder CCL19 könnte die Chemokine-Konzentration an den GAGs auf der Tumorzelloberfläche erhöhen, so daß die Zelle verstärkt

zur Migration stimuliert wurde. Andererseits könnten CCR7-CCL19-koexprimierende Zellen den Liganden bereits intrazellulär binden, wodurch möglicherweise eine schnelle autokrine Aktivierung von Integrinen initiiert werden kann. Für eine Erklärung der verstärkten migratorischen Aktivität auf exogene CCR7-Stimulation von CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21-koexprimierenden Tumorzellen kommen speziell im Migrations-Assay in der Boyden-Kammer Integrine in Frage, die das Kollagen IV auf der Polykarbonatmembran der Boyden-Kammer binden. Deren Expression war aber gegenüber untransfizierten Zellen nicht auf den koexprimierenden Zellen verändert (Abb. 21). Die Konformationszustände der heterodimeren Integrine ließen sich jedoch mit den verwendeten Antikörpern nicht unterscheiden. Es wurde für hämatopoetische Tumorzellen wie die ATL-Zellen, die den Rezeptor CCR5 und den Liganden CCL4 koexprimieren, gezeigt, daß die konstitutive Stimulierung von CCR5 die Aktivierung von Integrinen verstärkt, aber dennoch keinen Einfluß auf die Integrin-Expression von  $\alpha$ L (LFA-1) selbst hat. Somit erhöhen wahrscheinlich die aktivierten Integrine die Adhäsion der Tumorzellen auf dem Endothel, so daß diese das Gewebe leichter infiltrieren können (Tanaka et al., 1998). Bei Christopherson *et al.* (2001) wurde ebenfalls untersucht, ob eine endogene Expression von CCL21 in CCR7-exprimierenden T-Zellen die Aktivierung von Integrinen beeinflusst. Im *in vitro* Adhäsions-Assays zeigte sich, daß die endogene Expression von CCL21 transgener T-Zellen und damit autokriner Stimulierung über CCR7 keine Desensitivierung der CXCR4- oder CCR7-vermittelten Integrin-Aktivierung induzierte. Über die eigentliche Aktivität der Integrine wie LFA-1 von exogen unstimulierten CCL21-transgenen T-Zellen wurden aber keine Aussagen gemacht.

#### *Generierung von Zellklonen und ihre unterschiedliche Aktivität in vitro und in vivo*

In den stabil mit CCR7-kodierenden Expressionsplasmiden transfizierten MDA-MB435S1-Zellen wird die Expression von CCR7 von einem konstitutiv-aktiven CMV-Promotor (pcDNA3-Expressionsvektor) kontrolliert. Die stabil CCR7-exprimierenden Zellen wurden wiederum mit CCL19- oder CCL21-kodierenden Vektoren oder Leerplasmid kotransfiziert, wobei die konstitutive Expression von CCL19 oder CCL21 über einen schwachen SV40-Promotor (pZeoSV40-Expressionsvektor) reguliert wird. Über die unterschiedlichen Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Selektionsgenen (pcDNA3 mit Neomycin-Resistenzgen und pZeoSV40 mit Zeocin-Resistenzgen) war es möglich auf eine Koexpression von CCR7 und einen seiner Liganden über Zeocin und G418 zu selektionieren. Zusätzlich sollte vermieden werden, daß der Transkriptionsapparat kotransfizierten Zellen einseitig durch den starken CMV-Promotor belastet wird.

Aus den Transfektionen entstanden zwei CCR7-exprimierende Zellpopulationen (CCR7 Klon 1 und CCR7-pZeo Pool), und jeweils eine Zellpopulation mit stabiler Expression von humanem CCR7 in Kombination mit humanem CCL19 (CCR7-CCL19 Klon 1, CCR7-CCL19 Klon 2 und CCR7-CCL19 Pool) oder humanem CCR7 in Kombination mit humanem CCL21 (CCR7-CCL21 Klon 1, CCR7-CCL21 Klon 2 und CCR7-CCL21 Pool).

Die Unterschiede hinsichtlich der Aktivität verschiedener Zellklone einer Zellpopulation *in vitro* und *in vivo* entstehen möglicherweise durch die zufällige Integration der Vektoren in das Genom der Zelle oder durch den Ausklonierungsvorgang an sich. Dies hat zur Folge, daß die Klone (einschließlich Pool) für verschiedene Gene unterschiedliche Expressionsprofile besitzen und damit die biologische Aktivität der Zelle verändert wird. Beispielsweise zeigte sich *in vitro*, daß die Zellklone unabhängig der Zellpopulation unterschiedliches Wachstumsverhalten in der Zellkultur hatten, das zudem zeitlich variieren konnte. In dieser Arbeit wurde damit nicht geklärt, inwieweit die autokrine Aktivierung von CCR7 über CCL19 oder CCL21 *in vitro* zu einer konstitutiven Aktivierung der Zelle führt, und somit das Proliferationsverhalten der stabilen Zellpopulationen beeinflusst wurde.

Die Stimulation mit CCL21 zeigte bei Wiley et al. (2001) unabhängig von der CCR7-Expression auf Melanomzellen keinen Einfluß auf das Wachstum der Melanomzellen *in vitro*. In dieser Arbeit ist das Wachstumsverhalten der Zellklone in Nacktmäuse nach orthotoper Applikation unterschiedlich, so daß Primärtumor unterschiedlich schnell herangewachsen sind (Tab. 1).

#### *Modulation der CCR7-vermittelten Migration von CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21 koexprimierenden Zellen in vitro und in vivo*

Ein wichtiger Aspekt beim Prozeß der Metastasierung ist die Motilität bzw. das Migrationsverhalten disseminierter Tumorzellen in das Organ, als auch innerhalb des Organs. Das Durchbrechen der Basalmembran wird durch Proteasen und Adhäsionsmoleküle gesteuert, während die Transmigration der Tumorzellen über das Endothel bei der Infiltration bzw. Invasion in spezifischer Organe durch Migration-induzierende Moleküle reguliert werden kann. Die gerichtete Migration bzw. Infiltration wird im Falle von Lymphozyten über die Stimulation von Chemokinrezeptoren koordiniert, wobei Zellen entsprechend ihres Chemokinrezeptor-Repertoires auf einen Chemokin-vermittelten hapto- oder chemotaktischen Gradienten migrieren. Stabil CCR7-exprimierende MDA-MB435S1-Zellen reagierten beispielsweise auf Stimulation mit rekombinanten CXCL12 (Daten nicht gezeigt), CCL19 oder CCL21 (Abb. 20) mit einer gerichteten Migration *in vitro* und könnten somit auch *in vivo* über murine Liganden von CXCR4 und CCR7 in bestimmte Organe gelenkt werden. Im Falle von humanen CCR7 konnte gezeigt werden, daß rekombinante murine Liganden von CCR7 *in vitro* sowohl einen Kalzium-Influx in humanen CCR7-exprimierenden MDA-MB435S1-Zellen (Daten nicht gezeigt), als auch Elk-1 im MAPK-Assay (Abb. 7) aktivieren. Unter Zuhilfenahme der Ergebnisse aus den *in vitro* Migrations-Assays und den Kurzzeitmigrationsexperimenten *in vivo* wurde untersucht, inwieweit das Migrationsverhalten der MDA-MB435S1-Zellen durch autokrine oder parakrine Stimulation von CCR7 moduliert werden kann. Im Vergleich zu Zellen, die ektopisch nur CCR7 exprimieren, führte die Koexpression von CCR7 mit CCL19 zu einer erhöhten migratorischen Aktivität gegenüber exogenem CCL19 oder CCL21 *in vitro* (Abb. 19). Dennoch war die *in vivo* Migration adoptiv transferierter Tumorzellen, die CCR7 und CCL19 koexprimierten, zu den axillären

Lymphknoten (ALN) gegenüber untransfizierten Tumorzellen und Tumorzellen, die CCR7 oder CXCR5 alleine exprimierten, nicht signifikant verändert (Abb. 22). Für Tumorzellen die CCR7 und CCL21 ektopisch koexprimierten konnte im Falle der CCR7-vermittelten Migration *in vitro* als auch *in vivo* keine signifikante erhöhte Aktivität gegenüber Tumorzellen, die nur CCR7 exprimierten, beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21 Zellpopulationen könnten so erklärt werden, daß rekombinantes (Abb. 7,19, 27, 29) oder vom Tumor exprimiertes CCL19 (Abb. 16) stärker als CCL21 die Aktivität von humanen CCR7 induziert, oder daß die CCL21-Koexpression zum Zeitpunkt des Versuches zu niedrig war, und damit nicht verstärkend auf die Migration hätte wirken können. Dennoch muß bemerkt werden, daß *in vitro* als auch *in vivo* die migratorische Aktivität der CCR7 und CCL19 bzw. CCL21-koexprimierenden Zellpopulationen nicht desensitiviert wurde, vielmehr wirkte vor allem koexprimiertes CCL19 *in vitro* positiv modulierend auf die CCR7-vermittelte migratorische Aktivität.

Bei Bardi *et al.* (2001) konnte gezeigt werden, daß eine Präinkubation von aktivierten und frisch isolierten T-Zellen mit einer unphysiologisch hohen Konzentration von 300 nM CCL19 zu einer Desensitivierung von CCR7 führt, so daß diese Zellen weniger stark auf exogenes CCL19 migrierten. In dieser Arbeit zeigte die Zellpopulation mit einer Koexpression von CCR7 und CCL19 keine Unterschiede zu Kontrollzellen (CCR7-pZeo-Zellpopulation), weder bezüglich der CCR7-Oberflächenexpression (Abb. 21a), noch des Kalzium-Influxs (Abb. 17) und der CCL19-abhängigen Internalisierung (Abb. 18). Ein entscheidender Grund für diese Beobachtungen mag wieder in der niedrigen Expressionshöhe von CCL19 der CCR7-CCL19-Zellpopulationen liegen, die keine Desensitivierung von CCR7 induzierte. Aus den eigenen Beobachtungen im Kalzium-Assay, daß zwischen dem Kalzium-Influx-Signal und der CCR7-Expressionshöhe kein Zusammenhang besteht, und daß bei Bardi *et al.* (2001) mit CCR7-Liganden blockierte CCR7-CEM-Zellen nach einer kurzen Phase der Desensitivierung von CCR7 wieder mit Liganden restimulierbar sind, kann geschlossen werden, daß eine niedrige Koexpression von CCL19 oder CCL21 keinen desensitivierenden Einfluß auf freie CCR7 Rezeptoren hat.

Im Gegensatz zu der verstärkten Migration von CCR7-CCL19 kotransfizierten Zellen *in vitro* zeigten bei Christopherson *et al.* (2001) autokrin stimulierte T-Zellen aus der Milz und Thymus CCL21-transgener Mäuse eine reduzierte chemotaktische Antwort auf exogenes CCL19 oder CCL21. Eine hohe endogene CCL21-Expression von CCL21-transgenen T-Zellen könnte einerseits die Aktivität von CCR7 desensibilisiert, oder den für Suspensionszellen notwendigen chemotaktischen Gradienten in der Boyden-Kammer zerstört haben. Zu beachten ist zudem, daß die migratorische Antwort der CCL21-transgenen T-Zellen zwar vermindert, dennoch nicht vollständig desensitiviert wurde. Im Unterschied zu den CCL21-transgenen Mäusen bei Christopherson *et al.* (2001) sezernierten die CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21-koexprimierenden MDA-MB435S1-Zellen nur sehr geringe Mengen an CCL21 oder CCL19 (Abb. 16), so daß die Chemokinexpression wohl keinen Einfluß auf den exogenen hapto- bzw. chemotaktischen Gradienten innerhalb der Boyden-Kammer hatte.

Eine Koexpression von CCR7 und CCL19 führte ebenfalls in CHO-K1-Zellen im MAPK-Assay nach Restimulation mit exogenem CCL19 nicht zur Desensitivierung. Es scheint vielmehr, daß die Koexpression verstärkend auf eine darauf folgende Stimulation wirkte (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls weisen Ergebnisse im MAPK-Assay daraufhin, daß eine sehr hohe Konzentration (100 nM) der exogenen Liganden (CCL19 oder CCL21) die Signalstärke reduzierte (eigene Beobachtung). Somit scheint die Expressionsstärke von CCL19 bzw. CCL21 der koexprimierenden Zellen ein wichtiger Faktor für die Aktivität von CCR7 zu sein. Daß die Koexpression von CCR7 und eines seiner Liganden nicht zwangsläufig zur Desensitivierung der Aktivität von CCR7 führt, konnte auch mit LPS-stimulierten DCs gezeigt werden, die sowohl funktionellen CCR7 als auch CCL19 koexprimieren (Sallusto et al., 1998; Sallusto et al., 1999b). In Kooperation mit Martin-Fontecha und Sallusto konnte darauf folgend gezeigt werden, daß *ex vivo* LPS-stimulierte DCs aus dem Knochenmark nach Injektion in den Fußballen von Mäusen zu den Lymphknoten wanderten (Publikation eingereicht).

Bei der Auswertung der Kurzzeitmigrationsexperimente mit adoptiv transferierten Tumorzellen in BALB/c-Mäuse ist zu beachten, daß die Injektion von humanen Tumorzellen eine xenogene Transplantationsabstoßung in Form einer hyperakuten Abstoßung auslösen kann. Diese Serumantwort kann über prä-existierende Antikörper und das Komplementsystem in wenigen Minuten transferierte Tumorzellen zerstören, und somit die tatsächliche Wanderung von Tumorzellen in verschiedene Organe stark beeinflussen. Vielleicht ist dies auch der Grund, warum die Infiltration der Lunge von transferierten Tumorzellen keine Zellpopulation-spezifische Verteilung wiedergeben konnte.

*In vitro* und *in vivo* Daten im Bezug auf Migration von Tumorzellen erfüllen nicht die Vorstellung, daß die gerichtete Migration alleine durch einen chemotaktischen Gradienten gesteuert wird. Im *wound*-Assay bei Banas et al. (2002) konnte gezeigt werden, daß Mesangial-Zellen ohne chemotaktischen Gradienten gerichtet migrieren. Aus den unterschiedlichen Assays (*wound*-Assay oder Migrations-Assay) mit rekombinantem CCL21 oder CCL19 könnte die Hypothese aufgestellt werden, daß ein haptotaktischer Gradient starken Einfluß auf die Migration *in vitro* von adhären wachsenden Zellen und möglicherweise ein chemotaktischer Gradient entscheidend für die Migration von Zellen, die in Kultur in Suspension wachsen, ist.

## **6.2 Die Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR7 im Prozeß der Metastasenbildung**

Die unterschiedlichen Prozesse der Migration von Tumorzellen wie die Aktivierung von Integrinen, von Matrix-verdauenden Enzymen und die Polarisierung in Wanderungsrichtung kann über Chemokinrezeptoren reguliert werden. Die Metastasierung wiederum kann im allgemeinen als Tumorzellen-Infiltration oder Migration verstanden werden. In der hier vorgestellten Arbeit wurde ein Modell gewählt, in dem untersucht wurde, inwieweit die

Überexpression von humanem CCR7 die Migration in Organe wie Lunge und drainierende Lymphknoten der Maus dirigiert. Zudem wurde untersucht, inwieweit alleine die Überexpression von CCR7 oder in Kombination mit endogener Expression von CCL19 oder CCL21 ausreichend ist, das Metastasierungspotential von Brustkrebszellen mit kleinem Metastasierungspotential (MDA-MB435S1-Zellen) zu fördern (Meiners et al., 1998). Im Unterschied zum MDA-MB435S1 Subklon 1 ist die Zelllinie MDA-MB435 hoch invasiv und hat ein hohes Metastasierungspotential (Meiners et al., 1998)

Experimentell kann das Metastasierungsverhalten von transfizierten und untransfizierten Brustkrebszellen humanen Ursprungs in Mäusen mit unterschiedlicher Immundefizienz untersucht werden. In dieser Dissertation wurden Nacktmäuse verwendet, in denen humane Tumorzellen von Nacktmäusen nicht abgestossen wurden, so daß aus den Tumorzellen resultierende Metastasenbildung in den Organen wie ALN und Lunge untersucht werden konnte. Prinzipiell können die Tumorzellen über das angeborene Immunsystem dieser Mäuse zerstört werden, jedoch mit geringer Effizienz, so daß die MDA-MB435S1-Zellen zu Primärtumore auswachsen können. Da es sich in dieser Arbeit um eine xenogenes Transplantationsmodell in immundefizienten Mäusen handelt, ist das Modell bezogen auf die Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen eingeschränkt, weil die Tumorzellen wie auch disseminierte Zellen im immunkompetenten Organismus eine gegen sie gerichtete Immunantwort überwinden müssen. Metastasierende Zellen müßten in einem syngenem Modell beispielsweise die Funktionen von Immunzellen supprimieren (Bell et al., 1999). Zudem ist vorstellbar, daß durch den Tumor sezerniertes CCL21 und CCL19 CCR7-positive Immunzellen wie B- und DC-Zellen in den Tumor rekrutiert und eine Immunantwort verstärken. Dieser Vorgang könnte die Tumorprogression einschränken (Nomura et al., 2001). Das Metastasierungsmodell in dieser Arbeit dient damit der Untersuchung, inwieweit CCR7 das Metastierungspotential unter immunsupprimierten Bedingungen fördert. In Mausmodellen hatte die tumorspezifische Expression von murinem CCL21 insofern einen Einfluß auf das Wachstum des Tumors, daß nur murines CCL21 angiostatisch über die Bindung an CXCR3 auf das Endothelwachstum wirkt (Braun et al., 2000; Sharma et al., 2000; Vicari et al., 2000).

Bei Müller et al. (2001) wurde die Dissemination von Brustkrebszellen (MDA-MB231-Zellen) in SCID-Mäusen untersucht. Obwohl die SCID-Mäuse wie auch die Nacktmäuse aufgrund des Verlustes der humoralen und zellvermittelten Immunantwort einen Immundefekt besitzen, schreitet das Tumorstadium von MDA-MB435S1-Zellen in SCID-Mäusen in einem kürzeren Zeitraum (ein Monat) voran als in Nacktmäusen. Diesbezüglich ergaben sich wahrscheinlich auch Unterschiede in den Ergebnissen hinsichtlich des Metastierungspotentials von Brustkrebszellen in SCID-Mäusen (Müller et al., 2001) oder in Nacktmäusen (in diese Arbeit).

Brustkrebszelllinien sind in der Lage, differentiell auf Chemokine zu migrieren und ein bestimmtes Repertoire an Chemokinrezeptoren funktionell zu benutzen (Müller et al., 2001; Youngs et al., 1997). Bei Müller et al. (2001) wurde, zu den hier angeführten Experimenten,

der Chemokinrezeptor CXCR4 auf Brustkrebszelllinien und Brustkrebs-patientenmaterial untersucht, wobei gezeigt wurde, daß CXCR4 die Dissemination von Tumorzellen in Lunge und Lymphknoten beeinflusst. Zudem wurde in der Arbeit von Müller et al. (2001) festgestellt, daß CCR7 ebenfalls auf Brustkrebszelllinien und Brustkrebs-patientenmaterial exprimiert wird. Dennoch wurde bei Müller et al. (2001) die Rolle von CCR7 für die Dissemination von Brustkrebszellen nicht näher untersucht. Auf den hier verwendeten Brustkrebszellen MDA-MB435S1 wurde CCR7 nicht endogen exprimiert, entsprechend ist diese untransfizierte Zelllinie in diesem Mausmodell nicht durch murines CCL19 oder CCL21 stimulierbar (Abb. 10 und 19). Im Gegensatz dazu exprimiert die Brustkrebszelllinie MDA-MB231, die bei Müller et al. (2001) verwendet wurde, funktionell aktiven CCR7. Im Gegensatz dazu exprimieren die beiden Zelllinien, MDA-MB435S1 und MDA-MB231 (Müller et al., 2001), funktionell aktiven CXCR4 (Abb. 9) auf der Oberfläche.

Zu Beginn der Versuche wurden die Organe der Mäuse mittels RT-PCR und FACS-Analyse (Abb. 23; Tabelle 4) auf die Anwesenheit humaner Tumorzellen analysiert. Die Ergebnisse gaben unspezifische Signale in bezug auf die Infiltration und Kolonisation von Metastasen in den verschiedenen Geweben, da wahrscheinlich auch Tumorzellen detektiert wurden, die im Blut und der Lymphe verteilt waren. Erst die Dokumentation der Metastasen durch Immunhistologie unter Benutzung spezifischer Antikörper war geeignet, die genaue Position der Tumorzellen in der Lunge oder im Lymphknoten (Abb. 24, 25) zu klären.

Ein weiterer kritischer Faktor in diesem Modell ist die Tumorgöße (mindestens 15 mm Länge) und das damit verbundene Tumorstadium (zwischen 6 und 9 Monate) der einzelnen Zellpopulationen. Die Tiere wurden entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz bei einer Tumorgöße von 15 mm in der Länge getötet und die Bildung von Metastasen in der Lunge und in anderen Organen untersucht. Untersuchungen der AG Lipp (MDC-Berlin) ergaben, daß keine zwingende Korrelation und zwischen der Kinetik des Tumorstadiums und dem Metastasierungspotential in Nacktmäusen besteht.

#### *Infiltration der Lunge von Brustkrebszellen*

In diesem vorgestellten Metastasierungsmodell reguliert CCR7 sowohl im Kurzzeitmigrationsexperiment (Abb. 22) als auch im Metastasierungsmodell (Tab. 5) nicht die Infiltration der Lunge mit Brustkrebszellen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß CXCR4 auf den MDA-MB435S1-Zellen (Abb. 9) wahrscheinlich in diesen Untersuchungen die gewebespezifische Metastasierung in der Lunge reguliert. Bei Müller et al. (2001) ist die Infiltration der Lunge mit Brustkrebszellen in einen Zusammenhang mit der Expression von CXCR4 gebracht worden. Es wurde gezeigt, daß nach Behandlung mit blockierendem anti-CXCR4-Antikörper sich die Anzahl von Brustkrebsmetastasen, gebildet durch MDA-MB231-Zellen, in der Lunge reduzierte. Da gezeigt wurde, daß CCR7 keine Relevanz für die Lungenmetastasierung hat (Tab. 5b), kann angenommen werden, daß die starke Expression von CXCL12 in der Lunge für eine CXCR4-vermittelte Bildung von Lungenmetastasen der Brustkrebszellen entscheidend ist. Die Chemokine CCL19 und CCL21 werden auch in der

Lunge (Maus) exprimiert, verstärken aber nicht die Metastasenbildung von Zellpopulationen, die CCR7 exprimieren. Damit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, daß die Stimulation von CCR7 auf niedrig-metastasierenden Brustkrebszellen durch parakrine Mechanismen in der Maus im Prozeß der Metastasierung die Invasion von Lunge nicht fördert.

Jedoch konnte in dieser Arbeit nicht bewiesen werden, daß die Koexpression von CCR7 gemeinsam mit einem seiner Liganden verstärkenden Einfluß auf das Metastasierungspotential der Karzinomzellen in der Lunge hatte (Tab. 5). Ein Vergleich der Zellpopulationen zeigte, daß die Variabilität der Zellklone einschließlich der Zell-Pools innerhalb einer Gruppe sehr groß war, bei der CCR7-Zellpopulation von 29-67 %, bei der CCR7-CCL19-Zellpopulation von 50-100 % und bei CCR7-CCL21-Zellpopulation von 40-100 %.

#### *Infiltration der drainierenden Lymphknoten von Brustkrebszellen*

In Kurzzeitexperimenten (Abb. 22) mit adoptiv transferierten Tumorzellen in BALB/c-Mäuse konnte beobachtet werden, daß die ektopische Expression von CCR7 gegenüber Kontrollzellen keinen verstärkenden Einfluß auf die Wanderung zu den ALN hatte. Im Metastasierungsmodell migrierten zwar die Tumorzellen, ebenfalls unabhängig von CCR7, zu den drainierenden und anderen Lymphknoten, infiltrierten diese jedoch nicht, sondern befanden sich außerhalb des Lymphknotens (Abb. 24d). Dies bestätigt, daß CCR7 nicht für die Infiltration von Tumorzellen entscheidend ist. Bei Müller et al. (2001) konnte die Metastasierung in den inguinalen und axillären Lymphknoten über spezifische anti-CXCR4-Antikörper blockiert werden, so daß CXCR4 möglicherweise entscheidend an der Migration von Tumorzellen in die Lymphknoten von SCID-Mäusen mitwirkt. Dennoch ist auch aus den Daten dieser Publikation nicht ersichtlich, ob die Tumorzellen (MDA-MB231-Zellen) die ALN oder ILN der SCID-Maus wirklich infiltrierten, da Bilder von Gefrierschnitten nicht gezeigt wurden. Zudem muß berücksichtigt werden, daß bei Müller et al. (2001) eine sehr hohe Dosis von allogenen wirkenden anti-CXCR4 Antikörpern injiziert wurde, die sowohl an die Zellen binden als auch wahrscheinlich das Komplementsystem in der SCID-Maus aktivieren, so daß eine Metastasenbildung aufgrund einer angeborenen Serumantwort (Opsonierung) in Form einer xenogenen Transplantationsabstoßung unterbunden werden kann, nachdem der injizierte Antikörper anti-CXCR4 an die Zelloberfläche gebunden hat. Der IgG-Isotypkontrollantikörper wird von der Tumorzelle hingegen nicht gebunden. Die gleiche Vermutung besteht für das Verschwinden der Lungenmetastasen nach anti-CXCR4-Behandlung (Bancroft und Kelly, 1994; Müller et al., 2001).

Im Kurzzeitmigrationsexperiment (Abb. 22) hatte die heterologe Koexpression von CCR7 und CCL19 bzw. CCL21 von Brustkrebszellen keinen signifikanten Effekt auf die Migration zu den ALN, wohingegen nur CCR7-CCL21-exprimierende Brustkrebszellen die ALN (Tab. 5) von immundefizienten Mäusen infiltrierten und Metastasen bildeten. Obwohl murines CCL21 auf dem Endothel der HEVs und der afferenten lymphatischen Gefäße exponiert wird, und somit CCR7-überexprimierende Zellen zu und in Lymphknoten dirigieren kann (Abb. 22)

(Hirao et al., 2000; Luster, 2002), bilden die Zellpopulationen in Nacktmäusen, die nur CCR7 exprimieren, keine Metastasen in den ALN (Tab. 5). Bei Koexpression von CCR7 und CCL21 konnten nur Tumorzellen vom Klon 1 und vom Pool die Lymphknoten erfolgreich invasieren und Fernmetastasen bilden. Der CCR7-CCL21 Klon 2 ist im Vergleich zu Klon 1 und Pool nur langsam in der Maus (Tab. 1) herangewachsen, und bildete keine Metastasen im ALN. Somit bleibt nicht eindeutig geklärt, welche Signifikanz der CCR7-CCL21 Koexpression und der beobachteten Metastasierung im ALN zugeschrieben werden kann. Daß die Metastasierung im ALN nur bei CCR7-CCL21-koexprimierenden Zellen zu beobachten war, kann verschiedene Gründe haben. So könnte eine verlängerte CCL21-abhängige Aktivierung von ERK entscheidend sein, so daß Gewebe-infiltrierende Tumorzellen ein starkes Wachstum im Organ haben. In verschiedenen experimentellen Modellen, beispielsweise der Bildung ektopischer Follikel und der Immunantwort auf Tumorzellen, konnte *in vivo* gezeigt werden, daß murines CCL21 im Vergleich zu CCL19 potenter in der Rekrutierung von Zellen ist. Am Beispiel der Generierung von ektopischem lymphoidem Gewebe in Pankreas-Inseln durch Überexpression von Chemokinen hatte die ektopische Expression von CCL21 gegenüber CCL19 eine höhere Effizienz bei der Bildung organisierten tertiären lymphoiden Gewebes, beispielsweise bei der Induktion von HEVs und Stromazell-Netzwerken (Chen et al., 2002; Luther et al., 2002). Ein Vergleich der homöostatischen murinen Chemokine CCL19 und CCL21 zeigte zudem, daß CCL21 für die Tumorregression eine höhere Effizienz als CCL19 besitzt (Nomura and Hasegawa, 2000). Somit scheint *in vivo* CCL21 eine stärkere Aktivität und eine damit einhergehende Relevanz für die Metastasierung zu haben.

#### *Bedeutung endogener Chemokine für den Metastasierungsprozeß*

Murines CXCL12, CCL19 und CCL21 wird konstitutiv in verschiedenen Organen der Maus, darunter auch in der Lunge und den Lymphknoten exprimiert. Über CXCL12, CCL19 und CCL21 werden CXCR4- und CCR7-positive Lymphozyten in die Lymphknoten dirigiert (Luster et al., 2002; Okada et al., 2002). Auch Tumorzellen können vermutlich über CXCL12, CCL19 und CCL21 in die Lunge und den peripheren Lymphknoten migrieren, da diese Chemokine auf dem Endothel der Lunge und der Lymphknoten exponiert werden und damit die Migration der Zellen steuern können (Müller et al., 2001).

Dennoch konnten endogenes murines CCL19 oder CCL21 nicht das Potential der Metastasenbildung der CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21-Zellpopulation im Organ wie Lunge erhöhen. Welche Bedeutung dem murinem CCL19 bzw. CCL21 im ALN zukommt ist ungewiss, aber es kann vermutet werden, daß das tumorspezifische CCL21 der CCR7-CCL21-Zellpopulation entscheidend auf die Infiltration und das Wachstum der Metastase im Lymphknoten wirkte.

Zudem ist es noch ungeklärt, welche Bedeutung den Chemokinen am Endothel der Lunge und im Lymphknoten zukommt. Da die Aktivität von CCR7 auf den Tumorzellen durch endogene Koexpression der Liganden nicht desensitiviert wurde (Abb. 22), kann vermutet werden, daß

der murine CCL19- oder CCL21-Gradient auf dem Endothel seine chemo- oder haptotaktische Aktivität nicht verliert.

Bis jetzt ist nur die Funktion der Stimulation von CCR7 durch CCL19 und CCL21 intensiv untersucht worden. Weitere Rezeptoren, die CCL19 oder CCL21 binden, wie CCX-CKR (Townson und Nibbs, 2002), der vor allem in Lunge und Darm exprimiert wird, und CCR14 (Gosling et al., 2000) sind noch nicht näher charakterisiert worden. Für beide Rezeptoren konnte außer der Ligandenbindung *in vitro* und der Expression *in vivo* keine Funktion nachgewiesen werden.

Zudem konnte gezeigt werden, daß murines CCL21 neben humanem und murinem CCR7 auch den murinen Rezeptor CXCR3 bindet und abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Reaktionen induziert (Jen et al., 1999). Beispielsweise induziert das murine CCL21 über den murinen Rezeptor CXCR3 auf murinen Mikroglia-Zellen ein Chlorid-Signal, währenddessen es angiostatisch auf die Neovaskularisierung in Tumoren der Maus wirkt. Für das humane CCL21 hingegen wurde die Rezeptor-übergreifende Funktion nicht bestätigt (Rappert et al., 2002; Soto et al., 1998).

#### *Die Bedeutung des Endothels*

Das Wechselspiel zwischen Endothel und Tumorzelle ist sehr komplex und bedarf noch weiterer Untersuchungen hinsichtlich der Organspezifität und Stimulierbarkeit der endothelialen Chemokinrezeptoren. Ausgehend von der Stimulation der Endothelzellen über Chemokine, die von den Tumorzellen exprimiert werden (z.B. CXCL8 exprimiert von MDA-MB435S1-Zellen), wäre es vorstellbar, daß über die Stimulation der Rezeptoren CXCR1 oder CXCR4 auf Endothelzellen wiederum Integrine auf dem Endothel aktiviert werden (Feil und Augustin, 1998; Lin et al., 2001). Über die aktivierten Integrine auf dem Endothel wird dann wiederum das von den MDA-MB435S1-Zellen exprimierte ICAM-1 gebunden. Somit könnte auf diesem Weg ebenfalls eine feste Bindung zwischen Endothel und Tumorzelle aufgebaut werden.

Zudem wird die Tumorentwicklung und die Tumorprogression stark von der Präsenz angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF oder FGF und angiogener Chemokine wie CXCL8 gefördert, die eine Neovaskularisierung des Tumorgewebes ermöglichen (Leek et al., 2000). Wichtig dafür ist die Balance von angiogenen und angiostatischen Faktoren (Strieter et al., 1995a), als auch von Plasminogen-Aktivatoren und ihren Inhibitoren. Es konnte gezeigt werden, daß die Überexpression des Wachstumsfaktors VEGF-C von nieder-metastatischen Brustkrebszellen (MCF-7-Zellen) in Nacktmäusen eine verstärkte lymphatische Neovaskularisierung des Tumors induzierte, die mit der Lymphknoten-Metastasierung korrelierte. Somit wird vermutet, daß vom Primärtumor losgelöste Brustkrebszellen hauptsächlich über die lymphatischen Gefäße in die Lymphknoten transportiert werden. Die Infiltration der Lunge mit streuenden Tumorzellen hingegen war davon unbeeinflusst, weil die Tumorzellen über die Blutbahn die Lunge infiltrieren (Karpanen et al., 2001; Mandriota et al., 2001; Skobe et al., 2001). Darüber hinaus können verschiedene Zytokine wie IFN- $\gamma$  die Expression von

angiostatischen ELR<sup>+</sup> CXC Chemokinen verstärken, und damit auch auf die Angiogenese Einfluß nehmen. Die Expression von IFN- $\gamma$  wird wiederum durch Zytokine wie IL-12 oder IL-18 induziert, wohingegen IL-10 sowohl die Expression von IFN- $\gamma$  als auch von angiogenen Faktoren wie beispielsweise VEGF supprimiert. IL-1 und TNF- $\alpha$  können wiederum direkt die Expression verschiedener Chemokine induzieren (Huang et al., 1996; Moore, 2001; Wang et al., 1998a; Belperio, et al., 2000).

#### *Vergleich mit anderen Tumoentitäten*

Die Bedeutung der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 für die Metastasierung in Lunge und drainierenden Lymphknoten wurde ebenfalls mit murinen Melanomzellen untersucht (Murakami et al., 2002; Wiley et al., 2001). Wie für Brustkrebszellen im Kapitel 5.4.5 wurde auch für Melanomzellen B16 gezeigt, daß die Migration von intravenös injizierten Melanomzellen zu den peripheren Lymphknoten und der Lunge auch unabhängig der Expression von CCR7 (nach 2 Wochen) und CXCR4 (nach 2 Stunden) ist; andererseits war die Bildung von Metastasen nach 10 Tagen für CXCR4-überexprimierende B16-Zellen verstärkt. Im Fußballen injizierte Melanomzellen B16 bildeten abhängig von der Expression von CCR7 im poplitealen drainierenden Lymphknoten Metastasen, so daß vermutet wurde, daß CCR7 wichtig für die Infiltration der LN ist. Dennoch wurde es bei Wiley *et al.* (2001) versäumt, die eigentliche Infiltration in das Gewebe der Lymphknoten zu untersuchen, ebenso auch eine Koexpression von CCL19 oder CCL21 der B16-Zelllinie (Murakami et al., 2002; Wiley et al., 2001).

#### *Rekrutierung von Tumorzellen in lymphoide Gewebe*

Die Bildung extranodaler Follikel bei verschiedenen Krankheiten und Tumoren lassen vermuten, daß eine verstärkte Expression von homöostatischen Chemokinen durch Tumorzellen oder dem entzündeten Gewebe zur Rekrutierung weiterer Tumorzellen führt, aber auch anderer Zellpopulationen (beispielsweise Tumor-infiltrierende Makrophagen), die passende Chemokinrezeptoren exprimieren. Möglicherweise können bereits infiltrierte Tumorzellen über die endogene Expression von CCL19 oder CCL21 weitere Tumorzellen in die befallenen Organe rekrutieren.

Die unkontrollierte Expression von CXCR4 und CCR7 auf Hodgkin-Zellen verhindert vermutlich deren Auswanderung aus den Lymphknoten, so daß sie über die Chemokine in den Zellkompartimenten zurückgehalten werden. Ein anderes Beispiel ist das MALT-Lymphom, bei dem im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf ektopische Follikel in der Mucosa gebildet werden, in denen CXCL13 stark exprimiert wird, so daß Lymphom-Zellen, die CXCR5 hoch exprimieren, vermutlich in diese Follikel rekrutiert oder in diesen zurückgehalten werden (Hjelmström, 2001; Höpken et al., 2002; Mazzucchelli et al., 1999). Über einen ähnlichen Mechanismus könnte die verstärkte Infiltration und Metastasierung der Lunge von CCL19- oder CCL21-koexprimierenden Tumorzellen spekuliert werden.

Perspektivisch sollte die klinische Relevanz einer CCR7-CCL21-Koexpression auf humanem Mammakarzinomgewebe untersucht werden, nämlich inwieweit die Expression mit der Ausbildung von Lungen- und Lymphknoten-Metastasen korreliert. In einer klinischen Studie von nicht-hämatopoetischen Tumorerkrankungen z.B. von Magenkarzinomen, konnte gezeigt werden, daß die Expression von CCR7 die Inzidenz einer Lymphknoten-Metastasierung signifikant erhöhte (Mashino et al., 2002). Zudem besitzen Patienten mit CCR7-positiven Tumoren dieser Studie zufolge eine schlechtere Prognose als Patienten mit CCR7-negativen Tumoren. In einer Reihe von Publikationen, die sich mit der Metastasierung und der Expression von CCR7 befassen, wurde jedoch eine mögliche endogene Expression von CCL19 oder CCL21 nicht untersucht, was ein Vergleich der experimentellen Tumormodelle auch anderer Tumorentitäten erschwert (Mashino et al., 2002; Moore, 2001; Payne und Cornelius, 2002; Wiley et al., 2001).

### 6.3 Chemokinrezeptor-abhängige FTY720-Funktionen

Auf der Suche nach wirksamen immunmodulatorischen Substanzen für den Einsatz bei Organtransplantationen wurde bei der Novartis Pharma AG eine Substanz weiterentwickelt, die keine immunsuppressive Wirkung auf die Funktionalität der Immunzellen ausübt (Pinschewer et al., 2000). Die Behandlung mit FTY720 induziert eine Lymphopenie in Form einer Anreicherung der B- und T-Zellen in den lymphatischen Organen, und gleichzeitig der Austritt der Lymphozyten aus den lymphatischen Organen unterbunden wird (*shut down*). Damit wird die Zahl der rezirkulierenden Lymphozyten vermindert. Lymphozyten exprimieren in Abhängigkeit ihres Differenzierungszustandes unterschiedliche Chemokinrezeptoren, die es den Zellen ermöglichen, gezielt in bestimmte Kompartimente sekundärer lymphatischer Organe für die weitere Entwicklung oder Aktivierung einzuwandern. Die Einwanderung naiver Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe wird über das Zusammenspiel von Chemokinrezeptoren mit Adhäsionsmolekülen gesteuert und erfolgt, mit Ausnahme der Milz, über das hohe Endothel der postkapitären Venolen (Girard und Springer, 1995b). Stromazellen, DCs und Endothelzellen der lymphatischen Organe exprimieren unterschiedliche Chemokine, wie CXCL12, CXCL13, CCL19 und CCL21. Diese Chemokine regulieren wiederum sowohl die Einwanderung als auch die anschließende Organisation der B- und T-Zellen in T- und B-Zell-reichen Zonen (Bleul et al., 1996; Förster et al., 1996; Förster et al., 1999; Picker und Butcher, 1992; Okada et al., 2002). Phosphoryliertes FTY720 ist ein potenter Agonist für Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptoren wie EDG1, EDG3, EDG6 und EDG8 und besitzt eine hohe Strukturähnlichkeit mit dem Lysophospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) (Abb. 2) (Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002). Die S1P-Rezeptoren gehören wie die Chemokinrezeptoren ebenfalls zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Das Lysophospholipid, Sphingosin-1-Phosphat (S1P), und seine Rezeptoren, die *endothelial differentiation gene* (EDG)-Rezeptoren 1, 3, 5, 6 und 8, spielen eine wichtige Rolle bei der Modulation verschiedener Signalkaskaden

im Zusammenhang mit der Immunantwort und Migration. Die Expression der verschiedenen EDG-Rezeptoren beschränkt sich dabei nicht nur auf Endothelzellen, sondern findet sich auch in lymphoiden und anderen Geweben (Gräler et al., 1998; Mandala et al., 2002; Muraki und Imaizumi, 2001). So induzierte die Gabe von S1P in Mäusen nach 3 Stunden ebenfalls eine transiente Depletion peripherer Lymphozyten. FTY720 wie Sphingosin werden durch (Membran-assoziierte oder intrazelluläre) Sphingosin-Kinasen *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert, wobei möglicherweise nur phosphoryliertes FTY720 an verschiedene EDG-Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität (EDG1<EDG6<EDG8<EDG3) bindet (Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der FTY720-induzierten Einwanderung von Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organe ein CXCR5- oder CCR7-abhängiger Mechanismus zugrunde liegt. Neuere Ergebnisse zeigten, daß FTY720 die chemotaktische Aktivität der Zellen auf eine Vielzahl unterschiedlicher Chemokine moduliert, beispielsweise CCL2, CCL5, CXCL13, CCL19 und CCL21 (Chen et al., 2001). Entsprechend zeigten FTY720-behandelte CCR7-exprimierende MDA-MB453S1-Zellen *in vitro* eine tendenziell verstärkte migratorische Antwort auf CCL21 im Vergleich zu Puffer-behandelten Zellen (Abb. 29). Es wurde gezeigt, daß eine Aktivierung der EDG-Rezeptoren die gerichtet Zellmigration erhöht und, so daß über diese Rezeptoren die FTY720-induzierte Wirkung reguliert werden kann (Takuwa et al., 2002). Da in MDA-MB435S1-Zellen keine mRNA für FTY720-bindende S1P-Rezeptoren über RT-PCR nachgewiesen werden konnte, wird die verstärkte migratorische Antwort auf CCL21 von den MDA-MB435S1-Zellen (Abb. 29) vermutlich nicht über die Rezeptoren EDG1, 3, 6 und 8 reguliert (Brinkmann et al., 2002; Brinkmann und Lynch, 2002; Mandala et al., 2002). Nur mRNA von EDG5 wurde in MDA-MB435S1-Zellen nachgewiesen, der jedoch phosphoryliertes FTY720 nicht bindet. Die dem modulierenden Effekt von FTY720 zugrunde liegenden Mechanismen wurden in dieser Arbeit *in vitro* und *in vivo* weiter untersucht. So zeigte sich *in vitro*, daß die Oberflächenexpression von CXCR5 oder CCR7 auf verschiedenen Zelllinien nach 6stündiger Inkubation mit 100 nM FTY720 nicht verstärkt wurde (Daten nicht gezeigt). Bei Chen et al. (2001) kam man zu dem gleichen Ergebnis, insofern als die mRNA-Expression verschiedener Chemokine (CCL19, CCL21, CXCL12 und CCL5) und Chemokinrezeptoren (CXCR4, CXCR5 und CCR7) im Lymphknoten von FTY720-behandelten Mäusen nicht verstärkt wurde. Die Expression der Adhäsionsmoleküle wie CD62L, CD49d und CD11a, die für eine TEM über HEVs wichtig sind, wurde ebenfalls durch Behandlung mit FTY720 nicht verändert (Yanagawa et al., 1998). Andererseits wurde noch nicht geklärt, inwieweit die Expression der Adhäsionsmoleküle *peripheral node addressin* (PNAd) und *mucosal addressin cell adhesion molecule* (MadCAM-1) auf den HEVs der lymphatischen Organe die Akkumulation von L-Selektin-positiven Lymphozyten nach Behandlung mit FTY720 beeinflußt. In der adulten Maus werden die Adhäsionsmoleküle spezifisch auf den HEVs lymphatischer Organe exprimiert, wie beispielsweise PNAd in den peripheren Lymphknoten, PNAd und MadCAM in den mesenterischen Lymphknoten, und MadCAM in den Peyer'schen

Plaques (Mebius et al., 1996). Bis jetzt ist leider nicht genauer untersucht worden, inwieweit deren Expression in den lymphatischen Organen der CCR7<sup>-/-</sup>- oder CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen von der Wildtyp-Maus abweicht.

Da FTY720 verstärkend auf die Migration verschiedener Chemokine wirkt, wurde untersucht, inwieweit Signalwege die in Verbindung mit migratorischen Prozessen stehen, verstärkt werden. In Kooperation mit Henning *et al.* (2001) konnte gezeigt werden, daß das FTY720-induzierte *homing* von Lymphozyten über Pertussis-Toxin blockiert werden kann und damit wie die CCR7- oder CXCR5-abhängige Migration von Lymphozyten über einen G $\alpha$ i-vermittelten Signalweg induziert wird (Chen et al., 2001; Kim et al., 1998; Müller und Lipp, 2001). Allerdings hat FTY720 *in vitro* keinen Einfluß auf die Stimulierung des klassischen MAPK-Signalwegs durch CCL21, CCL19 (Abb. 27) oder CXCL13 (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurde von Chen et al. (2001) gezeigt, daß FTY720 die CCL5-abhängige PI3-Kinase-Aktivität erhöht.

Diese Ergebnisse schließen aber nicht aus, daß FTY720 die Migration über andere GPCRs wie die EDG-Rezeptoren oder unabhängig von GPCRs direkt über eine Wechselwirkung mit G $\alpha$ i-Proteinen reguliert. Da S1P auch als intrazellulärer Botenstoff fungiert, kann nicht ausgeschlossen werden, daß phosphoryliertes FTY720 ebenfalls als intrazellulärer Botenstoff agiert und S1P-spezifische Signalkaskaden aktiviert (Merrill et al., 1997).

### 6.1.1 FTY720-induzierte Lymphopenie in Wildtyp-, CXCR5<sup>-/-</sup>- und CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen

FTY720 wurde bereits in Transplantationen erfolgreich erprobt, weil es periphere Lymphozyten in die sekundären lymphatischen Organen akkumuliert, und somit eine Transplantationsabstoßung durch Depletion der peripheren Lymphozyten verhindert (Brinkmann et al., 2002; Chiba et al., 1998; Kahan, 1998; Mitsusada et al., 1997; Suzuki et al., 1996). Diese FTY720-induzierte Lymphopenie ist sowohl durch Pertussis-Toxin inhibierbar; zudem wirkt FTY720 sowohl auf B- als auch auf T-Zellen. FTY720 hatte keinen Effekt auf Neutrophile und Makrophagen, d.h. sie wurden nicht in lymphatischen Organen angereichert (Chen et al., 2001; Chiba et al., 1998; Henning et al., 2001).

Nach 6stündiger Inkubation der Mäuse mit FTY720 (0,3 mg/kg) verschwanden die peripheren Blutlymphozyten fast vollständig aus dem Blut von Wildtyp- und CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen. Das Fehlen des Rezeptors CXCR5 auf peripheren Lymphozyten in den CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen hatte keinen Einfluß auf die FTY720-induzierte Lymphopenie (Abb. 32b). Im Gegensatz dazu zeigte die orale Administration von FTY720 bei CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen eine gegenüber Wildtyp-Mäusen zeitlich verzögerte Reduktion der Zahl peripherer Lymphozyten im Blut (Abb. 32). Während in Wildtyp-Mäusen eine fast vollständige Depletion peripherer Lymphozyten nach 12 Stunden (Abb. 32) beobachtet wurde, ist eine vergleichbare Abnahme in CCR7<sup>-/-</sup>- und *plt*-Mäuse erst nach zwei Tagen zu erkennen (Henning et al., 2001). FTY720 wirkt vor allem auf CD4-positive T-Zellen (Abb. 32), sowohl in CCR7<sup>-/-</sup>- als auch in wt-Mäusen (Henning et al.,

2001). Möglicherweise war die Verzögerung in der Lymphopenie CCR7-abhängig, es scheint, daß eine rasche Depletion von peripheren Lymphozyten CCR7-vermittelt ist. Allerdings können die peripheren Lymphozyten auch in CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen nach 48 Stunden durch FTY720 fast vollständig depletiert werden, so daß der Effekt über andere Rezeptoren vermittelt wird (Henning et al., 2001).

Problematisch für die Interpretation der Daten zum zeitlichen Verlauf der Lymphopenie in CCR7<sup>-/-</sup>- gegenüber wt-Mäusen ist die Tatsache, daß CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen eine deutlich höher Zahl der Blutlymphozyten besitzen. Die zeitliche Verzögerung der Lymphopenie wird möglicherweise in den quantitative Unterschieden der Zahl peripherer Blutlymphozyten begründet. Die verzögerte Depletion von Blutlymphozyten in CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen ist möglicherweise aber auch durch die Kapazität der HEVs in bezug auf die TEM begrenzt, so daß die Rate der Migration von Zellen in die sekundären lymphatischen Organe limitiert ist.

### 6.1.2 FTY720-Funktionen in CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die immunmodulierende Substanz FTY720 induzierte in CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen wie in den wt-Mäusen eine vergleichbare Lymphopenie. Die peripheren Lymphozyten (sowohl B- als auch T-Zellen) akkumulierten dabei ausschließlich in den PPs der CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäuse. Von den in CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen vorhandenen ALN und BLN wurde exemplarisch beide BLNs untersucht. Da nicht alle peripheren Lymphknoten, sondern nur repräsentativ die brachialen Lymphknoten untersucht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich das FTY720-induzierte *homing* von Lymphozyten in die verschiedenen peripheren Lymphknoten, die in CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen selten vorhanden sind, unterscheidet. Allerdings zeigte sich, daß das FTY720-induzierte *homing* von Lymphozyten in die PPs unabhängig von CXCR5 geschah (Tab. 7). Für das *homing* von B-Zellen in die PPs wurde gezeigt, daß B-Zellen sowohl CCR7 als auch CXCR5 benutzen (Okada et al., 2002), gleiches könnte für FTY720-behandelte CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäuse gelten. Im Gegensatz dazu war das FTY720-induzierte *homing* in den BLNs der CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäuse gestört (Abb. 38) (Müller et al., 2003). Obwohl das *homing* von T- und B-Zellen in die BLNs hauptsächlich durch CCR7 reguliert wird, hatte die Expression von CXCR5 einen entscheidenden Einfluß auf das FTY720-induzierte *homing* sowohl von B- als auch T-Zellen (Okada et al., 2002). Daß die relative B- und T-Zellzahl in CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Behandlung mit FTY720 unter den Wert der Kontrolltiere sank (Abb. 35), könnte damit erklärt werden, daß Lymphozyten nicht im Organ zurückgehalten oder rekrutiert werden können (Abb. 38; Tab. 7). Obwohl der FTY720-induzierten Effekt in den BLNs auch T-Zellen betraf, deren TEM hauptsächlich über CCR7 vermittelt wird, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die in CXCL13<sup>-/-</sup>- und CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachteten Defekte in der Organogenese einiger BLNs der Auslöser waren (Ansel und Cyster, 2001; Förster et al., 1996).

Da FTY720 die chemotaktische Antwort von Lymphozyten auf verschiedene Chemokine wie CCL21 moduliert (Chen et al., 2001), könnte auch FTY720 *in vivo* indirekt auf die Expression

von CCL21 der HEVs in BLN von CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen wirken und somit die FTY720-Effekte auf B- und T-Zellen erklären (Gunn et al., 1998). Bisher ist nicht bekannt, inwieweit die Expression homöostatischer und inflammatorischer Chemokine in CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen von der in wt-Mäusen abweicht. Dennoch lassen Daten aus den *knockout*-Mäusen für TNF- $\alpha$ , Lt- $\alpha$  und - $\beta$  vermuten, daß die Expression von Chemokinen verändert sein könnte. In diesen Mäusen war die Expression der Chemokine CXCL13, CCL21 und CCL19 in der Milz vermindert (Ngo et al., 1999).

Tabelle 7: Tabellarische Zusammenfassung des FTY720-induzierten *homings* peripherer Blutlymphozyten in verschiedenen lymphatischen Organen von Wildtyp- (wt), CXCR5<sup>-/-</sup>- und CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen. In der Tabelle werden die Organ-infiltrierenden Zellpopulationen nach Behandlung mit FTY720 (im Unterschied zu Kontrolltiere) angegeben. Wenn die FTY720-induzierte Infiltration ausbleibt wird der Kasten mit einem Strich markiert; infiltrierende Zellen: T: T-Zellen, B: B-Zellen.

<b>FTY720-induziertes homing</b>	<b>wt</b>	<b>CXCR5<sup>-/-</sup></b>	<b>CCR7<sup>-/-</sup></b>
<b>Milz</b>	-	-	-
<b>MLN</b>	-	-	-
<b>BLN</b>	<b>T/B</b>	-	<b>T/B</b>
<b>PP</b>	<b>T/B</b>	<b>T/B</b>	-

Andererseits könnte vermutet werden, daß FTY720 nicht nur direkt auf Lymphozyten wirkt, sondern auch indirekt über die am Sinus liegende Endothelzell-Barriere, so daß die Lymphozyten aus den lymphatischen Organen nicht mehr in den Blutkreislauf rezirkulieren können (*shut down*) (Mandala et al. 2002). Aufgrund von Defekten in der Organogenese von CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen könnte diese Endothelzell-Barriere verändert worden sein, so daß FTY720 den Austritt der Lymphozyten über das Endothel nicht mehr verhindern kann. In diesen Zusammenhang ist auch noch nicht geklärt, ob die Expression des Adhäsionsmoleküls PNA<sub>d</sub> in den CXCR5<sup>-/-</sup>-Mäusen verändert ist.

In Abb. 35 muß die Beobachtung festgehalten werden, daß naive T-Zellen mit hoher L-Selektin Expression nicht in den BLNs der CXCR5<sup>-/-</sup>-Maus, auch nicht nach FTY720-Behandlung, akkumuliert werden. In den BLNs wird wie in dem MLN PNA<sub>d</sub> auf den HEVs exprimiert, wodurch L-Selektin positive Zellen am Endothel arretieren. Ist die Expression von PNA<sub>d</sub> auf den HEVs gestört, können auch nach FTY720-Behandlung keine L-Selektin positive Zellen in das lymphatische Organ transmigrieren.

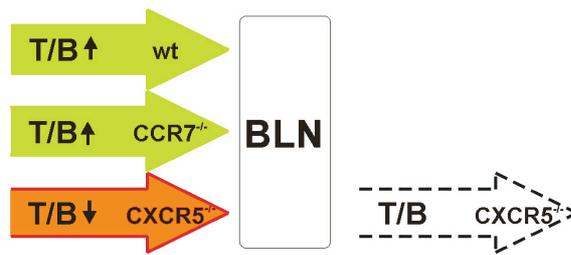


Abb. 38: Schematische Darstellung des FTY720-induzierten *homings* von Lymphozyten in BLN von Wildtyp-,  $CXCR5^{-/-}$  und  $CCR7^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich. FTY720-induzierte Lymphozyten-Ein- und Auswanderung wird mit einem Pfeil dargestellt. Rote Pfeile repräsentieren eine Abnahme der Anzahl an Lymphozyten durch FTY720; grüne Pfeile repräsentieren eine Zunahme der Anzahl an Lymphozyten durch FTY720; schwarze Pfeile repräsentieren keine Veränderung der Lymphozytenzahl im Organ durch FTY720; gestrichelte Pfeile repräsentieren die Emigration von Lymphozyten aus dem Organ durch FTY720. In den Pfeilen werden die Effekte von FTY720-behandelten Mäusen angegeben; Symbole: T für T-Zellen, B für B-Zellen. Zunahme und Abnahme der Lymphozytenzahl wird durch senkrechten Pfeil markiert.

### 6.1.3 FTY720-Effekte in $CCR7^{-/-}$ -Mäusen

Da  $CCR7$  wichtig für die Rekrutierung von Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten und PPs ist, wurden  $CCR7$ -defiziente Mäuse auf die FTY720-induzierte Migration in die peripheren Lymphknoten und PPs untersucht. Kurzzeitmigrationsexperimente mit transferten Splenozyten sollten Aufschluß darüber geben, inwieweit deren FTY720-induziertes *homing* in die Lymphknoten und PPs durch das Fehlen des Chemokinrezeptors  $CCR7$  beeinflußt wird.

Kurzzeitmigrationsexperimente, in denen das *homing* von  $CCR7^{-/-}$  und  $CCR7^{+/+}$ -Splenozyten nach adoptivem Transfer in BALB/c-Mäuse verfolgt wurde, zeigten Unterschiede zwischen  $CCR7^{-/-}$  und  $CCR7^{+/+}$ -Splenozyten hinsichtlich der relativen Anzahl CFSE-markierter Splenozyten in MLN, BLN und PP. Im Vergleich zu  $CCR7^{+/+}$ -Splenozyten war die Migration von  $CCR7^{-/-}$ -Splenozyten in die Lymphknoten (MLN und BLN) und PPs nach 3 Stunden stark reduziert. Im Gegensatz dazu konnte nach FTY720-Behandlung kein signifikanter Unterschied im dem Migrationsverhalten dieser Splenozyten beobachtet werden (Abb. 30). Für das Blut, die Milz und den MLN wurde anders als bei den BLNs und PPs eine Reduktion der relativen Anzahl CFSE-markierter Splenozyten beobachtet. Bei Beobachtung verschiedener peripherer Lymphknoten zeigte sich, daß FTY720 ein schwaches  $CCR7$ -unabhängiges *homing* von Lymphozyten induzierte (Henning et al., 2001), das aber bei alleiniger Betrachtung der BLNs, wie in dieser Arbeit, nicht signifikant war.

Da FTY720 die depletierten Lymphozyten in den Lymphknoten anreichert, war es von Interesse zu sehen, ob FTY720 die Mikroarchitektur der lymphatischen Organe oder die Verteilung adoptiv transferierter Lymphozyten verändert. Es konnte beobachtet werden, daß FTY720 weder einen Einfluß auf die Mikroarchitektur der Lymphknoten und der Milz hatte, noch auf die Positionierung von  $CCR7^{+/+}$ - und  $CCR7^{-/-}$ -Splenozyten nach adoptivem Transfer in BALB/c-Mäuse (Daten nicht gezeigt). Wie bei Henning et al. (2001) wurde beobachtet, daß  $CCR7^{-/-}$ -Splenozyten nahe der HEVs in den peripheren LN akkumulieren (Abb. 31).

Außerdem gibt es bei zu beachten, daß die CCR7<sup>-/-</sup>-Splenozyten aus Mäusen mit einem gemischten genetischen Hintergrund (BALB/c und SV129/EV) isoliert wurden, und daß deren intravenöse Injektion in eine BALB/c-Maus eine allogene Serum- und Immunantwort auslösen kann. Diese allogene Reaktion auf die CCR7<sup>-/-</sup>-Splenozyten würde bewirken, daß die Anzahl detektierter CCR7<sup>-/-</sup>-Splenozyten in der BALB/c-Maus reduziert wird.

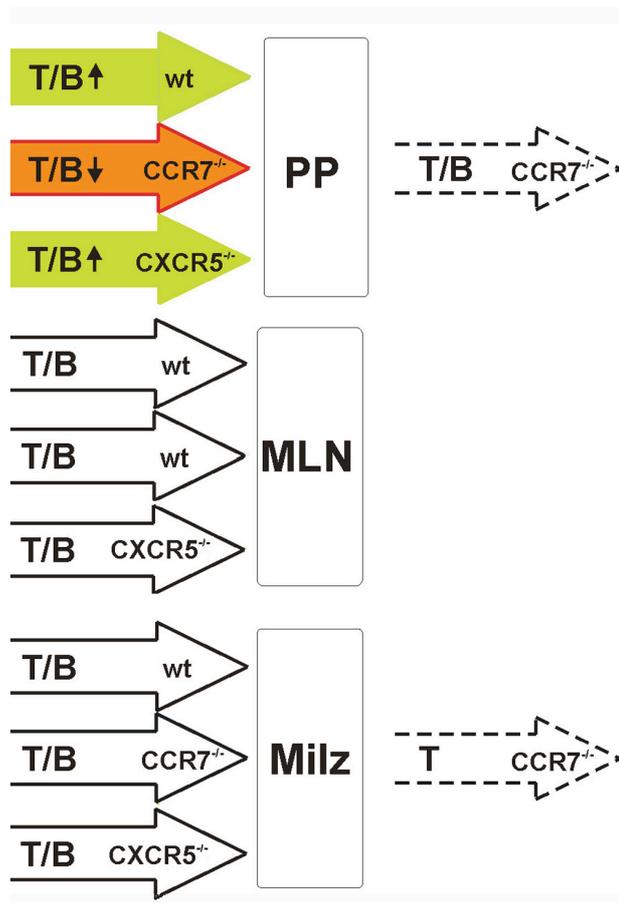


Abb. 39: Schematische Darstellung des FTY720-induzierten *homings* von Lymphozyten in Milz, MLN und PP von Wildtyp-, CXCR5<sup>-/-</sup>- und CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen. FTY720-induzierte Lymphozyten-Ein- und Auswanderung wird mit einem Pfeil dargestellt. Rote Pfeile repräsentieren eine Abnahme der Anzahl an Lymphozyten durch FTY720; grüne Pfeile repräsentieren eine Zunahme der Anzahl an Lymphozyten durch FTY720; schwarze Pfeile repräsentieren keine Veränderung der Lymphozytenzahl im Organ durch FTY720; gestrichelte Pfeile repräsentieren die Emigration von Lymphozyten aus dem Organ durch FTY720. In den Pfeilen werden die Effekte von FTY720-behandelten Mäusen angegeben; Symbole: T für T-Zellen, B für B-Zellen. Zunahme und Abnahme der Lymphozytenzahl wird durch senkrechten Pfeil markiert.

Um die Wirkung von FTY720 auf die Homöostase von Lymphozyten in wt-, CXCR5<sup>-/-</sup>- und CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen zu untersuchen, wurde diesen FTY720 oral gegeben und die Mäuse hinsichtlich der Migration in die lymphatischen Organe untersucht. Nach oraler Administration von FTY720 war das *homing* von B- und T-Zellen in die PPs in CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen insofern gestört, als daß möglicherweise die zirkulierenden Lymphozyten nicht im Organ zurückgehalten werden konnten (Tab. 7). Die aus dem Blut depletierten Lymphozyten akkumulierten nach 6 Stunden Behandlung mit FTY720 (Tab. 7) in den CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen hauptsächlich in peripheren Lymphknoten wie dem BLN (Abb. 35) aber nicht in PP, wobei selbst nach 18 h noch immer keine signifikante Infiltration der PP zu beobachten ist (Henning et al., 2001). Beim Vergleich des FTY720-induzierten *homings* in die Lymphknoten stellte sich heraus, daß das FTY720-induzierten *homing* in brachialen Lymphknoten, aber nicht im MLN, signifikant erhöhte war (Abb. 34, 35).

Die FTY720-induzierte Akkumulation von wt-Lymphozyten nach 6 Stunden in BLN und PP zeigte keine Präferenz für CD3- oder B220-Zellen, wohingegen nach 18 h eine starke Präferenz von FTY720 für T-Zellen der wt-Mäuse zu erkennen war (Henning et al., 2001). In den CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen hatte die CCR7-Defizienz keinen Einfluß auf das FTY720-induzierte *homing* von B-Zellen in BLN und PP. Eine Infiltration der BLNs mit T-Zellen in CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen war bereits nach 6 h eindeutig nachweisbar. Dagegen konnte im gleichen Zeitraum keine signifikante Einwanderung von T-Zellen in PPs beobachtet werden. Auch Henning et. (2001) haben nach 18 h nur eine sehr geringe Infiltration der PPs von CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen mit T-Zellen beschrieben. Daraus läßt sich ableiten, daß das FTY720-induzierte T-Zell *homing* in PP von wt-Mäusen nach 6 h hauptsächlich über CCR7 erfolgt (Abb. 36).

Die FTY720-Behandlung führte in der Milzen aus CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen ebenfalls zu einer reduzierten Einwanderung von T-Zellen (Abb. 39). Dennoch ist die Aussage zum Effekt von FTY720 auf die Veränderung der T-Zellzahl in der Milz von CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen unter Vorbehalt zu betrachten, weil das Volumen der Milz von Tier zu Tier stark variierte.

In Übereinstimmung mit der Beobachtung in den Kurzzeitmigrationsexperimenten (Abb. 30) gibt es für die Milz (Abb. 33) und MLN (Abb. 34) kein FTY720-induziertes *homing* in CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen, zudem scheint das FTY720-induzierte *homing* in PP (Abb. 36) in diesen Mäuse gestört zu sein (Abb. 39). Möglicherweise wird in diesen Organen das Zurückhalten der Lymphozyten (*shut down*) in CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen durch FTY720 gestört. Da verschiedene Populationen von Lymphozyten unterschiedliche Chemokinrezeptoren für die Einwanderung in die lymphatischen Organe nutzen (Okada et al., 2001), ist dann das entsprechende *homing* in CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen unterschiedlich stark betroffen. Auf den HEVs werden ebenfalls die Chemokine CCL2, CXCL12, CXCL13 oder CXCL9 exponiert, die potentiell an der Migration über die HEVs involviert sein können und damit die CCR7-Defizienz kompensieren können. Dennoch bleibt noch genauer zu untersuchen, inwieweit FTY720 möglicherweise die Expression von Chemokinen auf den HEVs moduliert. Diese Chemokine könnten spezifische Rezeptoren (wie CXCR4, CXCR3, CCR5 und CCR6) auf B- und T-Zellen binden und somit die TEM von CCR7<sup>-/-</sup>-Splenozyten steuern (Chen et al., 2001; Cyster und Goodnow, 1995; Girard und Springer, 1995a; Henning et al., 2001; Janatpour et al., 2001; Middleton et al., 1997, Nakano und Gunn, 2001; Okada et al., 2002; Phillips und Ager, 2002; Shinomiya et al., 1997).

Die Abnahme von T- und B-Zellen in den PP von CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen nach FTY720-Behandlung, kann auch auf eine fehlerhafte Organogenese von PP zurückzuführen und der Auslöser für das gestörte Wanderungsverhalten sein (Förster et al., 1999). In diesen Zusammenhang ist auch noch nicht geklärt, ob die Expression des Adhäsionsmoleküls MadCAM in den PPs der CCR7<sup>-/-</sup>-Mäusen verändert ist. In Abb. 34 und 36 muß die Beobachtung festgehalten werden, daß gerade naive T-Zellen mit hoher L-Selektin Expression nicht in den PP der CCR7<sup>-/-</sup>-Maus, auch nicht nach FTY720-Behandlung, akkumuliert werden. In den PPs wird MadCAM auf den HEVs exprimiert, wodurch L-

Selektin positive Zellen am Endothel arretieren. Ist die Expression von MadCAM auf den HEVs gestört, können wahrscheinlich auch nach FTY720-Behandlung keine L-Selektin positive Zellen in das lymphatische Organ transmigrieren.

In den Transfer-Experimenten mit  $CCR7^{-/-}$ -Splenozyten zeigte sich, daß die Expression von CCR7 für die TEM über andere Rezeptoren vermittelt werden konnte. In weiterführenden Transfer-Experimenten mit z.B.  $CXCR5^{-/-}CCR7^{-/-}$ -Doppel-*knockout*-Mäusen oder EDG-Rezeptor-defizienten Mäusen (z.B. konditionale  $EDG-1^{-/-}$  oder  $EDG-6^{-/-}$ ) könnten mögliche Kandidaten untersucht werden. Weiterhin bleibt zu klären, welchen Einfluß die Adipozyten auf die efferenten und afferenten Lymphgefäße der Lymphknoten haben, sowohl auf die Homöostase der Lymphozyten im allgemeinen als auch nach FTY720-Behandlung. Die Adipozyten exprimieren sowohl EDG-Rezeptoren (Pages et al., 2001) als auch Chemokine (Gerhardt et al., 20001) und können damit direkten Einfluß auf die Funktion der Endothelzellen nehmen.

Aufgrund ihrer Lymphopenie-induzierende Wirkung, könnte die immunmodulierende Substanz FTY720 in Zukunft für eine Vielzahl unterschiedlicher Anwendungen eingesetzt werden, beispielsweise nicht nur bei Organtransplantationen, sondern auch bei Autoimmun-Krankheiten.