

Aus dem
Charité Centrum 14 für Tumormedizin
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. Thiel

HABILITATIONSSCHRIFT

Migration von T-Zellen und Tumorzellen

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Il-Kang Na

geboren am 05.11.1977 in Berlin

eingereicht im August 2010

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 18.04.2011

Dekanin: Prof. Dr. med. A. Grütters-Kieslich

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dolores J. Schendel

2. Prof. Dr. Andreas Mackensen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. EINLEITUNG	5
1.1. Migration	5
1.1.1. T-Zellen	5
1.1.2. Chemokinrezeptoren und Chemokine	5
1.1.3. Migration von Tumorzellen	6
1.2. Immuntherapie mit Fokus auf tumorgerichtete und koordinierte Migration	7
1.2.1. Vakzinierung	7
1.2.2. Graft-versus-host Erkrankung (GVHD)	8
1.3. <i>In vivo</i> Bildgebung	9
2. EIGENE ARBEITEN	11
2.1. Publikation 1	11
2.2. Publikation 2	13
2.3. Publikation 3	16
2.4. Publikation 4	19
2.5. Publikation 5	22
3. DISKUSSION	25
4. ZUSAMMENFASSUNG	32
5. LITERATURVERZEICHNIS	34
6. DANKSAGUNG	43

Abkürzungsverzeichnis

Allo-KMT	Allogene Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BLI	Biolumineszenzbildgebung
BLT	Biolumineszenztomographie
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCD	Charge-couples device = ladungsgekoppeltes Bauteil
CD	“Cluster of differentiation” = Unterscheidungsgruppen
CRC	Kolorektales Karzinom
CCR/ CXCR/ CX3CR/ XCR	Chemokinrezeptor
CCL/ CXCL/ CX3CL/ XCL	Chemokinligand
DP	Doppelt-positive Zellen
DR5	Death receptor 5 = Todesrezeptor 5
FasL	Fas-Ligand
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GVHD	Graft-versus-host disease = Transplantat-gegen-Empfänger Erkrankung
GTP	Guanintriphosphat
IL-2	Interleukin-2
IFN- γ	Interferon- γ
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
MHC	“major histocompatibility complex” = Haupthistokompatibilitätskomplex
MEF2C	„Myocyte-specific enhancer factor 2C” = Myozyten-spezifischer Enhancer Faktor 2C
mRNS	“messenger” (Boten) Ribonukleinsäure
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
Nf- κ B	

NSCLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PSGL-1	P-Selektin Glykoproteinligand-1
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors = Evaluationskriterien des Ansprechens bei soliden Tumoren
SDF 1	Stromal-derived factor 1
TCR	„T cell receptor“ = T-Zellrezeptor
tGVHD	Thymische GVHD
TH1	Typ1 T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
VHL	von Hippel-Lindau

1. EINLEITUNG

1.1. Migration

1.1.1. T-Zellen

Das Immunsystem unterscheidet sich sowohl durch seine Komplexität als auch durch seine Mobilität von allen anderen Organsystemen. Immunzellen besitzen die Eigenschaft in nahezu alle Gewebe zu wandern. Das "Trafficking" (Zellverkehr) von Immunzellen beschreibt die Bewegung und Migration von Immunzellen zwischen verschiedenen Organen im Körper. Insbesondere T-Zellen sind für die Immunantwort unentbehrlich (1). Die einzelnen Schritte der T-Zellentwicklung, von der Differenzierung aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, über die Reifung von T-Zellvorläuferzellen im Thymus, bis zur Migration von naiven T-Zellen in die sekundären, lymphatischen Organe und Weiterentwicklung zu Gedächtnis-/ Effektorzellen, bedürfen einer sequentiellen, koordinierten Aktivität von Adhäsions- und Chemokinrezeptoren sowie Signalmolekülen.

Die Suche nach Pathogenen oder Antigenen führt die T-Zellen durch den gesamten Organismus. Hierbei unterscheiden sich die Wege der einzelnen T-Zellen in Abhängigkeit vom Reife- und Aktivierungsgrad (2). Naive und Effektor-/ Gedächtnis-T-Zellen exprimieren ein unterschiedliches Muster an Rezeptoren und Liganden. Das Migrationspotential Antigen-erfahrener T-Zellen ist dabei facettenreicher als das der naiven T-Zellen.

Die Migration der Zellen unterliegt einer strengen, kontrollierten Kaskade von Ereignissen, beginnend mit der Anbindung an das Endothel. Lokale Chemokine initiieren daraufhin die Integrin-vermittelte Adhäsion, gefolgt von einem Arrest und der endothelialen Transmigration in das Organparenchym (3).

Adaptive Immunantworten sind abhängig vom Aufeinandertreffen und der Interaktion verschiedener Immunzellen (z.B. Dendritischen Zellen, T- und B-Zellen). Auf diese Weise kommt es zu einem effizienten Kontakt zwischen Lymphozyten und den pathogenen Antigenen, die auf verschiedenen Wegen in den Körper gelangen. Die Immunantwort wird dabei durch Zell-Zellkontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen, sowie Interaktionen mit der Zellmatrix initiiert.

1.1.2. Chemokinrezeptoren und Chemokine

Die Entdeckung des Chemokinsystem, bestehend aus Chemokinrezeptoren und

Chemokinen, ermöglicht ein besseres Verständnis für die zielgerichtete Migration von Immunzellen. Chemokine (4 Familien: CCL, CXCL, CX3CL oder XCL) und ihre korrespondierenden Chemokinrezeptoren (CCR, CXCR, CX3CR oder XCR) sind die Hauptregulatoren der Lymphozytenmigration. Sie koordinieren die Lymphozytenmigration im Körper während der Immunsystemüberwachung und delegieren die Bewegung durch komplexe "microenvironments" (Mikroumgebungen) während der Lymphozytenentwicklung und -differenzierung. Beim Chemokinsystem handelt es sich um eine wachsende Familie, die im Menschen zurzeit aus 50 Chemokinen und 20 Chemokinrezeptoren besteht. Chemokine sind kleine (8-10 kDa) Proteine, chemotaktische Zytokine, die die Zellmigration durch Interaktion mit G-protein gekoppelten transmembranösen Chemokinrezeptoren initiieren (4, 5). Neben ihrer Rolle als „Lockstoffe“, sind sie zudem in andere biologische Prozesse involviert, einschließlich Wachstumsregulation, Hämatopoese, Organentwicklung und Angiogenese. Chemokine und ihre korrespondierenden Rezeptoren können grob in drei Gruppen unterteilt werden: a) konstitutiv exprimierte, die hauptsächlich in das basale Trafficking und „Homing“ (zielgerichtete Migration) eingebunden sind, b) induzierbare, die im Entzündungsprozess eine Rolle spielen und c) solche, die beide Aufgaben übernehmen (2).

Die Aktivierung der Chemokinrezeptoren resultiert in der Aktivierung von verschiedenen Signalkaskaden, wie Calcium, cAMP, Phospholipiden, Ras und andere GTPasen. Eine Rezeptorexpression führt zu einer Migration der Zelle, wenn es einen Chemokingradienten gibt. Chemokine werden in bestimmten Geweben exprimiert und lenken das Homing von hämatopoetischen Zellen zu spezifischen Zielorganen.

Die Komplexität des Chemokinnetzwerkes erschwert seine definitive Charakterisierung und offene Fragen bleiben, so zum Beispiel: Wie koordinieren Chemokine das Zusammentreffen verschiedener Immunzellen zum effizienten Informationsaustausch und auf welche Weise kann Spezifität gewährleistet werden trotz offensichtlicher Redundanz zwischen Liganden und Rezeptoren?

1.1.3. Migration von Tumorzellen

Der Metastasierungsprozess ist komplex und verantwortlich für die meisten

tumorbedingten Todesfälle. Neue therapeutische Ansätze könnten die Migration von Tumorzellen zu Fernorganen blockieren. Die Tumormetastasierung erfordert eine zelluläre Transformation, Angiogenese, die Invasion durch eine extrazelluläre Matrix und den Eintritt in die Zirkulation. Dabei teilt die organspezifische Tumormetastasierung viele Gemeinsamkeiten mit der koordinierten Migration von Immunzellen. Eine für lange Zeit ungeklärte Frage war, wodurch das unterschiedliche Metastasierungsverhalten unterschiedlicher Tumoren bedingt ist. Mit der wegweisenden Arbeit von Müller et al. wurde klar, dass Tumorzellen den Chemokin-vermittelten Mechanismus für den Prozess der Metastasierung ausnutzen (6) und ebenfalls spezifische Muster an funktionelle Chemokinrezeptoren exprimieren. Dabei stellen die tumorabhängigen Orte ergiebige Quellen der Chemokine dar, die mit den Tumorzell-assoziierten Rezeptoren korrespondieren.

Neben der Steuerung der Migration konnte die Überexpression von Chemokinrezeptoren auch mit funktionellen Qualitäten assoziiert werden (7). Die Rolle der Chemokine und ihrer korrespondierenden Chemokinrezeptoren für Tumoren lassen sich in drei große Kategorien einteilen: 1) Gewährleistung von Richtungshinweisen für Migration/Metastasierung, 2) Modulation des Tumorumfeldes, 3) Übermittlung von Überlebens- und Wachstumshormonen.

1.2. Immuntherapie mit Fokus auf tumorgerichtete und koordinierte Migration

1.2.1. Vakzinierung

Während der letzten 10 Jahre wurden Vakzinierungen von Tumor-spezifischen Antigenen entwickelt und in klinischen Studien getestet, um Tumor-spezifische T-Zellen zu generieren. Viele klinische Phase I/II-Studien konnten die Induktion einer T-Zellantwort gegen Tumoren über Vakzinierung bestätigen (8-11). Remissionen nach RECIST Kriterien konnten über Vakzinierung jedoch nur in einigen Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung erzielt werden (12, 13).

Die klinische Insuffizienz Tumor-spezifischer T-Zellen könnte durch eine fehlende Migration in das Tumorgewebe oder mangelnde Aktivierung im Tumorgewebe bedingt sein. Die Produktion von immunmodulatorischen Zytokinen durch die Tumorzellen und die Inhibition der Funktion und Aktivierung von Immunzellen spielt eine wichtige Rolle in der Schwächung des Immunsystems. Wachstum und

Metastasierung von Tumorzellen werden hierbei als erfolgreiches Entfliehen vor der „immunosurveillance“ (Überwachung und/oder Unterdrückung durch das Immunsystems) gesehen (14, 15).

Aktuelle Studien in der Tumorzellforschung zeigen vielversprechende Ergebnisse mittels Vakzinierung in der adjuvanten Situation (8).

1.2.2. Graft-versus-host Erkrankung (GVHD)

GVHD wird über alloreaktive T-Zellen vermittelt und führt zu Mortalität-assoziierten Nebenwirkungen und einer protrahierten Immunschwäche, die mit einem erhöhten Risiko für Infektionen und Tumorrezidive einhergehen kann (16-18). Der Erfolg der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (allo-KMT), als effektivste Immuntherapie für maligne Erkrankungen und einzige kurative, therapeutische Option bei vielen Patienten mit hämatologischen Neoplasien, wird durch die Graft-versus-Host Erkrankung (GVHD) deutlich gemindert, die sich v.a. an der Haut und Schleimhaut abspielt. Ein Modell für die Entstehung der GVHD von Ferrara et al. geht von drei aufeinander folgenden Phasen aus (19). In der ersten Phase erzeugt die Konditionierung mit Chemotherapie oder Ganzkörperbestrahlung einen Gewebeschaden vom Empfängergewebe. In der zweiten Phase kommt es zur Präsentation von Antigenen durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und die Aktivierung bzw. Proliferation von Typ1 T-Helferzellen (TH1). Diese aktivierten TH1-Zellen sezernieren eine Reihe von Zytokinen, wie z.B. Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ), was zu einer weiteren Expansion von T-Zellen und myeloischen Zellen, wie z.B. Makrophagen und Monozyten, führt. Die dritte Phase, die Effektorphase, ist geprägt von der Infiltration alloreaktiver T-Zellen in die Zielorgane der GVHD, die dort zu Entzündung und Gewebeschaden führen.

Die zunehmend umfassendere Kenntnis über die Chemokinrezeptoren/-liganden, die für die gerichtete Migration der alloreaktiven T-Zellen in die Zielorgane verantwortlich sind, ermöglicht die Entwicklung von Strategien zur Blockierung dieser Trafficking-Moleküle; dies könnte somit zur Abschwächung oder sogar Inhibition der GVHD führen.

1.3. Monitoring von Immunzellmigration

Zellmigration stellt einen maßgeblichen Bestandteil für die Entwicklung und das Funktionieren des Immunsystems dar. Die Möglichkeit des Monitoring der Migration ist somit Voraussetzung für das Verständnis der Rolle spezifischer Zellen und den Ablauf von Immunantworten, sowie Krankheitsprozessen.

1.3.1. Analyse der Chemokinrezeptorexpression und Migrationsassays

Immunzellen sind in der Lage, ihr homeostatisches Migrationsprogramm z.B. im Falle einer Infektion zu ändern. Die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren kann somit moduliert und an bestimmte Situationen angepasst werden. Die Chemokinrezeptorexpression ist sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene reguliert (20-26). Auf der post-transkriptionellen Ebene führen Veränderungen der Rezeptortranslation, Desensibilisierung durch Internalisierung und Degradation zur Regulierung der Chemokinrezeptorexpression. Variante Formen der Chemokinrezeptoren/Chemokine unterscheiden sich in ihrer Rezeptoraffinität, ihrer Spezifität und den intrazellulären Signalkaskaden. Das wiederum hat großen Einfluss auf ihr chemotaktisches Potenzial.

Die Analyse der Chemokinrezeptorexpression kann auf transkriptioneller Ebene über Polymerase Kettenreaktion (PCR) oder auf Proteinebene über Antikörperfärbung und Detektion mittels Durchflusszytometrie, Immunhistochemie/-fluoreszenz oder Western blot erfolgen. Die Chemokinrezeptorfunktion kann über *ex vivo* Tests wie Migrations/-Invasionsassays und durch die Bestimmung der Aktinpolymerisation oder des Calcium-Flux in Reaktion auf spezifische Chemokine getestet werden (Publikation 1 und 2).

1.3.2. *In vivo* Bildgebung

Die dynamische Visualisierung von Zellen ermöglicht ein tieferes Verständnis über das komplexe System der Migration *in vivo*. Um das Schicksal von Immunzellen und deren funktionale Veränderungen, die mit Migration und Proliferation assoziiert sind, bestimmen zu können, bedarf es *in vivo* Messungen im Kontext eines intakten Organsystems.

Es sind verschiedene bildgebende Verfahren verfügbar, um strukturelle Informationen zu erlangen, wie z.B. die Computertomographie oder

Magnetresonanztomographie. Neuere Methoden ermöglichen jedoch die Bildgebung zellulärer und molekularer Veränderungen, wie sie im lebenden Organismus passieren. Zu diesen Methoden zählt unter anderem die Biolumineszenzbildgebung (BLI) (27).

BLI wird allgemein für präklinische zelluläre und molekulare Bildgebung in Kleintieren genutzt. Biolumineszenz bezieht sich auf ein Licht, das über eine enzymatische Reaktion des Enzyms Luziferase und dessen Substrat produziert wird. Verschiedene Luziferaseenzyme (Firefly, Renilla, Click-beele, Gaussia) von unterschiedlichen Organismen besitzen einzigartige, charakteristische Lichtspektren und Substratanforderungen. Reagieren Substrat und zugehörige Luziferase miteinander – in Abhängigkeit des Substrates handelt es sich hierbei um eine Adenosintri-phosphat (ATP)-abhängige oder ATP-unabhängige Reaktion – kommt es zur Emission von Licht. Dieses Licht wird *in vivo* über eine CCD (charge-couples device) Kamera nach Injektion von D-Luziferin/ Coelenterazine detektiert. Dadurch können simultan spektrale und zeitliche Messungen der Biolumineszenzereignisse erfasst werden. Die nicht-invasive Bildgebung ermöglicht das wiederholte Monitoring von Zellen und ihrer Migration in einem einzelnen Tier und perspektivisch auch im Menschen. Neben der Migration können aber auch funktionelle Informationen, wie z.B. die Proliferation oder die Aktivierung durch Hinzunahme von genetischen Kontrollelementen, erfasst werden.

2. EIGENE ARBEITEN

2.1. Publikation 1

Na IK, Busse A, Scheibenbogen C, Ghadjar P, Coupland SE, Letsch A, Loddenkemper C, Stroux A, Bauer S, Thiel E, Keilholz U.

Identification of truncated chemokine receptor 7 in human colorectal cancer unable to localize to the cell surface and unreactive to external ligands. *Int J Cancer* 2008,123:1565-1572.

Der Chemokinrezeptor CCR7 steuert die Migration von Immunzellen in den Lymphknoten. CCR7 ist auf verschiedenen Tumorzelllinien überexprimiert, und eine Assoziation mit Lymphknotenmetastasen ist für einige Tumore beschrieben worden, darunter Magenkarzinom, Ösophagusplattenepithelkarzinom, nicht kleinzelliges Lungenkarzinom und Melanom. Studien für das kolorektale Karzinom (CRC) sind umstritten. Während Günther et al. (28) eine Assoziation zwischen CCR7 und Lymphknotenmetastasierung zeigen konnten, fanden Schimanski et al. keine signifikante Korrelation (29).

In unserer Studie untersuchten wir kolorektale Karzinomzelllinien und Tumorgewebe. Die CCR7 Proteinexpression beschränkte sich auf das Zytoplasma, eine Zelloberflächenexpression fehlte. Anschließende CCR7 DNA, mRNA und Proteinlevel sowie funktionelle Analysen ergaben eine Splicevariante des CCR7 mit fehlendem Signalpeptid. Die meisten der menschlichen Proteine besitzen ein Signalpeptid, das die Translokation des Proteins über das endoplasmatische Retikulum an die Zelloberfläche vermittelt.

Hiermit deuten unsere Studienergebnisse daraufhin, dass für das CRC eine CCR7 Molekülvariante ohne intaktes Signalpeptid über alternatives Splicing oder posttranskriptionelle mRNA Modifikation gebildet wird und es somit nicht an die Zelloberfläche transportiert wird. Wir klärten jedoch in dieser Studie nicht die Frage, aus welchen Gründen CRC Zellen große Mengen an zytoplasmatischem CCR7 exprimieren, das keine externe Liganden bindet. Eine Spekulation wäre ein indirekter Wachstums- bzw. Überlebensvorteil für CRC Zellen durch akkumuliertes, zytoplasmatisches CCR7. Da wir jedoch keine Expression von korrespondierenden Liganden durch die CRC Zellen nachweisen konnten, scheint eine solche

autokrine Stimulation unwahrscheinlich. Eine parakrine Stimulation wäre über eine neue Subfamilie von Chemokinrezeptoren, die CCL 19 effizienter internalisieren als CCR7, vorstellbar (30, 31).

Publikaton 1

Na IK, Busse A, Scheibenbogen C, Ghadjar P, Coupland SE, Letsch A, Lodenkemper C, Stroux A, Bauer S, Thiel E, Keilholz U.

Identification of truncated chemokine receptor 7 in human colorectal cancer unable to localize to the cell surface and unreactive to external ligands.

Int J Cancer 2008,123:1565-1572.

2.2. Publikation 2

Na IK, Scheibenbogen C, Adam C, Stroux A, Ghadjar P, Thiel E, Keilholz U, Coupland SE.

Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis. *Hum Pathol* 2008,39:1751-1755.

Die Lymphknotenmetastasierung ist einer der wichtigsten Faktoren des "TNM Klassifikationssystem" zur Bestimmung der Prognose. Für die nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (NSCLC) ist der Mechanismus der Lymphknotenmetastasierung bisher nur partiell verstanden. Immer mehr Studien weisen darauf hin, dass das Chemokin SDF-1 (stromal-derived factor 1 α (CXCL12)) und sein Rezeptor eine wichtige Rolle für die Metastasierung verschiedener Tumorentitäten spielen. Da NSCLC Zellen ebenfalls funktionelles CXCR4 exprimieren und die Blockade von CXCL12 in immunsupprimierten Mäusen mit NSCLC zur Inhibition von Organmetastasen führte, untersuchten wir die Rolle von CXCR4/ CXCL12 für den Prozess der Lymphknotenmetastasierung.

In einer Studie von 46 Patienten mit primären NSCLC, davon 24 ohne (N0) und 22 mit Lymphknotenmetastasen (N1-3), bestimmten wir die nukleäre und zytoplasmatische CXCR4 Expression in den primären Tumorgeweben und analysierten potentielle Assoziationen zwischen Lymphknotenmetastasen, CXCR4 Expression, T/M Stadium und Tumorgrad. Hierbei ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen nukleären CXCR4 und dem Tumorstadium ($p=0.004$, Fishers Test) wie auch der Lymphknotenmetastasierung ($p=0.008$, lineare Assoziation). Für das zytoplasmatische CXCR4 zeigte sich keine signifikante Assoziation mit den evaluierten Parametern. Nukleäres CXCR4 ist bereits in Lungentumoren, aber auch anderen Tumoren (Mammakarzinom, Nasopharynx-Karzinom und Hepatozelluläres Karzinom) beschrieben worden, seine Aufgabe und Wirkungsmechanismen sind dabei jedoch noch unklar. Insgesamt wird die Rolle nukleärer Chemokinrezeptoren/-liganden noch kontrovers diskutiert. Eine Splicevariante des CCR10 Liganden CCL27, transloziert in den Nukleus, unterstützt das zytoskeletale Rearrangement und die Migrationskapazität. Unsere Studienergebnisse lassen ebenfalls vermuten, dass nukleäres CXCR4 eine Rolle für die Tumormetastasierung in die Lymphknoten spielt.

Publikation 2

Na IK, Scheibenbogen C, Adam C, Stroux A, Ghadjar P, Thiel E, Keilholz U, Coupland SE.

Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis.

Hum Pathol 2008,39:1751-1755.

2.3. Publikation 3

Na IK, Keilholz U, Letsch A, Bauer S, Asemissen AM, Nagorsen D, Thiel E, Scheibenbogen C.

Addition of GM-CSF to a peptide/KLH vaccine results in increased frequencies of CXCR3-expressing KLH-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56:391-396.

Die Induktion Antigen-spezifischer T-Zellen bezeichnet man als ‚Priming‘. In Abhängigkeit der lokalen Umgebung des Primings kommt es zu einer spezifischen Chemokinrezeptorexpression auf den T-Zellen. Eine Beeinflussung der lokalen Umgebung und damit der Migration spezifischer T-Zellen durch ortsspezifische Vakzinierung ist daher vorstellbar und könnte im Rahmen eines Therapieansatzes vorteilhaft genutzt werden.

CXCR3 spielt eine wichtige Rolle für das Homing von T-Zellen zu entzündlichem Geschehen. Seine spezifischen Liganden CXCL9, CXCL10, und CXCL11 werden häufig in entzündeten Organen sowie Tumorgeweben (32, 33) exprimiert. Untersuchungen von Melanompatienten ergaben eine Assoziation zwischen Expression von CXCR3 auf Melanompeptid-stimulierten T-Zellen mit einem verbesserten Überleben (34). Aus diesem Grunde gibt es bei der Entwicklung von Vakzinen gegen Tumoren und Infektionserkrankungen das Interesse, Strategien zur Steigerung der CXCR3 Expression auf Antigen-spezifischen T-Zellen zu entwickeln.

GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) ist ein häufig verwendetes Adjuvanz zur Steigerung der Immunogenität von Proteinen oder Peptiden. Es stimuliert die Aktivierung und Migration von dendritischen Zellen. Zudem induziert es die Expression von MHC Klasse II Molekülen. Die Zugabe von GM-CSF zu Protein-, Peptid- oder Gentransfer-basierten Vakzinierungen resultierte in einer gesteigerten Antitumor-Immunantwort durch eine Verbesserung der T-Zellimmunantwort (35, 36). Klinische Studien zeigten sogar ein verbessertes klinisches Ansprechen durch GM-CSF allein oder als Adjuvanz (10, 37).

Wir untersuchten die T-Zellantworten gegen das Neoantigen Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH), das in Kombination mit Tyrosinasepeptiden als unspezifisches T-Helferprotein im Rahmen einer Vakzinierungstherapie Melanompatienten

verabreicht worden war und bei allen Patienten der Untersuchung eine gut detektierbare CD4 Immunantwort induzierte. Insgesamt wurden sechs Zyklen intradermale und subkutane Injektionen KLH mit Tyrosinasepeptiden verabreicht. Zudem erhielt eine Gruppe von Patienten ebenfalls am selben Injektionsort GM-CSF. Wir konzentrierten uns hierbei auf die CXCR3 Expression der spezifischen T-Zellen und verglichen Melanompatienten, die GM-CSF als Adjuvanz erhalten (N=8) oder nicht erhalten hatten (N=7).

Die KLH-reaktiven T-Zellen wurden mit Antikörpern gegen CXCR3, CCR9 und CCR4 gefärbt. CCR9 ist assoziiert mit einem Homing zum Darm, und CCR4 ist assoziiert mit einem Homing zur Haut. Der Anteil an CXCR3 exprimierenden, KLH-reaktiven CD4+ T-Zellen war signifikant höher in der Gruppe, die zusätzlich GM-CSF erhalten hatte. Ein höherer Prozentsatz an CXCR3+ KLH-reaktiven CD4+ T-Zellen konnte bis zu 17 Monate nach Immunisierung nachgewiesen werden. Der Anteil an CCR4+ oder CCR9+ KLH-reaktive T-Zellen war in der Gruppe mit und ohne GM-CSF vergleichbar. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass GM-CSF als Vakzineadjuvanz die T-Zellantwort qualitativ beeinflussen, und somit die Voraussetzungen für eine gesteigerte Migration Vakzine-induzierter T-Zellen in entzündetes Gewebe bzw. Tumorgewebe schaffen kann. Mit dieser Studie waren wir die ersten, die zeigten, dass über Manipulation des Vakzinemilieus die Chemokinrezeptorexpression der spezifischen T-Zellen beeinflussbar ist.

Publikation 3

Na IK, Keilholz U, Letsch A, Bauer S, Asemissen AM, Nagorsen D, Thiel E, Scheibenbogen C.

Addition of GM-CSF to a peptide/KLH vaccine results in increased frequencies of CXCR3-expressing KLH-specific T cells.

Cancer Immunol Immunother 2007, 56:391-396.

2.4. Publikation 4

Na IK*, Lu SX*, Yim N, Goldberg GL, Tsai J, Rao U, Smith OM, King CG, Suh D, Hirschhorn-Cymerman D, Palomba L, Penack O, Holland AM, Jenq RR, Ghosh A, Tran H, Merghoub T, Liu C, Sempowski GD, Ventevogel M, Beauchemin N, van den Brink MRM.

The Cytolytic Molecules Fas ligand and TRAIL are required for thymic Graft-versus-Host-Disease. *J Clin Invest* 2010 Jan; 120(1):343-56.

Die allo-KMT stellt für eine Anzahl von malignen und nicht-malignen Erkrankungen eine potentiell heilende Therapieoption dar, ist aber häufig gefolgt von lang andauernder und ausgeprägter Immundefizienz, die mit hoher Inzidenz an Infektionen und malignen Rezidiven einhergehen kann (16, 18). Ein geschwächtes Immunsystem erlaubt außerdem auch nicht die Applikation von immuntherapeutischen Therapien, wie Vakzinierung gegen Infektionserreger oder Tumoren. Verschiedene Faktoren bestimmen dabei Grad und Dauer der Immunschwäche, unter anderem vorangegangene Chemotherapien/ Bestrahlungen, Alter des Empfängers, Inkompatibilität von Spender und Empfänger und Graft-versus-host Erkrankung (GVHD).

Klinische Studien lassen vermuten, dass Ursachen für eine verminderte T-Zellimmunität nach Transplantation ein Defizit bzw. in Repertoire und Funktion eingeschränkte T-Zellen sind. Ein breites T-Zellrepertoire bedarf der *de novo* Generation von T-Zellen im Thymus (38). Die Thymusfunktion wird jedoch durch den Gewebsschaden, der durch Konditionierungstherapie und thymische GVHD (tGVHD) im Rahmen der allo-KMT verursacht wird, limitiert. tGVHD wird durch infiltrierende alloreaktive Spender T-Zellen verursacht, die die Architektur und Zusammenstellung der Mikroumgebung des Thymus verändern. Da eine effektive T-Zellentwicklung und ein breites T-Zellrepertoire in kritischem Maße von einer regulär strukturierten Thymusmikroumgebung abhängen, kann eine tGVHD mit T-Zell-Lymphopenie und limitierten T-Zellrepertoire, sowie autoimmunen T-Zellklonen einhergehen. Ursache hierfür sind eine verminderte Zellularität des Thymus durch vermehrte Apoptose doppelt-positiver CD4⁺CD8⁺ (DP) Thymozyten und eine gescheiterte Weiterentwicklung der T-Vorläuferzellen.

Unsere Studien in klinisch-relevanten GVHD-Mausmodellen schafften Einblick in

den Mechanismus der tGVHD. Wir konnten zeigen, dass der Thymus ein sehr sensibles GVHD Organ ist und schwere Schäden und Funktionsverluste bereits bei geringgradiger GVHD eintreten. Die Chemokinrezeptoren CCR9, L-Selektin, PSGL-1, die Integrinuntereinheiten α_E und β_7 , CCR2, und CXCR3 zeigten sich relevant für die Migration alloreaktiver T-Zellen zum Thymus. Die Zytokine FasL und TRAIL konnten als Vermittler der Thymusschädigung identifiziert werden. Bereits wenige Spender-T-Zellen waren in der Lage, GVHD im Thymus bei jungen und älteren Mäusen hervorzurufen, was vermuten lässt, dass tGVHD auch bei älteren Patienten relevant sein könnte.

Strategien, die Interaktionen Fas/ Fas-Ligand oder TRAIL/ DR5 blockieren, könnten tGVHD vermindern und damit zu einer gesteigerten T-Zellrekonstitution, verminderter Morbidität und verlängerten Überleben der allogenen transplantierten Patienten führen.

Publikation 4

Na IK*, Lu SX*, Yim N, Goldberg GL, Tsai J, Rao U, Smith OM, King CG, Suh D, Hirschhorn-Cymerman D, Palomba L, Penack O, Holland AM, Jenq RR, Ghosh A, Tran H, Merghoub T, Liu C, Sempowski GD, Ventevogel M, Beauchemin N, van den Brink MRM.

The Cytolytic Molecules Fas ligand and TRAIL are required for thymic Graft-versus-Host-Disease.

J Clin Invest 2010 Jan; 120(1):343-56.

2.5. Publikation 5

Na IK, Markley JC*, Tsai J*, Yim N, Beattie BJ, Klose AD, Holland AM, Ghosh A, Rao UK, Stephan MT, Serganova I, Santos EB, Brentjens RJ, Blasberg RG, Sadelain M, and van den Brink MRM.

Concurrent visualization of trafficking, expansion and activation of T lymphocytes and T cell precursors in vivo. *Blood*. 2010 Sep 16;116(11):e18-e25.

Biolumineszenzbildgebung ermöglicht ein nicht-invasives Erfassen von Zellen *in vivo*. Mittels verschiedener Luziferaseenzyme mit charakteristischen Substratnotwendigkeiten und Spektromeigenschaften kann das Überleben, die Proliferation und die Lokalisation von Zellen im lebenden Organismus analysiert werden. Wir entwickelten eine neue Methode, um Primärzellen in ihrer örtlich-zeitlichen Verteilung *in vivo* darzustellen, und hierbei simultan Informationen über ihre Aktivierung zu erfassen. Dafür kombinierten wir eine NFAT-induzierbare Click-Beetle Luziferase und eine konstitutive Membran-verankerte Gaussia Luziferase. NFAT (Nuclear factor of Activated T cells) ist eine Familie von Transkriptionsfaktoren mit fünf Mitgliedern NFAT 1-5 (39). In ruhenden T-Zellen befinden sich phosphorylierte NFAT Proteine im Zytoplasma. Wenige Minuten nach T-Zellrezeptoraktivierung, gekoppelt mit einer Calcium-Signalkaskade, kommt es zu einer Translokation des dephosphorylierten NFAT in den Nukleus (40). Hier bindet es an die NFAT-Bindungsstelle, was zur Transkription der nachgeschalteten Gensequenz führt.

Wir konstruierten einen Vektor, der NFAT-Bindungsstellen und eine Click-beetle Luziferase in Reihe kodiert, so dass die Aktivierung von NFAT zur Transkription der Click-beetle Luziferase führte. Wir nutzen die etablierte Methode, um 1) die örtlich-zeitliche Migration und Aktivierung von alloreaktiven T-Zellen im Rahmen der allo-KMT und 2) die Migration und Entwicklung adoptiv transferierter T-Zellvorläuferzellen im Rahmen der Immunrekonstitution bildgebend darzustellen.

Die alloreaktiven T-Zellen wanderten in den ersten Tagen nach allo-KMT in die peripheren Lymphknoten und den Darm, wobei deren Aktivierung sich jedoch vorwiegend auf den Darm konzentrierte. Dies ließ eine wichtige Rolle für den Darm in der ersten Phase der Alloaktivierung in der Entwicklung von GVHD vermuten.

Zur Untersuchung der T-Zellvorläuferzellen benutzten wir das TCR transgene HY Mausmodell (41). Die Zellen dieses Modells sind homozygot für das TCR H-Y Transgen und exprimieren einen $\alpha\beta$ TCR, spezifisch für das Minor-Histokompatibilitätsantigen (H-Y), das auf dem Y-Chromosom kodiert wird und nur in männlichen Mäusen exprimiert wird. Thymozyten dieser TCR H-Y transgenen Maus werden positiv selektioniert in weiblichen, jedoch aussortiert in männlichen Rezipienten.

Da NFAT eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Positivselektion von Thymozyten spielt (39, 42), transferierten wir adoptiv *in vitro*-entwickelte, weibliche H-Y TCR transgene T-Zellvorläuferzellen in weibliche und männliche Empfängermause. Eine NFAT Signalkaskadenaktivierung durch Selektion und Entwicklung der Thymozyten erfassten wir nur in den weiblichen Empfängermäusen.

Da NFAT eine wichtige Rolle für die Regulation des Zellzyklus, die Angiogenese und die Zelldifferenzierung in verschiedenen Zelltypen spielt (43, 44), könnte unsere Methode für neue Fragestellungen unterschiedlicher biologischer Prozesse verwendet werden. Auch zeigten Tumorstudien, dass deregulierte NFAT-Signalkaskaden in Zusammenhang mit pro-onkogenen Prozessen in soliden Tumoren (45-48), Lymphomen und lymphatischen Leukämien (49-51) stehen.

Der von uns etablierte Vektor ermöglichte somit, die Migration von T-Zellen und Tumorzellen *in vivo* zu untersuchen, und zudem funktionelle Information über eine NFAT Aktivierung zu gewinnen.

Publikation 5

Na IK, Markley JC*, Tsai J*, Yim N, Beattie BJ, Klose AD, Holland AM, Ghosh A, Rao UK, Stephan MT, Serganova I, Santos EB, Brentjens RJ, Blasberg RG, Sadelain M, and van den Brink MRM.

Concurrent visualization of trafficking, expansion and activation of T lymphocytes and T cell precursors in vivo.

Blood. 2010 Sep 16;116(11):e18-e25

3. DISKUSSION

Das Chemokinsystem übernimmt eine wesentliche Rolle in der Steuerung der Zellmigration. Obwohl Chemokinrezeptoren/Chemokine ursprünglich als chemotaktische Moleküle für die Migration von Immunzellen identifiziert worden sind, stellte sich im Verlauf heraus, dass diese Proteine auch in die Ausbreitung von Tumorzellen involviert sind. Seit der Arbeit von Müller et al. (6), die zum ersten Mal die Rolle der Chemokinrezeptoren als Schlüsselmoleküle für die Tumormetastasierung charakterisierten, wurden viele Studien hinsichtlich dieser Thematik veröffentlicht. Chemokine und ihre Rezeptoren beeinflussen neben der Metastasierung auch andere Funktionen der Tumorprogression: Rekrutierung von Leukozyten, Einflussnahme auf Angiogenese, zelluläre Seneszenz sowie Proliferation, Überleben und Invasion der Tumorzellen. Hierbei wird die Chemokinrezeptorexpression auf den Tumorzellen sowohl durch die Tumormikroumgebung als auch durch Onkogene und deregulierte Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Hypoxie und Zytokinreichtum in der Tumormikroumgebung können die Transkription von bestimmten Chemokinrezeptoren induzieren (21, 23, 24). Hypoxie induziert zum Beispiel die CXCR4 Transkription über den Hypoxie-induzierten Faktor-1 (HIF-1). HIF-1 unterstützt auch die Transkription von CCR7, CXCR1 und CXCR2 (25, 26). Beim Melanom ist die konstitutive Aktivierung des Nf- κ B verantwortlich für die CXCL1 Produktion (52), und bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) induzieren hohe Level an MEF2C eine Überexpression von CCL2, CCL3 und CCL4 (53). TNF- α führt zu einer gesteigerten Expression von CXCR4 mit Folge einer vermehrten peritonealen Aussaat (54). CXCR4 und CCR5 können über den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor oder seinen Rezeptor aktiviert werden (55, 56).

Das Chemokinsystem wird ebenfalls über Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen moduliert, so führt z.B eine Mutation des VHL (von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein) in Nierenzellkarzinomzellen zum Funktionsverlust, so dass es zu einer konstitutiven Aktivierung von HIF-1 induzierten Genen und somit zu einer gesteigerten Expression von CXCR4 und CCR7 kommt.

Erkenntnisse über die bedeutende, facettenreiche Funktion des Chemokinsystem eröffnete neue Optionen alternativer Strategien zur Inhibition von pathologischen Immunreaktionen, wie Autoimmun-erkrankungen und entzündlichen Erkrankungen,

aber auch Tumorprogression und –metastasierung. Die Entwicklung von Antagonisten wird seit mehreren Jahren mit Nachdruck vorangetrieben. Zwei Studien zeigten deutliche Effekte für Antagonisten gegen TH2 Chemokine und $\alpha 4\beta 7$ Integrine in einem Tiermodell für Asthma (57, 58). Antikörper gegen $\alpha 4$ Integrine blockierten in einem Mausmodell für Multiple Sklerose die Entwicklung einer experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (59). Verschiedene Antikörper, rekombinante Adhäsionsmoleküle, Rezeptor-blockierende, mutante Chemokine und “small molecules” wurden als Therapien für Asthma, Multiple Sklerose, entzündliche Darmerkrankungen, Rheumatoide Arthritis, Psoriasis und andere Krankheiten getestet, wobei sich die “small molecules” als Methode der Wahl durchsetzten (60, 61). Einige “small molecules” sind bereits kommerziell erhältlich. Bei der Behandlung von Tumorerkrankungen werden Antagonisten gegen CXCR4 schon jetzt erfolgreich eingesetzt, einschließlich AMD3100 oder Peptiden wie TN14003 und CTCE-9908. TN14003 z.B. senkt signifikant die Bildung pulmonaler Metastasen (62, 63) und CTCE-9908 inhibiert Primärtumor und dessen Metastasierung im Tiermodell für Melanom, Osteosarkom, Mammakarzinom und Prostatakarzinom (64-66). AMD3100 wurde ursprünglich als ein anti-HIV Präparat entwickelt, konnte aber die Virusausbreitung in HIV Patienten nicht verhindern. Es kam jedoch dabei zu dem Zufallsbefund, dass AMD3100 CD34+ Stammzellen aus dem Knochenmark mobilisiert, so dass es aktuell zur Stammzellmobilisierung für autologe Transplantationen klinisch verwendet wird (67). Trotz signifikanter Antitumor-Effekte *in vivo* (68) führte eine langandauernde Therapie mit einem CXCR4 Antagonisten, wie es für eine Tumorbehandlung notwendig wäre, auch zu signifikanten Toxizitäten (69), welche auf gestörte homeostatische CXCR4 Funktionen zurückzuführen sind (70-72).

Die Komplexität und Redundanz des Chemokinsystem erschwert zudem die Entwicklung selektiver Chemokin-basierter Therapiestrategien. Viele Chemokine binden denselben Rezeptor, so dass Krossreaktivität zwischen Liganden und Rezeptoren in quantitativen und qualitativen Unterschieden der Zellantwort resultieren können. Die Signalkaskaden der Chemokinrezeptoren sind ebenfalls komplex, und viele Faktoren können das funktionelle Resultat beeinflussen. Zudem gibt es signifikante Überschneidungen zwischen Signalkaskaden, die im Rahmen der normalen Chemokinrezeptorfunktion wirksam sind und solchen, die in pathologischen Abläufen aktiv sind.

Auf der Suche nach tumoreigenen, spezifischen Chemokinrezeptor-funktionen und somit selektiveren Angriffspunkten für Behandlungsstrategien entdeckten wir eine zytoplasmatische CCR7 Variante im kolorektalen Karzinom (Publikation 1) und eine nukleäre CXCR4 Variante im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Publikation 2). Die fehlende Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren bedeutet somit, dass eine Migrationshemmung eigentlich nicht nutzbar ist, sich jedoch gegebenenfalls tumorspezifische Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien gegen intrazelluläre Moleküle ergeben können.

In unserer Studie zur CCR7 Expression im kolorektalen Karzinom (CRC) zeigte sich im Gegensatz zur transmembranösen Expression eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation, welche bereits beim Magen- und Ösophaguskarzinom beobachtet wurde (73, 74). Über PCR-Analysen fanden wir eine Variante des CCR7 Proteins mit fehlendem Signalpeptid. Das Signalpeptid gewährleistet den Transport von Proteinen an die Zelloberfläche. Verschiedene Szenarien für das zytoplasmatische CCR7 wären denkbar, vom Zufallsprodukt bis zu bisher unbekanntem physiologischen Funktionen. Im Falle eines Zufallsproduktes wäre eine schnelle Degradation eine logische Konsequenz, und somit eher unwahrscheinlich, da die CCR7 Variante im CRC Gewebe reichlich detektiert werden konnte. Eine lösliche Form des CCR7 wurde bisher noch nicht identifiziert, wäre aber denkbar. Lösliche Formen verschiedener Adhäsions- und Zytokinrezeptoren sind schon beschrieben worden (75). Die Tatsache, dass die normale Kolonmukosa die zytoplasmatische Variante nicht exprimierte, unterstreicht die Vermutung eines nicht-zufälligen Prozesses und lässt einen Vorteil für die CRC Zellen vermuten. Eine Variante des KAI/CD82, die ebenfalls scheiterte, an der Zelloberfläche exprimiert zu werden, wird von Magenkarzinomzellen stark überexprimiert und ist mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert. Der genaue Mechanismus ist auch hier noch nicht geklärt.

In unserer Studie zur CXCR4 Expression im primären Lungenkarzinom entdeckten wir starke Variationen hinsichtlich des zytoplasmatischen CXCR4 Proteins, und eine Untergruppe zeigte ein vorwiegend nukleär lokalisiertes CXCR4. Im Weiteren zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen der Lymphknotenmetastasierung und dem nukleären, jedoch nicht zytoplasmatischen, CXCR4. Nukleäre CXCR4 Expression ist auch bereits in anderen Tumorentitäten, wie Mammakarzinom (76,

77) und Nasopharynxkarzinom (78) beschrieben worden. Es zeichnete sich aber bisher kein eindeutiges, für die Funktion richtungsweisendes Bild ab. Obwohl das nukleäre CXCR4 im Nasopharynxkarzinom nicht mit dem klinischen Ansprechen korrelierte (78), zeigte Cabioglu et al. in einer Serien von T1 Mammakarzinomen, das die gleichzeitige Expression von zytoplasmatischen und nukleären CXCR4 höher bei Patienten ohne Lymphknotenmetastasen war (76). Trotzdem die nukleäre Lokalisation von CXCR4 bereits von mehreren Gruppen beobachtet wurde, bleibt dessen Funktion noch ungeklärt. Unsere Studie lässt vermuten, dass eine Überexpression des CXCR4 im Nukleus die Metastasierung von Lungenkarzinomzellen in die Lymphknoten begünstigt. Weitere Studien in größeren Patientengruppen sind notwendig, um dieses zu bestätigen. Eine mögliche therapeutische Konsequenz wäre, Patienten mit primärem Lungenkarzinom im frühen Stadium und Nachweis nukleärer CXCR4 Expression für eine intensivere adjuvante Chemotherapie zu evaluieren.

Trotz des enormen Zugewinns an Verständnis über die Rolle des Chemokinsystems für Immun- und Tumorzellen, bleiben viele offene Fragen: Für welches Signal entscheiden sich Leukozyten, wenn sie mit unterschiedlichen Chemokinen konfrontiert werden? Wie entscheiden sie darüber, ob und wie sie auf bestimmte Signale reagieren? Gibt es eine zentrale Führung, die über Präsentation von Chemokinrezeptoren/ Chemokinen im Gesamtkonzept entscheidet? Gibt es Negativ-Modulatoren der Migration? Ein tieferes Verständnis über die Regulation der Chemokinrezeptoren ermöglichte gleichzeitig auch ihre Manipulation zu therapeutischen Zwecken.

Eine Vorbedingung für eine effektive T-Zelltherapie ist die Migration Antigen-spezifischer T-Zellen in den Tumor (79). Die Hinzunahme von GM-CSF zu Peptid- oder Proteinvakzinierungen führt zu einer Steigerung der Antitumor-Immunantwort (35, 36) und verbessert das klinische Ansprechen (10, 37). Obwohl gezeigt wurde, dass GM-CSF in der Lage ist, die Expression von CXCR3 auf CD34+ Stammzellen zu induzieren (80), konnte kein direkter Effekt des GM-CSF auf T-Zellen nachgewiesen werden. Da GM-CSF bekannt dafür ist, dendritische Zellen zur Injektionsstelle zu locken (81), untersuchten wir (Publikation 3), inwieweit eine Erweiterung der Vakzine mit GM-CSF die Chemokinrezeptorexpression auf den Vakzine-induzierten T-Zellen beeinflussen kann. GM-CSF verändert das lokale Vakzinemilieu so, dass es über Beeinflussung des Imprintings zu einer

gesteigerten Expression von CXCR3 auf Vakzine-induzierten T-Zellen führt. Eine zielgerichtete Migration in Tumorgewebe könnte auf diese Weise verbessert werden, da CXCR3 korrespondierende Liganden häufig im Tumorgewebe vorliegen (32, 33). Unsere Ergebnisse zeigten zum ersten Mal, dass GM-CSF als Vakzineadjuvanz auch das Migrationspotential Vakzine-induzierten T-Zellen beeinflussen kann.

Des Weiteren untersuchten wir die Hauptakteure für die Infiltration alloreaktiver T-Zellen in die GVHD Zielorgane mit dem Ziel, diese gegebenenfalls therapeutisch inhibieren zu können. GVHD stellt eine signifikante Komplikation der allogenen Stammzelltransplantation dar und schränkt die klinische Anwendbarkeit der Transplantation erheblich ein. Wir untersuchten vor allem die GVHD des Thymus (Publikation 4), da ein intakter Thymus Voraussetzung für die *de novo* Generation von T-Zellen mit breitem T-Zellrepertoire und damit suffizienter T-Zellimmunität darstellt, um der Inzidenz an Infektionen und malignen Rezidiven entgegenzuwirken. Zahlreiche Trafficking-Moleküle sind bereits im Rahmen der GVHD untersucht worden. Wir evaluierten CCR9, L-Selektin, α E und β 7 Integrin Untereinheiten, PSGL-1, CCR2, und CXCR3, in ihrer Bedeutung für die Thymusgerichtete Migration alloreaktiver T-Zellen und ihrer Vermittlung von thymischer GVHD. Zunächst untersuchten wir Moleküle, für die es bereits Hinweise zur Relevanz einer Migration in den Thymus aus anderen physiologischen oder pathophysiologischen Studien gab (CCR9, L-Selectin, PSGL-1) (82-86). Empfänger-mäuse von alloreaktiven T-Zellen, die jeweils defizient für CCR9, L-Selectin oder PSGL-1 waren, wiesen entsprechend weniger Thymusschaden auf als Empfänger-mäuse von alloreaktiven Wildtyp T-Zellen. Zu unserer Überraschung vermittelten jedoch auch alloreaktive T-Zellen mit Defizienzen für Trafficking-Moleküle, die traditionell der Darm-gerichteten Migration zugeordnet sind (α E und β 7 Integrin Untereinheiten, CCR2, CXCR3) (87-90), weniger Thymusschaden. Insgesamt führte kein Defizit eines einzelnen Trafficking-Moleküls zur vollständigen Inhibition der Migration alloreaktiver T-Zellen in den Thymus. Keines der von uns getesteten Moleküle war somit allein für die Thymusgerichtete Migration notwendig, es ist eher im Gegenteil von einer Redundanz der verantwortlichen Trafficking-Moleküle für die T-Zellmigration in den Thymus auszugehen. Eine selektive, komplette Inhibition wäre daher wahrscheinlich nicht ausreichend, die thymische GVHD zu verhindern.

Eine umfassende zeitliche und räumliche Analyse der Migration ermöglicht neue Methoden der *in vivo* Bildgebung. BLI ermöglicht hierbei eine wiederholte, nicht-invasive Bildgebung zellulärer und molekularer Veränderungen im Verlauf. Wir entwickelten (Publikation 5) einen dualen lentiviralen Vektor zur Bildgebung einer NFAT-induzierbaren Luziferase und einer konstitutiven Luziferase. Unser duales Reportersystem ermöglicht das Monitoring von Migration und Proliferation im Verlauf und gewährleistet gleichzeitig Informationen über den Aktivierungsstatus der Zelle (NFAT-Aktivierung). Wir nutzten dieses System zur Bestimmung der räumlich-zeitlichen Migration und Aktivierung von a) alloreaktiven T-Zellen während der GVHD und b) T-Zellvorläuferzellen während der T-Zellentwicklung nach allo-KMT. Das Migrationsmuster alloreaktiver T-Zellen war vergleichbar mit bereits veröffentlichten Daten von Beilhack et al. (91). Im Gegensatz zu dieser Arbeit, die von einer initialen Proliferation und Aktivierung der alloreaktiven T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen ausging, unterstrichen unsere Ergebnisse eher die dominante Rolle des Darmes für die frühe Alloreaktion in der Entwicklung von GVHD. Murai et al. konnten ebenfalls zeigen, dass die Peyer's Patches für die Aktivierung der alloreaktiven T-Zellen notwendig sind und dass Mäuse ohne Peyer's Patches keine akute GVHD entwickelten (92).

Frühere Studien zeigten ausserdem, dass ein adoptiver Transfer ex vivo generierte T-Zellvorläuferzellen die T-Zellrekonstitution und Graft-versus-Tumor Aktivität nach Stammzelltransplantation verbesserte (93, 94). Wir untersuchten die Migration, Weiterentwicklung und Selektion der T-Zellvorläuferzellen während der Immunrekonstitution. Die ex vivo-generierten T-Zellvorläuferzellen wurden nach Transplantation an den Tagen 11-14 im Thymus detektiert. Mit Hilfe des H-Y transgenen Mausmodells (41, 95) und des NFAT-induzierbaren Reportersystems konnten wir außerdem zeigen, dass die transferierten T-Vorläuferzellen im Thymus sich zu CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen weiterentwickelten und selektioniert wurden. Im Rahmen der Positivselektion kam es zur NFAT-Aktivierung, was mit anderen Studien übereinstimmt (96, 97).

Um Verfälschungen der Messergebnisse durch Abschwächung und Reflektion von Signalen im Organismus auszugleichen, erweiterten wir die BLI um die Verwendung der Biolumineszenztomographie (BLT) zur genaueren Lokalisation des Signalursprungs und zur Bestimmung der realen Signallstärke. Auch wenn insgesamt mehr Messungen benötigt werden, halten wir die BLT für eine

vielversprechende Weiterentwicklung der BLI, um sowohl quantitativ als auch qualitativ präzisere Biolumineszenzdaten zu erlangen.

Es bedarf weiterer Aufklärung über die Regulation und Funktionsmechanismen des Chemokinsystems, um selektivere Angriffspunkte zu finden und verbesserte Antagonisten gegen die dysregulierten Signalkaskaden entwickeln zu können, ohne dabei die physiologischen Abläufe zu stören. Neue bildgebende Verfahren bieten hierbei Ansatzmöglichkeiten zur Entwicklung von verbesserten Vakzinierungsstrategien und adoptiven T-Zelltherapien.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die Beeinflussung der Migration von Immunzellen ist von großem Interesse für die Immuntherapie von Tumoren. Das Chemokinsystem spielt eine wesentliche Rolle sowohl für die Steuerung des „Immunzelltrafficking“ (Immunzellverkehr) als auch für die Tumormetastasierung. Mit dem Verständnis der Relevanz des Chemokinsystems für pathologische Immunreaktionen und Tumorzellfunktion/-metastasierung entstanden sehr zeitnah Bemühungen, über spezifische Antagonisierung des Chemokinsystems therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Um selektive Angriffspunkte für Behandlungsstrategien gegen Tumoren entwickeln zu können, untersuchten wir im Kolorektalkarzinom und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom tumoreigene, spezifische Chemokinrezeptorexpressionen/-funktionen. Wir konnten eine vorwiegend zytoplasmatisch lokalisierte CCR7 Variante im Kolorektalkarzinom identifizieren, die in der normalen Kolonmukosa nicht exprimiert wurde, was eine tumor-spezifische Funktion des zytoplasmatischen CCR7 vermuten lässt. Im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom entdeckten wir eine nukleäre CXCR4 Expression, die signifikant mit einer Lymphknotenmetastasierung assoziiert war. Bei beiden Tumorentitäten ergaben sich damit keine direkten Ansatzpunkte für eine Chemokinrezeptorblockade, aber möglicherweise für eine zielgerichtete Therapie gegen tumorspezifische, intrazelluläre Moleküle.

Auf der Suche nach immuntherapeutischen Ansatzmöglichkeiten untersuchten wir im Rahmen einer Tumorstudie den Einfluss des Adjuvanz GM-CSF auf die Chemokinrezeptorexpression von Vakzine-induzierten T-Zellen. Über Veränderung des lokalen Vakzinemilieus konnte hierbei eine gesteigerte CXCR3 Expression auf den Vakzine-induzierten T-Zellen erzielt werden. Da die mit CXCR3 korrespondierenden Liganden häufig im Tumorgewebe vorliegen, könnte auf diese Weise, eine zielgerichtete Migration in das Tumorgewebe unterstützt werden und somit den klinischen Benefit von GM-CSF erklären.

Des Weiteren untersuchten wir das Migrationsverhalten von T-Zellen bei der GVHD, bei der es durch alloreaktive T-Zellen zu einer Schädigung der Empfängerorgane kommt. Dabei konzentrierten wir uns auf den Thymus, dessen Schädigung die T-Zellrekonstitution beeinträchtigt. Wir charakterisierten die

Chemokinrezeptoren, die für die Migration der alloreaktiven T-Zellen in den Thymus eine Rolle spielen, um gegebenenfalls durch spezifische Inhibition eine Schädigung durch GVHD des Thymus verhindern zu können. Es stellte sich heraus, dass nicht ein einzelner, sondern vielmehr verschiedene Chemokinrezeptoren die Migration in den Thymus vermitteln. Die Blockierung eines einzelnen Chemokinrezeptors wäre demnach nicht ausreichend für eine vollständige Inhibition der Migration in den Thymus.

Um die Zellmigration im Kontext eines intakten Organismus besser visualisieren und verstehen zu können, entwickelten wir eine neue Methode, um Zellen in ihrer örtlich-zeitlichen Verteilung *in vivo* darzustellen, und hierbei simultan Informationen über ihrer Aktivierung zu erfassen. Über das Monitoring alloreaktiver T-Zellen konnten wir eine dominante Rolle des Darmes für die frühe Alloreaktion in der Entwicklung der GVHD zeigen. Über das Monitoring adoptiv transferierter, *ex vivo*-generierter T-Vorläuferzellen konnten wir deren Migration in den Thymus und deren Weiterentwicklung und Selektion erfassen. Der etablierte Vektor ermöglicht auch das Monitoring der Migration von anderen Primär- oder Tumorzellen.

Die Grundlage für das Funktionieren des Chemokinsystems scheint zunächst ein sehr klares Prinzip mit Rezeptoren, korrespondierenden Liganden und der Migration von Zellen entlang von Chemokingradienten. In Kombination mit der Relevanz für pathologische Prozesse wie GVHD und Tumormetastasierung stellt das Chemokinsystem eine attraktive Möglichkeit für neue Therapieansätze dar.

Die vorgelegten Arbeiten leisten Beiträge sowohl zum Verständnis tumorspezifisch veränderter Chemokinrezeptorexpressionen wie auch zur Immunzellmigration von T-Zellen im Rahmen der Vakzinierung und allogenen Transplantation. Zudem zeigen sie methodische Fortschritte durch die Biolumineszenz-Bildgebung, die eine Verbesserung der Migrations- und Funktionsanalyse von Zellen und Optimierung immuntherapeutischer Ansätze mittels Adjuvantien ermöglicht.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):95-101.
2. Krüger K, Mooren F. T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2007;13:37-54.
3. Butcher EC, Lippman P. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996;272:60-6.
4. Power CA. Knock out models to dissect chemokine receptor function in vivo. *J Immunol Methods.* 2003 Feb;273(1-2):73-82.
5. Proudfoot AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* 2002 Feb;2(2):106-15.
6. Müller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001;410(6824):50-6.
7. O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, SJ A. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J.* 2008;409:635-49.
8. Lee P, F W, Kuniyoshi J, et al. Effects of interleukin-12 on the immune response to a multi-peptide vaccine for resected metastatic melanoma. *J Clin Oncol.* 2001;19(18):3838-47.
9. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(38):13885-90.
10. Slingluff CJ, Petroni G, Yamshchikov G, et al. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J Clin Oncol.* 2003;21(21):4016-26.
11. Speiser DE, Lienard D, Rufer N, et al. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *J Clin Invest.* 2005;115(3):739-46.
12. Mocellin S, Mandruzzato S, Bronte V, Lise M, D N. Part I: vaccines for solid tumours. *Lancet Oncol.* 2004;5(11):681-9.
13. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving

- beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):909-15.
14. Shurin MR, Shurin GV, Lokshin A, et al. Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):333-56.
 15. Yang L, DP C. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. *Adv Cancer Res.* 2004;92:13-27.
 16. Maraninchi D, Gluckman E, Blaise D, et al. Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet.* 1987 Jul 25;2(8552):175-8.
 17. Ochs L, Shu XO, Miller J, et al. Late infections after allogeneic bone marrow transplantations: comparison of incidence in related and unrelated donor transplant recipients. *Blood.* 1995 Nov 15;86(10):3979-86.
 18. Storek J, Gooley T, Witherspoon RP, Sullivan KM, Storb R. Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD4 T cell counts. *Am J Hematol.* 1997 Feb;54(2):131-8.
 19. Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1999;5(6):347-56.
 20. Li YM, Pan Y, Wei Y, et al. Upregulation of CXCR4 is essential for HER2-mediated tumor metastasis. *Cancer Cell.* 2004;6(5):459-69.
 21. Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, B. M. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med.* 1996;184(2):569-77.
 22. Busillo JM, JL. B. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(4):952-63.
 23. Schioppa T, Uranchimeg B, Sacconi A, et al. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med.* 2003;198(9):1391-402.
 24. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, W K. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature.* 2003;425(6955):307-11.
 25. Maxwell PJ, Fallagher R, Seaton A, et al. NF- κ B-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. *Oncogene.* 2007;26:7333-45.
 26. Wilson JL, Burchell J, MJ. G. Endothelins induce CCR7 expression by

- breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. *Cancer Res.* 2006;66(24):11802-7.
27. Mandl S, Schimmelpfennig C, Edinger M, Negrin RS, CH C. Understanding immune cell trafficking patterns via in vivo bioluminescence imaging. *J Cell Biochem Suppl.* 2002;39:239-48.
 28. Gunther K, Leier J, Henning G, et al. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *Int J Cancer.* 2005 Sep 20;116(5):726-33.
 29. Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar 1;11(5):1743-50.
 30. Comerford I, Milasta S, Morrow V, Milligan G, Nibbs R. The chemokine receptor CXCR4 mediates effective scavenging of CCL19 in vitro. *Eur J Immunol.* 2006 Jul;36(7):1904-16.
 31. Gosling J, Dairaghi DJ, Wang Y, et al. Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):2851-6.
 32. Kunz M, Toksoy A, Goebeler M, Engelhardt E, Brocker E, Gillitzer R. Strong expression of the lymphoattractant C-X-C chemokine Mig is associated with heavy infiltration of T cells in human malignant melanoma. *J Pathol.* 1999;189(4):552-8.
 33. Suyama T, Furuya M, Nishiyama M, et al. Up-regulation of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokines IFN-gamma-inducible T-cell alpha chemoattractant and monokine induced by IFN-gamma and of their receptor CXC receptor 3 in human renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005;103(2):258-67.
 34. Mullins I, Slingluff C, Lee J, et al. CXC chemokine receptor 3 expression by activated CD8+ T cells is associated with survival in melanoma patients with stage III disease. *Cancer Res.* 2004;64(21):7697-701.
 35. Disis M, Bernhard H, Shiota F, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: an effective adjuvant for protein and peptide-based vaccines. *Blood.* 1996;88(1):202-10.
 36. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating

- factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3539-43.
37. Spitler LE, Grossbard ML, Ernstoff MS, et al. Adjuvant therapy of stage III and IV malignant melanoma using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol*. 2000 Apr;18(8):1614-21.
 38. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, et al. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet*. 2000 May 27;355(9218):1875-81.
 39. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jun;5(6):472-84.
 40. Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:707-47.
 41. Kisielow P, Bluthmann H, Staerz UD, Steinmetz M, von Boehmer H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature*. 1988 Jun 23;333(6175):742-6.
 42. Gallo EM, Winslow MM, Cante-Barrett K, et al. Calcineurin sets the bandwidth for discrimination of signals during thymocyte development. *Nature*. 2007 Nov 29;450(7170):731-5.
 43. Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, et al. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J Exp Med*. 2001 Mar 5;193(5):607-20.
 44. Oukka M, Ho IC, de la Brousse FC, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor NFAT4 is involved in the generation and survival of T cells. *Immunity*. 1998 Sep;9(3):295-304.
 45. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Aug;6(8):635-45.
 46. Bush CR, Havens JM, Necela BM, et al. Functional genomic analysis reveals cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and calcium signaling in human colorectal cancer cells. *J Biol Chem*. 2007 Aug 10;282(32):23387-401.
 47. Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A. The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol*. 2002 Jul;4(7):540-4.

48. Yiu GK, Toker A. NFAT induces breast cancer cell invasion by promoting the induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2006 May 5;281(18):12210-7.
49. Gabor EP, Mishalani S, Lee S. Rapid response to cyclosporine therapy and sustained remission in large granular lymphocyte leukemia. *Blood.* 1996 Feb 1;87(3):1199-200.
50. Marafioti T, Pozzobon M, Hansmann ML, et al. The NFATc1 transcription factor is widely expressed in white cells and translocates from the cytoplasm to the nucleus in a subset of human lymphomas. *Br J Haematol.* 2005 Feb;128(3):333-42.
51. Medyouf H, Alcalde H, Berthier C, et al. Targeting calcineurin activation as a therapeutic strategy for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med.* 2007 Jun;13(6):736-41.
52. Richmond A. Nf-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(9):664-74.
53. Schwieger M, Schüler A, Forster M, et al. Homing and invasiveness of MLL/ENL leukemic cells is regulated by MEF2C. *Blood.* 2009;114(12):2476-88.
54. Kulbe H, Hagemann T, Szlosarek PW, Balkwill FR, JL. W. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(22):10355-62.
55. Akekawatchai C, Holland JD, Kochetkova M, Wallace JC, SR M. Transactivation of CXCR4 by the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) in human MDA-MB-231 breast cancer epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005;280(48):39701-8.
56. Mira E, Lacalle RA, González MA, et al. A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling. *EMBO Rep* 2001;2(2):151-6.
57. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, et al. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med.* 1998;188(1):157-67.
58. Lin K, Ateeq HS, Hsiung SH, et al. Selective, tight-binding inhibitors of integrin alpha4beta1 that inhibit allergic airway responses. *J Med Chem* 1999 Mar 11;42(5):920-34. 1999;42(5):920-34.
59. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, N K.

- Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992;356(6364):63-6.
60. Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, et al. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(10):5698-703.
 61. Baggiolini M, B M. Blocking chemokine receptors. *J Exp Med* 1997;186(8):1189-91.
 62. Takenaga M, Tamamura H, Hiramatsu K, et al. A single treatment with microcapsules containing a CXCR4 antagonist suppresses pulmonary metastasis of murine melanoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(1):226-32.
 63. Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, et al. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS Lett*. 2003;550(1-3):79-83.
 64. Kim SY, Lee CH, Midura BV, et al. Inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine pathway reduces the development of murine pulmonary metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(3):201-11.
 65. Porvasnik S, Sakamoto N, Kusmartsev S, et al. Effects of CXCR4 antagonist CTCE-9908 on prostate tumor growth. *Prostate*. 2009;69(13):1460-9.
 66. Richert MM, Vaidya KS, Mills CN, et al. Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. *Oncol Rep*. 2009;21(3):761-7.
 67. De Clercq E. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochem Pharmacol*. 2009;77(11):655-64.
 68. Yang AS, Monken CE, Lattime EC. Intratumoral vaccination with vaccinia-expressed tumor antigen and granulocyte macrophage colony-stimulating factor overcomes immunological ignorance to tumor antigen. *Cancer Res*. 2003 Oct 15;63(20):6956-61.
 69. Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, et al. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(6):1667-73.
 70. Ma Q JD, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed

- cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9448-53.
71. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996;382(6592):635-8.
 72. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Litt DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998 Jun 11;393(6685):595-9. 1998;393(6685):595-9.
 73. Ding Y, Shimada Y, Maeda M, et al. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2003 Aug 15;9(9):3406-12.
 74. Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62(10):2937-41.
 75. Heaney M, Golde D. Soluble cytokine receptors. *Blood*. 1996;87(3):847-57.
 76. Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, et al. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5686-93.
 77. Kato M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res*. 2003;5(5):R144-50.
 78. Wang N, Wu QL, Fang Y, et al. Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome. *J Transl Med*. 2005 Jun 26;3:26.
 79. Ganss R, Ryschich E, Klar E, Arnold B, Hammerling G. Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res*. 2002;62(5):1462-70.
 80. Jinquan T, Anting L, Jacobi HH, et al. CXCR3 expression on CD34(+) hemopoietic progenitors induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: II. Signaling pathways involved. *J Immunol*. 2001 Oct 15;167(8):4405-13.
 81. Mach N, Gillessen S, Wilson S, Sheehan C, Mihm M, Dranoff G. Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or flt3-ligand. *Cancer*

- Res. 2000;60:3239-46.
82. Dutt S, Ermann J, Tseng D, et al. L-selectin and beta7 integrin on donor CD4 T cells are required for the early migration to host mesenteric lymph nodes and acute colitis of graft-versus-host disease. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):4009-15.
 83. Perry SS, Wang H, Pierce LJ, Yang AM, Tsai S, Spangrude GJ. L-selectin defines a bone marrow analog to the thymic early T-lineage progenitor. *Blood*. 2004 Apr 15;103(8):2990-6.
 84. Perry SS, Welner RS, Kouro T, Kincade PW, Sun XH. Primitive lymphoid progenitors in bone marrow with T lineage reconstituting potential. *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):2880-7.
 85. Rossi FM, Corbel SY, Merzaban JS, et al. Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol*. 2005 Jun;6(6):626-34.
 86. Schmaltz C, Alpdogan O, Kappel BJ, et al. T cells require TRAIL for optimal graft-versus-tumor activity. *Nat Med*. 2002 Dec;8(12):1433-7.
 87. Duffner U, Lu B, Hildebrandt GC, et al. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol*. 2003 Oct;31(10):897-902.
 88. El-Asady R, Yuan R, Liu K, et al. TGF- β -dependent CD103 expression by CD8(+) T cells promotes selective destruction of the host intestinal epithelium during graft-versus-host disease. *J Exp Med*. 2005 May 16;201(10):1647-57.
 89. Petrovic A, Alpdogan O, Willis LM, et al. LPAM (alpha 4 beta 7 integrin) is an important homing integrin on alloreactive T cells in the development of intestinal graft-versus-host disease. *Blood*. 2004 Feb 15;103(4):1542-7.
 90. Uehara S, Grinberg A, Farber JM, Love PE. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol*. 2002 Mar 15;168(6):2811-9.
 91. Beilhack A, Schulz S, Baker J, et al. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):1113-22.
 92. Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, et al. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol*. 2003 Feb;4(2):154-60.

93. Zakrzewski JL, Kochman AA, Lu SX, et al. Adoptive transfer of T-cell precursors enhances T-cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Nat Med*. 2006 Sep;12(9):1039-47.
94. Zakrzewski JL, Suh D, Markley JC, et al. Tumor immunotherapy across MHC barriers using allogeneic T-cell precursors. *Nat Biotechnol*. 2008 Apr;26(4):453-61.
95. Teh HS, Kishi H, Scott B, Borgulya P, von Boehmer H, Kisielow P. Early deletion and late positive selection of T cells expressing a male-specific receptor in T-cell receptor transgenic mice. *Dev Immunol*. 1990;1(1):1-10.
96. Neilson JR, Winslow MM, Hur EM, Crabtree GR. Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity*. 2004 Mar;20(3):255-66.
97. Wang CR, Hashimoto K, Kubo S, et al. T cell receptor-mediated signaling events in CD4+CD8+ thymocytes undergoing thymic selection: requirement of calcineurin activation for thymic positive selection but not negative selection. *J Exp Med*. 1995 Mar 1;181(3):927-41.

6. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Eckhard Thiel bedanken, der mich in besonderer Art und Weise bestärkt und gefördert hat. Erst seine nachhaltige Unterstützung ermöglichte meine wissenschaftliche und klinische Entwicklung.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Keilholz und Frau Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen verdanke ich die Entdeckung und Förderung meines Interesses an der Tumormunologie in ganz besonderem Maße. Wesentliche Projekte und Teile dieser Habilitationsschrift wären ohne ihre Hilfe und Unterstützung nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Marcel van den Brink verdanke ich vertiefte Einblicke in die Welt der Mausmodelle und Transplantationsforschung. Seinem Enthusiasmus und seiner Expertise auf diesem Gebiet verdanke ich zwei erfolg- und ereignisreiche Jahre in den USA.

Herrn Prof. Dr. Bernd Dörken, meinem Doktorvater, und meinen Doktorarbeitsbetreuern PD Dr. Philipp le Coutre und PD Dr. Karl-Anton Kreuzer verdanke ich den wissenschaftlichen Einstieg in das Gebiet der Forschung. Sie haben meine wissenschaftliche Entwicklung stets wohlwollend begleitet und tatkräftig unterstützt.

Die vorliegenden Arbeiten wären nicht möglich geworden ohne exzellente Kollegen und Kooperationspartner. Um nur einige wenige – in alphabetischer Reihenfolge - zu nennen: Dr. Christine Appelt, Anne Marie Asemisen, Bradley Beattie, Dr. Antonia Busse, Prof. Dr. Sarah Coupland, Amanda Holland, Dr. Anne Letsch, Dr. Christoph Loddenkemper, Sydney Lu, Dr. Joachim Lupberger, PhD Dr. John Markley, PD Dr. Olaf Penack, Dr. Rieger, Prof. Dr. Michel Sadelain, Andrea Stroux, Prof. Dr. Andreas Thiel, Dr. Jennifer Tsai.

Herzlichen Dank!

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit danke ich der Charité, der Friedrich-Naumann-Stiftung, der Berliner Krebsgesellschaft, dem Boehringer Ingelheim Fonds und der Dr. Mildred-Scheel-Stiftung (Deutsche Krebshilfe).

Meiner engsten Freundin Daniela Winck danke ich für das Korrekturlesen und den seelischen Beistand über die Forschungsjahre hinweg.

Sehr viel zu verdanken habe ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und

meinem Ehemann, Dr. Lars Stelter, der über viele Jahre durch verständnisvolle Unterstützung meinen wissenschaftlichen Weg ermöglichte.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, August 2010

Dr. Il-Kang Na