

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin  
Campus Benjamin Franklin

der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Chemokinrezeptor CCR6 Expressionsstärke und Lebermetastasierung  
beim kolorektalen Karzinom

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Pirus Ghadjar

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Scheibenbogen

2. Prof. Dr. med. Dr. h.c. P.M. Schlag

3. Prof. Dr. med. S. Seeber

**Datum der Promotion: 23.09.2007**

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	1
<b>1 EINLEITUNG</b>	4
1.1 Chemokine	4
1.2 Chemokinrezeptoren	8
1.3 Chemokinrezeptor CCR6 und Chemokin CCL20	10
1.4 Chemokine, Chemokinrezeptoren und Tumormetastasierung	11
1.5 Chemokinrezeptoren als therapeutische Ziele	16
1.6 Das kolorektale Karzinom (KRK)	16
1.7 Zielsetzung der Arbeit	19
<b>2 MATERIAL UND METHODIK</b>	20
2.1 Material	20
2.1.1 Patientenauswahl	20
2.1.2 Gewebeschnitte	20
2.1.3 Tumorzelllinien	21
2.1.4 Kulturmedium	21
2.1.5 Phosphatpuffer	21
2.1.6 FACS – Antikörper	21
2.1.7 Antikörper und Material für die Immunhistochemie	21
2.2 Methodik	22
2.2.1 Bestimmung der Zellzahl	22
2.2.2 Kultur der Tumorzelllinien	22
2.2.3 Fluoreszenzdurchflusszytometrie	22
2.2.4 Immunhistochemie	24

2.2.5	Semiquantitative Evaluierung der Immunhistochemischen Färbungen	24
2.2.6	Digitale Bildanalyse	25
2.2.7	Klinisch – pathologische Daten	26
2.2.8	Auswertung und statistische Analysen	26
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1	Analyse des Chemokinrezeptors CCR6 auf Tumorzellen mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie	27
3.2	CCR6 Expression auf KRK Primärtumoren	28
3.3	Expressionsunterschiede zwischen normaler Kolonmukosa und KRK Primärtumoren	30
3.4	Expressionsunterschiede zwischen KRK Primärtumoren und zugehörigen Lebermetastasen	32
3.5	Korrelation zwischen CCR6 Expression der KRK Primärtumoren und Lebermetastasierung	33
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>38</b>
4.1	CCR6 Expressionsmuster beim KRK	38
4.2	CCR6 und Lebermetastasierung beim KRK	40
4.3	Funktionalität von CCR6 beim KRK	44
4.4	CCR6 als Zielstruktur für neue Therapiestrategien	45
4.5	Schlussfolgerung	45
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>58</b>

<b>8</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>61</b>

## Abkürzungsverzeichnis

6Ckine	Six-cysteine chemokine
AF	Area Fraction
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Ak	Antikörper
APAAP	Alkaline Phosphatase-Anti-Alkaline Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
BCA-1	B cell-attracting chemokine-1
BD	Becton Dickinson
B-Zellen	Lymphozyten Untergruppierung
°C	Grad Celsius
C	Cystein
CD	Cluster of Differentiation, Lymphozyten-Oberflächenrezeptoren
CEA	Carcino-Embryonales-Antigen
CL, CCL, CXCL und CX3CL	Chemokin-Typen (C = Cystein, X = Aminosäure)
CR, CCR, CXCR Und CX3CR	Chemokinrezeptor-Typen (C = Cystein, X = Aminosäure)
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
DIA	Digital Image Analysis, digitale Bildanalyse
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELC	Epstein Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine
ERK-1/2	Extrazellulär regulierte Kinase-1/2
EST	Expressed sequence Tag
FACS	Fluorescent activated cell sorter
Fc	Immunzellen-bindender Anteil des Antikörpers
FCS	Fetal calf serum
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HE	Hematoxylin und Eosin

HEV	High endothelial venule
HIV	Human immunodeficiency virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-inducible protein-10
I-TAC	Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant
kDa	Kilo-Dalton
KRK	Kolorektales Karzinom
LARC	Liver and activation related chemokine
l	Liter
M	Metastasenstadium (M 0 / 1)
mAK	Monoklonaler Antikörper
MALT	Mucosa associated lymphatic tissue
MAP	Mitogen-activated protein
mg	Milligramm
MHC-II	Major histocompatibility complex-II
MIG	Monokine induced by Interferon-gamma
Min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n	Anzahl der Patienten
NAF	Neutrophil-activating factor
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzellen
NS	Nicht signifikant
P	Signifikanz
pI-IV	Pathologisches Tumorstadium nach UICC/AJCC (p I-IV)
PBS	Phosphate buffered saline

PE	Phycoerythin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pN	Pathologisches Lymphknotenstadium (pN 0-3)
pT	Pathologisches Tumorstadium (pT 1-4)
RANTES	Regulated on activation of normal T cell expressed and secreted
RGB	Red-Green-Blue
ROC	Receiver operating characteristic
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCM-1	Single C motif-1
SCY	Small secreted cytokine
SD	Standard derivation, Standardabweichung
SDF-1 $\alpha$	Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$
Si-RNA	Small interfering ribonucleic acid
SLC	Secondary lymphoid tissue chemokine
TECK	Thymus expressed chemokine
T-Zellen	Lymphozyten Untergruppierung
T-H1-Zellen	T-Helferzellen Typ 1
T-H2-Zellen	T-Helferzellen Typ 2
TNF- $\alpha$	Tumor necrose faktor- $\alpha$
TNM	Tumor-Node-Metastasis
TM	Trademark
U	Units
UICC	International Union against Cancer
Verd	Verdünnungsfaktor
Vol	Volumen

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Chemokine

Chemokine sind eine Gruppe von kleinen (8-14 kDa), zytokinähnlichen Signalproteinen, die aus 70-125 Aminosäuren bestehen (ZLOTNIK 2000). Durch Interaktion mit ihren G-Protein gekoppelten, membranständigen Chemokinrezeptoren (MURPHY 1994) bewirken sie eine Wanderung verschiedener, rezeptortragender Zelltypen wie Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Monozyten und Makrophagen in Richtung Chemokin. Diese Zellwanderung wird Chemotaxis genannt. Die Wechselwirkungen zwischen Chemokin und Chemokinrezeptor sind komplex, da ein Chemokin teilweise an mehrere Chemokinrezeptoren binden kann und ein Chemokinrezeptor teilweise mehrere Chemokine binden kann. Darüber hinaus kann ein Zelltyp mehrere Chemokinrezeptoren tragen und mehrere Chemokine produzieren.

Zusammen mit Adhäsionsmolekülen vermitteln Chemokine die feste Adhäsion von Leukozyten an das Endothel, transendotheliale Migration, die gerichtete Wanderung durch die extrazelluläre Matrix und bestimmen die spezifische Lokalisation distinkter Leukozytensubpopulationen in peripheren Geweben (ZLOTNIK 2000). Nachdem 1987 mit CXCL8 (IL-8) das erste Chemokin aus Monozyten isoliert wurde (YOSHIMURA, WALZ), sind Chemokine und ihre Rezeptoren Gegenstand intensiver Forschung geworden, insbesondere nachdem herausgefunden wurde, dass Chemokinrezeptoren als Co-Rezeptoren bei der HIV-Infektion dienen (FENG) und dass defekte Chemokinrezeptoren zu einer HIV Resistenz führen (LIU, SAMSON, QUILLEN).

Zur Zeit umfasst das menschliche Chemokinsystem über 50 Chemokine. Strukturhomologien innerhalb der Chemokinsuperfamilie in Kombination mit neuen bioinformatischen Methoden sowie der Zugriff auf umfassende Expressed Sequence Tag (EST) Datenbanken haben es ermöglicht, dass diese humane Proteinsuperfamilie als eine der ersten in ihrer Gesamtheit kloniert und kartiert ist. In Abhängigkeit von der Cystein (C) Anordnung am N-Terminus des Moleküls werden die Chemokine und ihre Rezeptoren in die vier Untergruppen CX<sub>3</sub>C, CXC, CC und C eingeteilt (siehe Abbildung 1). Die ersten drei Gruppen haben vier Cysteinreste, während die vierte Gruppe nur zwei besitzt. Die CXC Chemokine haben eine Aminosäure zwischen den ersten beiden Cysteinresten, bei den CX<sub>3</sub>C Chemokinen befinden sich drei Aminosäuren zwischen dem ersten und dem zweiten Cysteinrest. Bei den CC Chemokinen liegen die ersten beiden Cysteinreste nebeneinander, und bei den C Chemokinen schließlich fehlen der erste und der dritte Cysteinrest (ZLOTNIK 2000, ARYA).

<b>Group</b>	<b>Structure</b>
<b>C:</b>	..... <b>C</b> ..... <b>C</b> .....
<b>CC:</b>	..... <b>C</b> ----- <b>C</b> ..... <b>C</b> ..... <b>C</b> .....
<b>CXC:</b>	..... <b>CX</b> --- <b>C</b> ..... <b>C</b> ..... <b>C</b> .....
<b>CX3C:</b>	..... <b>CXXXC</b> ..... <b>C</b> ..... <b>C</b> .....

Abbildung 1: Anordnung der Cysteinreste und Nomenklatur der Chemokine, aus ARYA

In der CX3C Familie ist Fraktalkin/CX3CL1 das bisher einzige nachgewiesene Chemokin. Ebenso beschränkt sich die C Familie auf ein Mitglied mit zwei Isoformen, Lymphotactin- $\alpha$  und - $\beta$ . Die Gene für die vier Chemokingruppen werden als SCY (small secreted cytokine) bezeichnet. Die Gene der meisten Chemokine liegen benachbart und verteilen sich auf zwei Hauptlokalisationen: Auf Chromosom 4q12-q13 liegen viele CXC-Chemokine und auf Chromosom 17q11.2 sind viele CC-Chemokine lokalisiert. Andere Chemokin-Gene liegen abseits der Hauptlokalisationen, und es fällt auf, dass diese Chemokine relativ spezifische Funktionen haben, sie teilen sich ihre Rezeptoren auch weniger häufig mit anderen Chemokinen. Ein Beispiel ist das Chemokin CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ), dessen Rezeptor CCR6 Gegenstand dieser Arbeit ist. CCL20 ist auf Chromosom 2q33-q37 lokalisiert und hat mit CCR6 einen spezifischen Rezeptor. CCL20 besitzt auch relativ wenig Strukturhomologie im Vergleich zu den anderen CC-Chemokinen, am ähnlichsten ist es CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) mit 28% Übereinstimmung.

Chemokine werden unter Berücksichtigung ihrer physiologischen Eigenschaften auch in inflammatorische (induzierbare) und in homeostatische (konstitutive vorhandene) Chemokine eingeteilt. Inflammatorische Chemokine fördern als Entzündungsmediatoren hauptsächlich die Einwanderung von Leukozyten in entzündete und infizierte Gewebe (MOSER). Homeostatische Chemokine werden konstitutiv und gewebespezifisch exprimiert und dienen der Reifung, Differenzierung und Aktivierung von Lymphozyten sowie deren zielgerichteter Einwanderung in Organe der Hämatopoese.

Diese Unterteilung in inflammatorisch oder homeostatische Chemokine ist für einige Chemokine allerdings nicht klar zu treffen, da sie je nach Situation sowohl inflammatorische als auch

homeostatische Funktionen besitzen. Ein Beispiel hierfür ist CCL20, mit homeostatischen und teilweise auch inflammatorischen Eigenschaften (siehe Tabelle 1).

#### Ausgewählte Chemokine der Subfamilien und ihre Funktion

Systematischer Name	Weitere Namen	Chromosom	Funktion
<i>CXC Chemokine</i>			
CXCL8	IL-8	4q21.1	Entzündung/Angiogenese
CXCL9	MIG	4q21.1	Entzündung
CXCL10	IP-10	4q21.1	Entzündung
CXCL11	I-TAC	4q21.1	Entzündung
CXCL12	SDF-1 $\alpha/\beta$	10q11.21	Homing, Angiogenese
CXCL13	BCA-1	4q21.1	Homing
<i>C Chemokine</i>			
XCL1	Lymphotactin	1q24.2	Homing
XCL2	SCM-1 $\beta$	1q24.2	Homing
<i>CX<sub>3</sub>C Chemokine</i>			
CX3CL1	Fractalkine	16q13	Entzündung
<i>CC Chemokine</i>			
CCL3	MIP-1 $\alpha$ /LD78 $\alpha$	17q12	Entzündung
CCL4	MIP-1 $\beta$	17q12	Entzündung
CCL5	RANTES	17q12	Entzündung
CCL19	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus-3	9q13.3	Homing
CCL20	MIP-3 $\alpha$ /LARC/exodus-1	2q36.3	Homing, Entzündung
CCL21	6Ckine/SLC/exodus-2	9q13.3	Homing
CCL25	TECK	19p13.3	Homing

Tabelle 1: Nomenklatur der Chemokine, aus ZLOTNIK 2000

Chemokine werden im Allgemeinen nicht in die Zellmembran eingebaut, sondern werden sezerniert. Eine Ausnahme bildet das Fraktalkin, das sowohl in einer membranständigen Form als auch in einer löslichen Form vorkommt (IMAI).

Neben der ursprünglichen Beschreibung als lösliche Faktoren, welche die direkte Migration von Leukozyten regulieren, sind heute weitere physiologische Bedeutungen von Chemokinen bekannt. Sie haben wichtige Funktionen bei entzündlichen Erkrankungen, HIV-Infektion, Wundheilung, Entwicklung von lymphatischen Gewebe, Hämatopoese, und TH-1- und TH-2-

Zellentwicklung. Darüber hinaus wurde eine Beteiligung von Chemokinen bei allen Stadien der Tumorentwicklung und Tumorprogression, wie der neoplastischen Transformation von Zellen, Tumorwachstum, Angiogenese, Angiostase und der Metastasierung von Tumoren nachgewiesen (siehe Abbildung 2).

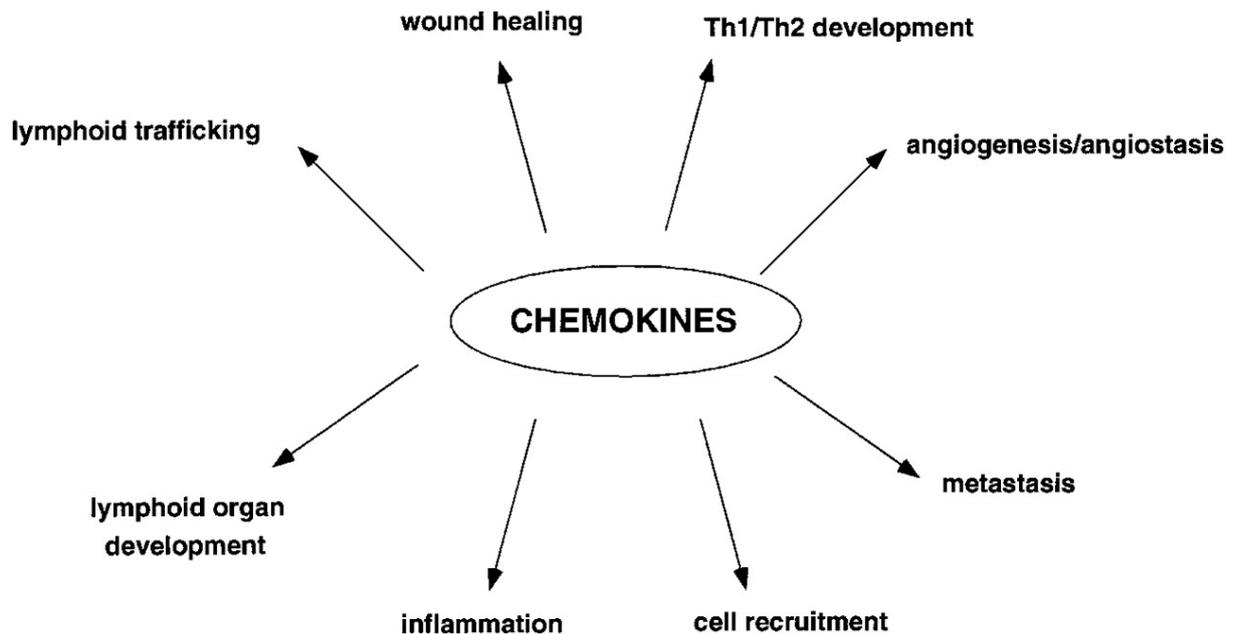


Abbildung 2: Chemokine und ihre Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen, aus ROSSI

Die Rolle von Chemokinen bei Tumorerkrankungen rückte erstmals in den Mittelpunkt, nachdem gezeigt wurde, dass Tiere ohne T-Zell- oder natürliche Killerzell (NK)-Funktion, die Tumorzellen injiziert bekamen, ein typisches Entzündungsinfiltrat zeigten. Dies deutete darauf hin, dass die Tumorzellen entweder selbst chemotaktische Stoffe produzierten oder deren Produktion in der Tumorumgebung induzierten (MANTOVANI). Heute wird davon ausgegangen, dass das Chemokinrezeptor System im Tumorgewebe stark verändert sein kann und Chemokine direkte Effekte auf Stromazellen und Tumorzellen induzieren, zusätzlich zu ihrer Aufgabe, Leukozytenrekrutierungen zu regulieren.

## 1.2 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren bestehen ungefähr aus 350 Aminosäuren, und gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Es sind bislang 20 Chemokinrezeptoren beschrieben worden (siehe Tabelle 2). Die Interaktionen zwischen Chemokin und Chemokinrezeptor sind bis auf einige Ausnahmen nicht spezifisch, sodass ein einzelnes Chemokin an mehreren Chemokinrezeptoren anbinden kann und ein einzelner Chemokinrezeptor die Transduktionssignale mehrerer Chemokine weiterleiten kann. Jeder Rezeptor allerdings bindet nur Chemokine aus einer der vier Chemokingruppen. Daher werden die Chemokinrezeptoren basierend auf den Chemokinen, die sie binden, in vier Gruppen eingeteilt. Man unterscheidet die XC-Rezeptoren (XCR1), die CX3C-Rezeptoren (CX3CR1), die CXC-Rezeptoren (CXCR1-CXCR5) sowie die für diese Arbeit bedeutsamen CC-Rezeptoren (CCR1-CCR10). Die Nummerierung entspricht der chronologischen Reihenfolge ihrer Identifizierung. Die Gene der Chemokinrezeptoren liegen hauptsächlich auf Chromosom 2 und 3 (ZLOTNIK 2000). Die Hauptlokalisierung der CC-Rezeptoren ist auf Chromosom 3p. CCR6 dagegen liegt außerhalb dieser Region auf Chromosom 6q27. Die Expression von Chemokinrezeptoren wurde auf verschiedenen hämatopoetischen und epithelialen Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus ist eine aberrante Expression von Chemokinrezeptoren auf vielen menschlichen neoplastischen Zellen nachgewiesen worden (WANG 1998, MOHLE 1999, MOHLE 2000, KOSHIBA, BRADSTOCK, ROSSI, BALKWILL, MULLER, VICARI).

## Chemokinrezeptoren der Subfamilien und ihre Liganden

Systematischer Name	bindendes Chemokin
<i>CXC Rezeptoren</i>	
CXCR1	CXCL1, CXCL6, CXCL8
CXCR2	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8
CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	CXCL12
CXCR5	CXCL13
<i>C Rezeptoren</i>	
XCR1	XCL1, XCL2
<i>CX3C Rezeptor</i>	
CX3CR1	CX3CL1
<i>CC Rezeptoren</i>	
CCR1	CCL3, CCL5, CCL7, CCL14, CCL15, CCL16, CCL23
CCR2	CCL2, CCL7, CCL13
CCR3	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26
CCR4	CCL17, CCL22
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CCR10	CCL27

Tabelle 2: Nomenklatur der Chemokinrezeptoren, aus ZLOTNIK 2000

### 1.3 Chemokinrezeptor CCR6 und Chemokin CCL20

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Chemokinrezeptor CCR6, welcher der spezifische Rezeptor des homeostatischen und inflammatorischen CC-Chemokins CCL20 (MIP-3 $\alpha$ ) ist. Die konstitutive Expression von CCL20, welches früher auch als liver and activation-regulated chemokine (LARC) bezeichnet wurde, ist ursprünglich in der Leber beschrieben worden (HIESHIMA). Weiter ist CCL20 auch in Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (MALT), anderem lymphatisches Gewebe sowie Lungengewebe konstitutiv exprimiert (HROMAS, SCHUTYSER). CCL20 ist ebenfalls in Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, T-Zellen und eosinophilen Granulozyten vorhanden. Darüberhinaus wurde eine niedrige konstitutive CCL20 Expression für Kolonmukosa, Pankreas, Prostata, Zervix und Haut beschrieben (SCHUTYSER). Außerdem ist die Expression von CCL20 in verschiedenen malignen Geweben wie u.a. beim kolorektalen Karzinom (KRK), Nierenzellkarzinom, Mammakarzinom, Pankreaskarzinom, Zervixkarzinom, Endometriumkarzinom, Melanom, papilläres Schilddrüsenkarzinom, Lymphom, Leukämie, Glioblastom und beim hepatozellulären Karzinom nachgewiesen (SCHUTYSER). CCR6 Expression wurde ursprünglich auf lymphatischem und nicht-lymphatischem Gewebe beschrieben, vor allem in der Milz, Lymphknoten, Appendix und Pankreas, sowie in geringerem Ausmaß auf Leukozyten, dendritischen Zellen, Thymus, Dünndarm, fetaler Leber und Hoden (SCHUTYSER).

Eine aberrante CCR6 Expression ist auf Tumorzellen nachgewiesen worden, so z.B. beim Pankreaskarzinom. Hier konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit CCL20 *in vitro* die Migration, Invasion und das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen verstärkt. Ebenfalls wurde CCL20 mRNA in den Pankreaskarzinomzellen nachgewiesen (KLEEFF, KIMSEY). CCR6 ist auch im hepatozellulären Karzinom exprimiert (SHIMIZU, RUBIE 2006(a), UCHIDA 2006) und selektiv auf einigen B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen wie dem Marginalzonen-, Mantelzell- und MALT-Lymphom exprimiert (RODIG).

Eine besondere Rolle scheinen CCR6 und CCL20 Interaktionen beim Dickdarm zu spielen. CCL20 ist schwach auf normaler Kolonmukosa exprimiert und in entzündetem Kolongewebe hochreguliert. Die Sekretion von CCL20 findet hauptsächlich auf der basolateralen Seite der Mukosazellen statt, und die CCL20 Sekretion wird gesteigert durch pro-inflammatorische Stimuli wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (IZADPANA, FUJIE, KWON). CCR6 ist ebenfalls auf der normalen Kolonmukosa vorhanden, hauptsächlich intrazellulär auf der apikalen Seite der Mukosazellen lokalisiert. Die CCR6 Expression ist nicht durch pro-inflammatorische Stimuli

induzierbar und ist auf entzündetem Kolongewebe auch nicht hochreguliert. Ebenfalls sind CCL20 und CCR6 beim KRK exprimiert (IZADPANA, FUJIE, KWON, YANG, BRAND 2006). Stimulation von KRK Zellen mit CCL20 führt zu Tyrosin Phosphorysierung der p130<sup>cas</sup>, einem Protein einer Signaltransduktionskaskade, die zu verstärkter Adhäsion führt (YANG). Weiter führt CCL20 Stimulation zu verstärkter Proliferation und Migration von KRK Zellen (BRAND 2006).

Darüberhinaus wurde gezeigt, dass in kleinen KRK-Lebermetastasen im Vergleich zum umliegenden Gewebe die CCR6 Expression erhöht ist, woraufhin zum ersten Mal ein Zusammenhang zwischen CCR6 Expression der Tumorzellen und Lebermetastasierung postuliert wurde (DELLACASAGRANDE).

#### **1.4 Chemokine, Chemokinrezeptoren und Tumormetastasierung**

Krebs ist im Wesentlichen das Resultat einer Regulationsstörung der Zellproliferation. Zellen sind so programmiert, dass sie Signalen gehorchen, die ihr Wachstum und ihre Differenzierung steuern. Wachstum ist ein entscheidender Vorgang im Leben einer Zelle. An der Regulation des Zellwachstums sind viele Gene und Signalwege beteiligt; es handelt sich hierbei um einen hochkomplexen Vorgang. Daher ist es nicht unüblich, dass eine Zelle aufgrund von Defekten in der Wachstumsregulation in unkontrolliertes Wachstum übergeht, was man dann Krebs nennt. Es wird angenommen, dass solche Vorgänge häufig passieren, an jedem Tag unseres Lebens. Dem wirkt jedoch ein Kontrollsystem des Körpers entgegen, an welchem auch das Immunsystem beteiligt ist, welches diese außer Kontrolle geratenen Zellen sofort erkennt und eliminiert (ZLOTNIK 2004). Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei immunsupprimierten Patienten gehäuft Tumoren auftreten, so etwa das Karposi-Sarkom bei AIDS Patienten (SHAH). Die Aggressivität von Tumoren kann von zwei Aspekten abhängen. Einmal von der Funktion der fehlregulierten Zelle. In Leukämien oder Lymphomen zum Beispiel ist die fehlregulierte Zelle ein Lymphozyt oder ein anderer Leukozyt. Die normale Ursprungszelle hat bestimmte Funktionen und produziert diverse Mediatoren in geregelter Art und Weise. In Krebszellen kann nicht nur das Wachstum fehlreguliert sein, sondern auch die Funktion der Zelle. Beim Multiplen Myelom zum Beispiel ist die Krebszelle eine Plasmazelle, die eine große Menge Antikörper produziert, was negative Auswirkungen für den Patienten hat (RAWSTRON).

Der zweite Aspekt, welcher entscheidend zur Aggressivität eines Tumors beiträgt, ist dessen Fähigkeit sich im Körper zu verteilen und abseits des Primärtumors Sekundärtumore zu bilden,

ein Prozess, den man Metastasierung nennt. Ein schnell wachsendes Mammakarzinom zum Beispiel kann man, wenn es nicht metastasiert, relativ einfach chirurgisch entfernen. Im Gegensatz dazu kann selbst ein sehr langsam wachsender Tumor sehr gefährlich sein, wenn er eine hohe Wahrscheinlichkeit hat zu metastasieren. Das liegt einerseits daran, dass es sehr schwer ist, Mikrometastasen zu erkennen und effizient chirurgisch zu entfernen, andererseits können Metastasen Vitalorgane befallen, was die Prognose des Patienten stark verschlechtert (ZLOTNIK 2004). Metastasierung stellt die häufigste Ursache von Morbidität und Mortalität bei den Tumorerkrankungen dar (MURPHY 2001). Eine Vielzahl experimenteller und klinischer Daten stützt die Hypothese, dass Metastasierung nicht zufällig auftritt, sondern aus einer Vielzahl von koordinierten, organspezifischen Prozessen resultiert (NICOLSON). So gibt es Organe, in denen sich häufig Metastasen bilden wie in Lymphknoten, Leber, Lunge, Knochenmark und Organe, bei denen das Auftreten von Metastasen selten ist wie in Herz, Niere und Magen. Die Tatsache, dass bestimmte Tumoren bevorzugt in bestimmte Organe metastasieren, lässt sich nicht allein durch anatomische Unterschiede in Blut- und Lymphfluss verschiedener Organe erklären. Die genauen molekularen Mechanismen, die die gerichtete Wanderung bzw. Metastasierung von Tumorzellen in spezifische Organe vermitteln, sind weitestgehend unbekannt (NICOLSON, YEATMAN).

Bis heute wurden drei wissenschaftliche Konzepte entwickelt, die versuchen, die spezifischen Metastasierungsmuster vieler Tumorentitäten zu erklären. Das erste Konzept wurde von PAGET bereits 1889 als „seed and soil“ Theorie beschrieben. Es postuliert, dass Tumorzellen in allen Organen in Abhängigkeit von der Hämodynamik extravadiieren, sich aber nur in solchen Organen multiplizieren, die entsprechende Wachstumsfaktoren bereitstellen (CHAMBERS). Entsprechend der zweiten Theorie wird die Extravasion von Tumorzellen durch bestimmte Adhäsionsmoleküle gesteuert, die vom Endothel in einer organspezifischen Art und Weise exprimiert werden („adhesion theory“; QIAN). Das dritte Konzept ist die „Homing theory“, nach der Tumorzellen aufgrund von Chemokingradienten (Lockstoffen des Immunsystems) in bestimmte Organe einwandern, d.h. metastasieren. Ihre initialen biologischen Funktionen identifizieren die Chemokine als potentielle Kandidaten, die die Wanderung und Disseminierung von malignen Zellen in periphere Organe wie Lymphknoten, Leber, Lunge und Knochen steuern und somit im Metastasierungsprozess von Tumoren eine wichtige Rolle spielen könnten (HOMEY).

Für jede dieser Theorien existieren unterstützende Daten. In der Vergangenheit gab es jedoch zahlreiche Veröffentlichungen, die die Hypothese stützen, dass Chemokine und deren

Rezeptoren wesentlich an dem organspezifischen Homing von Tumorzellen beteiligt sind. Man darf nicht außer Acht lassen, dass es sich um Patienten in relativ frühem Krankheitsstadium handelt. Bei Patienten mit sehr fortgeschrittenen Tumorstadien ist es klar, dass mechanische Aspekte der Tumormetastasierung im Vordergrund stehen. Hier kann man fast im gesamten Körper Metastasen finden, die Prognose ist schlecht und die Behandlungsmöglichkeiten sind sehr begrenzt. Aus der therapeutischen Perspektive ist es jedoch wichtig zu verstehen, wie die Metastasierung einer bestimmten Tumorentität in frühen Krankheitsstadien geregelt ist. Es könnte in der Zukunft möglich werden, dass Metastasierungs-Inhibitoren die Inzidenz von Metastasen verringern und dadurch die Prognose der Patienten stark verbessern. Diese Ansätze führen hin zur Rolle der Chemokine und Chemokinrezeptoren in Metastasierungsprozessen von Tumoren.

Obwohl lange bekannt war, dass Chemokine und ihre Rezeptoren die Leukozytenmigration kontrollieren, wurde das Ausmaß dieser Erkenntnis erst deutlich, als die entscheidende Rolle von CCR7 und CCL21 für das Homing von T-Zellen in den Lymphknoten herausgefunden wurde. Das Chemokin CCL21 wird spezifisch von den high-endothelial-venules (HEV) der Lymphknoten exprimiert und wird benötigt, CCR7 positiven T-Zellen die Migration in die Lymphknoten zu ermöglichen (GUNN, FORSTER). Ähnliches wurde für das Chemokinrezeptor/Chemokin-Paar CXCR5 und CXCL13 gezeigt, welches die Migration von B-Zellen in den Lymphknoten kontrolliert (CYSTER). Diese Beobachtungen verdeutlichten, dass den Chemokinen und ihren Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei der normalen Migration lymphatischer Zellen im Körper beizumessen ist. Andererseits wurde, wie oben beschrieben, von Tumorzellen berichtet, die aberrant Chemokinrezeptoren exprimierten. Dies führte zu der Vermutung, Chemokine und ihre Rezeptoren könnten an der direkten Migration und Verteilung von Tumorzellen *in vivo* beteiligt sein. Diese Annahmen wurden stark von einer Arbeit unterstützt, in welcher gezeigt wurde, dass sich auf Mammakarzinom-Zellen nur wenige verschiedene aberrante Chemokinrezeptoren befanden, unter ihnen CXCR4 und CCR7. Die korrespondierenden Chemokine ließen sich interessanterweise insbesondere in den Geweben nachweisen, die häufig Ort für Mammakarzinom-Metastasen sind: CCL21 im Lymphknoten und CXCL12 in Lunge, Leber, Knochenmark, Lymphknoten und Gehirn. Dies lässt vermuten, dass CCL21 für Lymphknotenmetastasen und CXCL12 für Lungen-, Leber-, Knochenmark-, und Hirnmetastasen verantwortlich sein könnte. Weiter wurde gezeigt, dass die Mammakarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* auf die Chemokine reagierten, im Tierversuch verhinderte ein Antikörper gegen CXCR4 das Auftreten von Lungenmetastasen (MULLER;

siehe Abbildung 3). Die Transfektion einer normalerweise nicht metastasierenden Melanomzelllinie mit CCR7 befähigte diese Zelllinie in vivo, in die Lymphknoten zu migrieren (WILEY). Die Transfektion derselben Linie mit CXCR4 dagegen befähigte die Zelllinie, Lungenmetastasen zu bilden (MURAKAMI). Beim Prostatakarzinom wurde CXCR4 auf Zelllinien nachgewiesen und gezeigt, dass CXCL12 zu transendothelialer Chemotaxis und zur Adhäsion der Tumorzellen an Osteoklasten führt (KELLER).

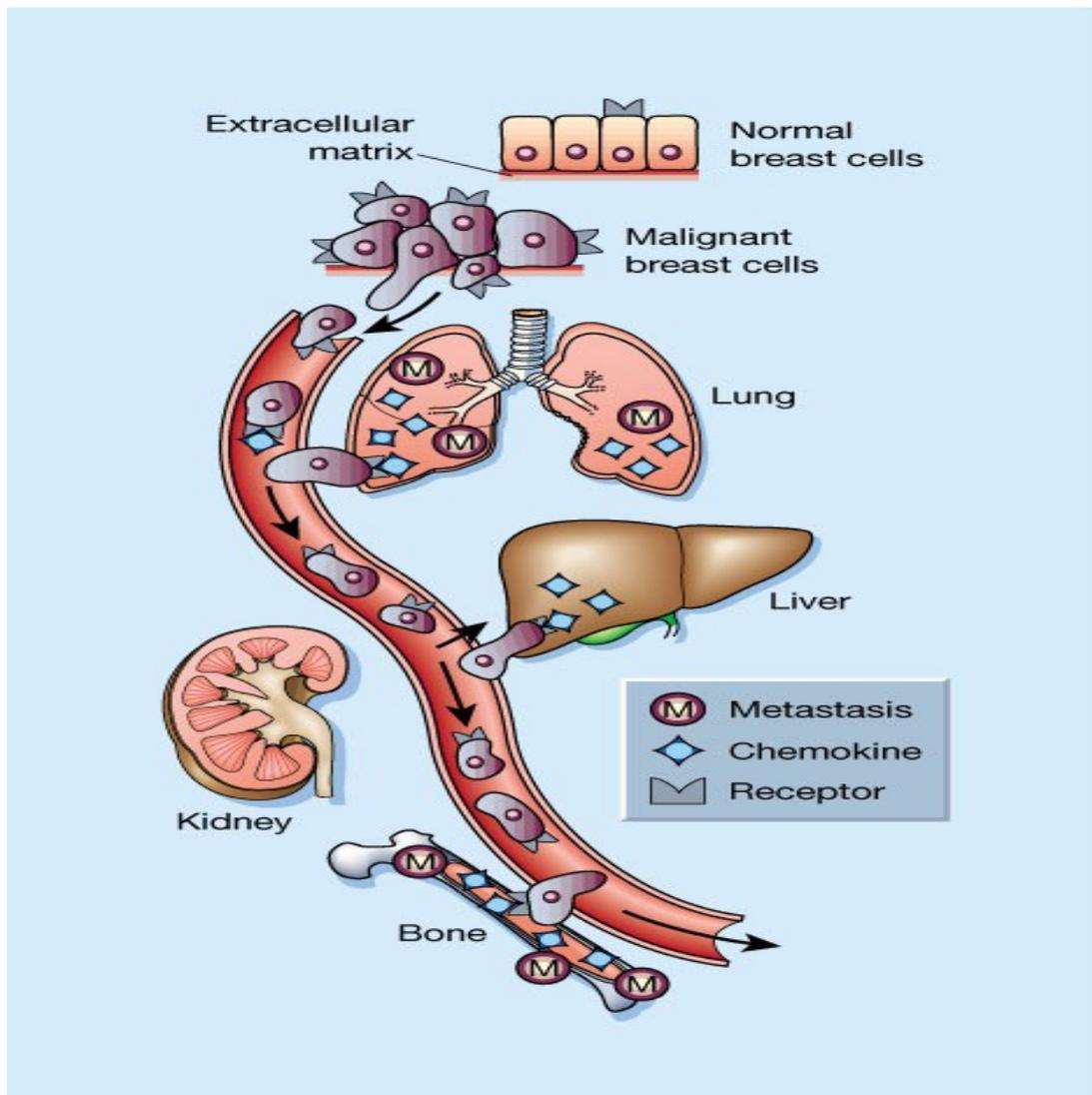


Abbildung 3: Schaubild Chemokin-Chemokinrezeptor Interaktionen und Metastasierung am Beispiel Mammakarzinom, aus LIOTTA

Die Bedeutung von CCR7 und CCL21 für die Ausbildung von Lymphknotenmetastasen ist in weiteren Arbeiten unterstützt worden. So wurde gezeigt, dass die CCR7 Expression beim Adenokarzinom des Magens (MASHINO) und beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus

(DING) mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert ist. Ein Zusammenhang von Lymphknotenmetastasen und CCR7 Expression der Tumorzellen besteht auch beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (TAKANAMI) und beim malignen Melanom (WILEY, TAKEUCHI). Auch die Rolle von CXCR4 bei der Metastasenbildung ist genauer untersucht worden. So ist die CXCR4 Expression der Tumorzellen mit der Entstehung von Lymphknotenmetastasen assoziiert beim Plattenepithelkarzinom der Zunge (UCHIDA 2003, DELILBASI) und beim invasiv-duktalem Mammakarzinom (KATO). Weiter wurde die CXCR4 Expression auf Prostatakarzinomzellen mit dem Auftreten von Knochenmetastasen assoziiert (TAICHMAN, MOCHIZUKI). Die Blockierung der CXCR4 Rezeptoren mit spezifischen Antagonisten vermindert im Tierversuch das Auftreten von Lungenmetastasen beim malignen Melanom (TAKENAGA), das Auftreten von Metastasen beim Mammakarzinom (MULLER, TAMAMURA, LIANG) und die Entstehung von KRK Mikrometastasen (ZEELENBERG).

Auch andere Chemokinrezeptoren scheinen bei der zielgerichteten Metastasierung von Tumoren eine Rolle zu spielen. So ist CCR9 wichtig für die Entstehung der seltenen Dünndarmmetastasen beim malignen Melanom (LETSCHE), und CXCR3 ist bedeutend für die Entstehung von Lymphknotenmetastasen beim malignen Melanom (KAWADA). Im Expressionsvergleich von Primärtumor und Metastase ist im Tierversuch gezeigt worden, dass CCR7 auf Tumorzellen von Lymphknotenmetastasen von Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals hochreguliert ist, während die CCR6 Expression herunterreguliert ist (WANG 2004).

Der Chemokinrezeptor CCR6 ist von besonderem Interesse bei der Lebermetastasierung des KRK. Der CCR6 Ligand CCL20 wurde ursprünglich in der Leber entdeckt und deswegen zunächst als liver- and activation-related chemokine (LARC) bezeichnet. CCL20 ist der einzige bekannte CCR6 Ligand aus der Gruppe der Chemokine und ist hauptsächlich in lymphatischem Gewebe und in der Leber exprimiert (HIESHIMA, SCHUTYSER). Das Chemokinrezeptor/Chemokin-Paar CCR6/CCL20 spielt eine wichtige Rolle bei der Chemoattraktion von T-Lymphozyten in die Leber (SHIMIZU, VARONA). CCR6 ist physiologischer Weise nur auf 10%-20% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert, die Mehrzahl der intrahepatischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen sind dagegen CCR6 positiv (SHIMIZU, SCHUTYSER). In major histocompatibility complex II (MHC-II) defizienten Empfängern von wild-Typ-Maus CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde 3 Wochen nach dem Zelltransfer eine mehr als zehnfache Erhöhung der CD4<sup>+</sup> T-Zell Leberinfiltrate beobachtet, wohingegen T-Zellen von CCR6 defizienten Mäusen nicht in der Leber akkumulierten

(VARONA). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass normale Kolonmukosazellen sowie KRK Zellen CCR6 exprimieren (IZADPANAHA, YANG). Als weiter gezeigt wurde, dass die im Tierversuch erzeugten Lebermetastasen einer von der Maus stammenden Multiplen-Myelom-Tumorzelllinie eine Hochregulation von CCR6 aufwiesen, wurde erstmals ein möglicher Zusammenhang von Lebermetastasierung und CCR6 Expression auf Tumorzellen postuliert. (DELLACASAGRANDE). Weitere notwendige Untersuchungen wie vergleichende Analysen der CCR6 Expressionslevel auf Kolonmukosa, gepaarten KRK Primärtumoren und KRK Lebermetastasen sowie Assoziation mit klinisch-pathologischen Merkmalen wie Lebermetastasierung wurden bisher nicht durchgeführt.

### **1.5 Chemokinrezeptoren als therapeutische Ziele**

G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind die am besten medikamentös zu beeinflussende Rezeptorklasse. Sie stellen die Zielstruktur für etwa 30% der zur Zeit verwendeten Medikamente dar. Als G-Protein gekoppelte Rezeptoren stellen Chemokinrezeptoren potentiell ein exzellentes Ziel für therapeutische Interventionen dar. Zum Einsatz könnten sowohl Protein-Therapeutika im Sinne von Antikörpern, rezeptorbindenden Proteinen und Proteinantagonisten als auch niedermolekulare Inhibitoren kommen. Darüberhinaus sind Therapeutika vorstellbar, welche innerhalb der Zelle die Signaltransduktionskette blockieren. Bei Chemokinen wäre in diesem Fall die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) die Zielstruktur. Seit 1996 bekannt wurde, dass CXCR4 und CCR5 als Co-Rezeptoren des HIV dienen, wurden große Anstrengungen in der Entwicklung von Chemokinrezeptor inhibierenden Therapeutika unternommen. Heute werden verschiedene Chemokinrezeptor inhibierende Therapeutika zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen, AIDS sowie malignen Erkrankungen in klinischen Studien im Rahmen von Phase I-III Studien getestet (WELLS).

### **1.6 Das kolorektale Karzinom (KRK)**

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist nach dem Lungenkrebs die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland. Es befällt überwiegend Personen im Alter von 50 Jahren und darüber. In Deutschland erkranken jährlich etwa 27 000 Männer und 30 000 Frauen. Damit ist es

die zweithäufigste Tumorerkrankung bei Frauen und die dritthäufigste bei Männern. Man kann davon ausgehen, dass sich die meisten kolorektalen Tumoren unabhängig von ihrer Ätiologie aus einem adenomatösen Polypen entwickeln, etwa ein Prozent dieser Läsionen entwickelt sich zu einem invasiven Adenokarzinom. Es wurden zahlreiche molekulare DNS-Veränderungen von Zellen adenomatöser Polypen, dysplastischer Veränderungen und Polypen mit carcinoma in situ beschrieben, die wahrscheinlich einem mehrstufigen Prozess entsprechen, wodurch aus normaler Kolonschleimhaut ein lebensbedrohliches invasives KRK entsteht. Hierzu gehören Punktmutationen im K-ras-Protoonkogen, Hypomethylierung der DNS, Verlust von DNS im Bereich eines Tumorsuppressorgens, das auf Chromosom 5 (5q21) lokalisiert ist, sowie Allelverlust auf Chromosom 17p und 18q (aus HARRISONS INNERE MEDIZIN 15.Aufl.).

Das KRK befällt häufiger Angehörige der oberen sozioökonomischen Schichten der Stadtbevölkerung. Risikofaktoren sind fettreiche, ballaststoffarme Ernährung, insbesondere mit tierischen Fetten. Immerhin 25 Prozent aller Patienten mit KRK haben eine positive Familienanamnese, was eine erbliche Disposition nahe legt. Man unterteilt die erblichen Dickdarmkarzinome in zwei Hauptgruppen, die seltenen Polyposis-Syndrome und die häufigeren Non-Polyposis-Syndrome. Effektive chemopräventive Substanzen, die die Entstehung von KRK reduzieren können, sind nicht steroidale Antiphlogistika, vor allem die COX-2-Inhibitoren. Auch erhöhte orale Folsäure- und Kalziumzufuhr scheint das Risiko für KRK zu verringern. Screeningverfahren sind von großer Bedeutung, da die möglichst frühzeitige Entdeckung eines lokalisierten oberflächlichen Tumors bei asymptomatischen Patienten die Heilungschance durch Operation vergrößert. Zur Zeit empfiehlt die Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten bei Personen mit durchschnittlichem Risiko (leere Familienanamnese für KRK bzw. Polypen, Adenome) ab dem 50. Lebensjahr Maßnahmen zur Früherkennung durchzuführen. Das Standardverfahren ist die Koloskopie; sie ist der Sigmoidoskopie überlegen. Bei Patienten, die eine Früherkennungs-Koloskopie ablehnen, sollte eine Sigmoidoskopie alle 5 Jahre sowie jährlich ein Hämokultttest (Guaiak-Verfahren) durchgeführt werden. Ein positiver Hämokultttest sollte nicht kontrolliert werden, sondern erfordert in jedem Fall eine Koloskopie.

Die klinischen Symptome des KRK variieren abhängig von der anatomischen Lokalisation des Tumors. Die Prognose ist eng mit der Eindringtiefe des Tumors in die Darmwand sowie dem Befall regionaler Lymphknoten und dem Vorhandensein von Fernmetastasen verbunden. Diese Variablen sind Bestandteil des Staging-Systems nach Dukes, welche durch die TNM-Klassifikation verfeinert wurde.

Weitere prädiktive Faktoren einer ungünstigen Prognose sind unter anderem ein histologisch schlecht differenzierter Tumor, Tumorperforation, Adhärenz an benachbarten Organen, Tumordinfiltration venöser Gefäße, ein präoperativ erhöhter CEA-Wert im Serum ( $>5,0$  ng/ml), Aneuploidie der Tumorzellen und eine spezifische chromosomale Deletion (Allelverlust auf Chromosom 18q). Die meisten Rezidive nach einer operativen Entfernung des Dickdarmkarzinoms treten innerhalb von vier Jahren nach dem Eingriff auf, sodass die Fünf-Jahres-Grenze als ziemlich verlässlicher Indikator einer Heilung gilt.

Stadium			Pathologisches Bild	Ungefähre Fünf-Jahres-Überlebensrate, %
Dukes	TNM	numerisch		
A	pT1N0M0	I	Infiltration beschränkt auf Mukosa und Submukosa	>90
B1	pT2N0M0	I	Infiltration erreicht die Muskularis	85
B2	pT3N0M0	II	Infiltration oder Penetration der Serosa	70-80
C	pTxN1M0	III	Befall regionärer Lymphknoten	35-65
D	pTxNxM1	IV	Fernmetastasen, (z.B. Leber, Lunge etc.)	5

Tabelle 3: Auswirkungen des Stagings auf die Prognose des Kolonkarzinom, aus Harrisons Innere Medizin, 15 Aufl.

Fortgeschrittene KRK metastasieren normalerweise in die regionalen Lymphknoten oder über den Pfortaderkreislauf in die Leber. Die Leber ist das am häufigsten von hämatogenen Fernmetastasen betroffene Organ. Zum Diagnosezeitpunkt haben bereits 20% der Patienten synchrone Lebermetastasen, und weitere 20% bis 30% der Patienten entwickeln metachrone Lebermetastasen im Krankheitsverlauf. Insgesamt findet ohne vorherige Lebermetastasierung eine Metastasierung in die Lunge, die supraklavikulären Lymphknoten, Knochen oder das Gehirn nur selten statt. Das Vorhandensein von Lebermetastasen beim initialen Staging ist der wichtigste Prognosefaktor für das Gesamtüberleben. Die 5-Jahres Überlebensrate von 90% bei Patienten mit lokal begrenztem, nicht muskelinvasiven Tumor, sinkt auf etwa 5% beim Vorhandensein von Fernmetastasen (JEMAL).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Zur Untersuchung der Frage, welche Rolle der Chemokinrezeptor CCR6 für Tumorprogression und Metastasierung beim KRK spielt, sollte die CCR6 Expression auf normaler Kolonmukosa, auf Primärtumoren und Lebermetastasen untersucht werden. Es sollte weiter überprüft werden, ob zwischen der CCR6 Expression auf Primärtumoren und dem Auftreten von synchronen Lebermetastasen ein Zusammenhang besteht.

Fragestellungen:

1. Wie ist die Expressionsfrequenz, Expressionsstärke und Lokalisation von CCR6 auf KRK Zelllinien und Tumorgewebe?
2. Gibt es einen Unterschied zwischen der CCR6 Expressionsstärke auf KRK Primärtumoren im Vergleich zur gepaarten normalen Kolonmukosa und gepaarten KRK Lebermetastasen?
3. Besteht ein Zusammenhang zwischen der CCR6 Expressionsstärke auf histologischen Schnittpräparaten von KRK Primärtumoren und dem Vorhandensein von synchronen Lebermetastasen?

## **2 MATERIAL UND METHODIK**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Patientenauswahl**

24 Patienten mit KRK und synchronen Lebermetastasen (Stadium M1) wurden TNM Stadium abhängig, randomisiert aus der institutionellen Datenbank der Abteilung für Allgemeine Pathologie, Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin ausgewählt. Zusätzlich wurden 40 Patienten mit KRK, ohne synchrone Lebermetastasen (Stadium M0) ebenfalls randomisiert ausgewählt. Von den ausgewählten Patienten hatten 37 Lymphknotenmetastasen. Keiner der Patienten hatte eine neo-adjuvante Chemotherapie erhalten. Alle Patienten hatten sich einer Kolonresektion in der Abteilung für Chirurgie, Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin, unterzogen. Von allen 64 ausgewählten Patienten waren Gewebsschnitte der Primärtumoren verfügbar. Von den Patienten mit synchronen Lebermetastasen waren in 16 der insgesamt 24 Fällen (66,6%) Gewebeschnitte der Lebermetastasen verfügbar. Die vorliegende Studie wurde von der institutionellen Ethikkommission geprüft und genehmigt.

#### **2.1.2 Gewebeschnitte**

Die Tumoren waren in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Um die Gewebe immunhistologisch zu untersuchen, wurden von einem repräsentativen Block jedes Tumors 3µm dicke Schnitte hergestellt und auf poly-L-lysine beschichtete Kapillarspalt-Objektträger aufgebracht und luftgetrocknet. Die Schnitte wurden jeweils 10 Min. in Xylol entparaffinisiert und rehydratisiert in einer absteigenden Alkoholreihe (100-70%). Für die CCR6 Färbungen wurden die Schnitte durch Kochen in Zitratpuffer (pH=6,0) für 2 Min. vorbereitet. Diese Vorbereitung der Schnitte führte zu optimalen Färbeintensitäten der Positivkontrolle. Nach der Färbung wurden die Schnitte bis zur Auswertung und Fotografie lichtgeschützt gelagert.

### **2.1.3 Tumorzelllinien**

Für diese Arbeit wurden die 14 KRK-Zelllinien Caco-2, Colo-205, Colo-206F, Colo-320, CX-2, DLD-1, HCT-116, HT-29, LST-174, SW-403, SW-480, SW-620, SW-948, SW-1116, (ATCC, American Type Culture Collection, MD, USA) verwendet.

### **2.1.4 Kulturmedium**

Für die Kultivierung der Tumorzellen wurde RPMI 1640 (Seromed Biochrom, Berlin) versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Seromed Biochrom), 1mM L-Glutamin, 100 U/l Penicillin und 100mg/l Streptomycin (Seromed Biochrom) verwandt. Dieses Medium wird im folgenden als Standardmedium bezeichnet.

### **2.1.5 Phosphatpuffer**

Als Phosphatpuffer diente PBS-Dulbecco ohne Zusatz von Magnesium und Kalzium (Dulbecco`s phosphat buffered saline, Seromed Biochrom).

### **2.1.6 FACS-Antikörper**

Die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 auf der Zellmembran bzw. im Zytoplasma wurde am FACS analysiert, es wurde hierbei Phycoerythin (PE) - markierter mouse anti-human CCR6 (R&D Systems) Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle wurde PE-konjugierter, isotypenspezifischer mouse anti-human IgG2B-PE Antikörper (R&D Systems) verwendet.

### **2.1.7 Antikörper und Material für die Immunhistochemie**

Als Primäantikörper wurde mouse anti-human CCR6, Verdünnung 1:50 (R&D Systems) verwendet. Als Brückenantikörper und als APAAP Immunkomplex wurde der Dako Cytomation Kit K5000 verwendet (DakoCytomation, Denmark).

## **2.2 Methodik**

### **2.2.1 Bestimmung der Zellzahl**

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer Zählkammer (Sigma), indem kleine Mengen der jeweiligen Zellsuspension mit den entsprechenden Mengen von 1:2 verdünntem Tryptan-Blau (Sigma) in PBS (Seromed Biochrom) angefärbt und unter dem Mikroskop vier Großquadrate ausgezählt wurden. Folgende Formel diente zur Berechnung der Gesamtzellzahl in der Ausgangslösung bei einem Volumen von 0,1 µl pro Großquadrat: Gesamtzellzahl der Ausgangslösung =  $0,25 \times \text{gezählte Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verd} \times \text{Vol}$  (Verd = Verdünnungsfaktor, Vol = Volumen der Ausgangslösung in ml)

### **2.2.2 Kultur der Tumorzelllinien**

Alle Zelllinien wuchsen größtenteils adhärent in Kulturflaschen (Falcon) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, wobei RPMI-Standardmedium als Kulturmedium diente. Das Medium wurde stets zum optimalen Zeitpunkt unter Berücksichtigung der Zelldichte gewechselt.

### **2.2.3 Fluoreszenzdurchflusszytometrie**

Die Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS) ermöglicht die Detektion spezieller Zellmerkmale wie Größe und Granularität sowie mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern (mAK) die Analyse von Oberflächenstrukturen auf verschiedensten Zellen. Man kann entweder direkt Fluoreszenz-markierte-mAK verwenden (direkte Färbung) oder einen unmarkierten primären Ak mit einem sekundären Fluoreszenz-markierten-AK koppeln (indirekte Färbung). Das Durchflusszytometer besteht aus einem Leitungssystem, das aus der Zellsuspension des Probenröhrchens Zellen aufnimmt, um sie dann einzeln an einem Laserstrahl vorbei zu leiten. Das Laserlicht wird durch die vorbeifließende Zelle gestreut und wird von einem Detektorsystem aufgefangen. Dabei wird die Vorwärtsstreuung als Maß für die Zellgröße, die Seitwärtsstreuung als Maß für die Granularität der Zelle erfasst. Zum anderen wird im Durchflusszytometer die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zelle bestimmt, welche mit der Dichte der jeweils angefärbten Oberflächenstruktur korreliert.

In unserem Fall wurde direkt PE-markierter CCR6 bzw. IgG2B Antikörper verwendet.

Ein Standardprotokoll für die Oberflächenexpression diente der Färbung der jeweils untersuchten Zellen: Tumorzellen wurden zunächst mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflaschen (Falcon) abgelöst, anschließend herunterzentrifugiert (1980 U/min), wieder in 2ml Standardmedium aufgenommen und gezählt. Die Zellen wurden anschließend auf die Probenröhrchen verteilt, wobei etwa  $1-2 \times 10^5$  Zellen pro Röhrchen verwendet wurden. Die Zellen wurden anschliessend für 10 min bei 4°C mit PBS + 2% Endoglobulin (Baxter) inkubiert. Dieser Schritt dient der Absättigung von freien Fc-Rezeptoren und soll die unspezifische Antikörper-Bindung minimieren. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4°C erfolgte die Färbung mit dem jeweiligen Ak für 30 min bei 4°C unter Lichtabschluss. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS + 2% Endoglobulin bei 4°C gewaschen und abschließend mit PBS + 1% Formalin fixiert. Für die Bestimmung der zytoplasmatischen Chemokinrezeptor Expression diente das folgende Färbeprotokoll für intrazelluläre Färbung: Bis zur Bestimmung der Zellzahl gleiche Arbeitsschritte wie beim Standardprotokoll für die Oberflächenfärbung. Dann Zugabe von BD-Facs TM Lysing Solution, nach Angabe des Herstellers und Zentrifugieren für 10 min, anschließend Aufnahme der Zellen in BD-Permeabilizing Solution 2 (beides Becton Dickinson) und Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur. Die letzten beiden Schritte dienen der Permeabilisierung der Zellen. Anschließend Zugabe von kaltem PBS + 2% Endoglobulin und Zentrifugieren für 10 min bei 4°C. Anschließend erfolgt die Färbung für 30 min unter Lichtabschluss, Waschen sowie Fixation der Zellen gemäß Standardprotokoll. Die Analyse erfolgte am gleichen oder darauffolgenden Tag mit einem FACS-Scan oder FACS-Calibur unter Verwendung der CellQuest-Software (Becton Dickinson). Es wurden die Zellgröße, Granularität und die PE-Fluoreszenz erfasst. Für jede Probe wurde ein Minimum von  $1 \times 10^4$  Zellen analysiert. In einer Einstellungsmessung wurde über die Darstellung der Zellgröße und Granularität in einem Punktwolkendiagramm die Tumorzellpopulation erkannt und als der zu erfassende Bereich ausgewählt. Dadurch wurde vermieden, dass mitgeführte tote Zellen und Zelldebris in der CCR6 Analyse miterfasst wurden. Im nächsten Schritt wurde die PE-Fluoreszenz der ausgewählten Tumorzellen in einem Histogramm logarithmisch dargestellt. Um nur die spezifische Fluoreszenzintensität zu messen, wurden Eigenfluoreszenz der Zellen und unspezifische Bindung von den Messergebnissen subtrahiert. Diese wurde durch Färbung mit einem irrelevanten, isotypenspezifischen IgG-PE-mouse AK ermittelt (Isotypenkontrolle). Die Ergebnisse sind als Mittelwert der CCR6 Fluoreszenzintensität angegeben. Dieser wurde errechnet, indem der Mittelwert der Isotypenkontrolle vom Mittelwert des spezifischen CCR6-Antikörpers subtrahiert wurde.

### **2.2.4 Immunhistochemie**

Von jedem KRK Fall wurden Schnitte Hematoxylin und Eosin (HE) sowie CCR6 gefärbt. Die immunhistochemische Färbung wurde mit der APAAP-Immunkomplex Methode durchgeführt. Nach der Vorbereitung wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und für 30 Min. mit dem Primärantikörper inkubiert (siehe Material). Danach wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper (APAAP link) und mit dem APAAP-Komplex für jeweils 30 Min. inkubiert. Dann wurden die Schnitte wiederum in sekundärem Antikörper und danach in APAAP-Komplex für jeweils 10 Min. und anschließend in chromogen red solution für 30 Min. inkubiert. Zwischen jedem dieser Arbeitsschritte wurde gründlich mit PBS gespült, wobei das PBS mehrmals erneuert wurde. Als nächstes wurden mit einer 1 Min. Hämatoxylin-Gegenfärbung die Zellkerne blau gefärbt und zum Schluss die Schnitte mit Gelatine (Kaiser's) eingedeckt. Um unspezifische Anfärbung zu identifizieren, wurden Schnitte als Negativkontrolle mitgefärbt, bei denen der primäre Antikörper durch PBS ersetzt wurde. Als Positivkontrolle diente lymphatisches Gewebe, Tonsillengewebe und Lymphknoten, hier wurden Lymphozyten CCR6 positiv gefärbt. Das Tonsillenepithel diente als zusätzliche Negativkontrolle. Ausserdem dienten die in den KRK-Schnitten mitgefärbten intramuralen Ganglienzellen sowie die mitgefärbten Lymphozyten als intrinsische Positivkontrolle, die intramurale Muskulatur dagegen war eine intrinsische Negativkontrolle.

### **2.2.5 Semiquantitative Evaluierung der Immunhistochemischen Färbungen**

Die Schnitte wurden bei der semiquantitativen visuellen Auswertung als immunopositiv für CCR6 gewertet, wenn  $\geq 1\%$  der Tumorzellen eine klare Anfärbung zeigten. Um die Anfärbung der einzelnen Tumoren miteinander vergleichen zu können, wurde - wie bereits von anderen beschrieben - versucht, jedem Schnitt eine „Immunoreaktivitäts-Maßzahl“ zuzuordnen, indem jeweils die Anzahl der positiven Zellen und die Färbeintensität beurteilt werden sollten (DING). Da jedoch in jedem untersuchten Schnitt die Anzahl der positiven Tumorzellen immer  $>95\%$  war, wurde zur Beurteilung der Chemokinrezeptor Expressionslevel nur die Färbeintensität begutachtet, welche mit: 0, keine; 1, schwach; 2, mittelstark; 3, stark bewertet wurde. Wo es möglich war, abseits des Tumorgewebes auch normale Kolonmukosa auf die Expression von Chemokinrezeptoren hin zu untersuchen, wurde dies entsprechend durchgeführt. Alle Schnitte wurden von zwei Untersuchern unabhängig voneinander, jeweils blind in Bezug auf klinisch-pathologische Eigenschaften der jeweiligen Tumoren, ausgewertet. Weniger als 10% der Fälle

wurden unterschiedlich bewertet, erneut begutachtet und nach Diskussion gemeinsam endgültig beurteilt. Bei den meisten KKK Fällen wurde mehr als eine Abtragungsebene des Tumors gefärbt und beurteilt.

### 2.2.6 Digitale Bildanalyse

Zur Quantifizierung der immunhistologischen Färbungen verwendeten wir ein digitales Bildanalyse-System (Digital Image Analysis, DIA) in Anlehnung an publizierte Methoden (NOUTSIAS 2001 und 2002). Dies wurde mit einem Makro, welches auf der Plattform LUCIA G™ (Version 3.52ab, Nikon, Düsseldorf, Germany) programmiert wurde, durchgeführt. Alle für die Färbung repräsentativen Anteile der einzelnen immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von einem Leica DMRD™ Mikroskop (Leica, Bensheim, Germany) bei 100facher Vergrößerung eingestellt, und wurden mittels eines Leica C-mount Adapters (0.35fache Vergrößerung) unter konstanten Lichtbedingungen auf eine Sony 3CCD™ color (Red-Green-Blue/RGB) Videokamera übertragen. Der zu analysierende Rahmen jedes der untersuchten Gesichtsfelder wurde auf die Tumorgewebs-Areale adjustiert. Nach digitaler Scharfstellung und Kontrastierung des eingefangenen Bildes in standardisierter Art und Weise im Rahmen des DIA-Makros wurden Artefakt-Areale, die nicht von Gewebe bedeckt waren und somit durchleuchtet wurden, durch einen konstanten RGB-Grenzwert (Minimum der RGB-Werte: 0,0,0 Maximum RGB-Werte: 13,21,17) detektiert und von der Rahmenfläche subtrahiert, woraus die reine Gewebsfläche automatisiert berechnet wurde. In einem zweiten Detektionsschritt wurden spezifisch die immunhistologisch gefärbten Areale innerhalb des Rahmens durch einen ebenfalls im DIA-Makro programmierten konstanten RGB-Grenzwert (Minimum der RGB-Werte: 75,0,60, Maximum RGB-Werte: 255,0,176) erkannt und quantifiziert. Die prozentuale CCR6-AF (Area Fraction) wurde unter Verwendung der folgenden Formel im Rahmen des DIA-Makros automatisiert ermittelt:

$$\frac{\text{immunhistologisch gefärbtes Areal}}{\text{reines Gewebs-Areal (ohne Artefakte)}} \times 100$$

### 2.2.7 Klinisch-pathologische Daten

Alle Daten wie Geschlecht, Alter, Differenzierung, TNM-Stadium und präoperativer Serum Carcino-Embryonales-Antigen (CEA) Wert stammen aus klinischen und pathologischen Dokumentationen der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin.

### 2.2.8 Auswertung und statistische Analysen

Für die statistische Auswertung wurden Alter und CEA dichotomisiert (d.h.,  $< v \geq 70$  Jahre alt und normal oder  $< 5 \mu\text{g/l}$  v erhöht oder  $\geq 5 \mu\text{g/l}$  CEA). Dadurch enthält die deskriptive Statistik der Fall-Charakteristika absolute und relative Zahlen für jeden demographischen und klinischen Faktor (siehe Tabelle 4). Der exakte Fisher-Test wurde für die konfirmatorische Analyse bezüglich potentieller Assoziationen zwischen semiquantitativer CCR6 Expression, dem Vorhandensein von Lebermetastasen und anderen Faktoren verwendet (siehe Tabelle 5).

Die Deskription der quantitativen digitalen Bildanalyse (DIA) bezüglich der CCR6 Expression umfasst Mittelwert, Standardabweichung, Median und Spannweite sowohl für die gesamte Studienpopulation als auch separat für die einzelnen Untergruppen. Für konfirmatorische Vergleiche von DIA zwischen den Untergruppen wurde der U-Test von Mann-Whitney bzw. der Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei Gruppen durchgeführt (siehe Tabelle 5). Für den verbundenen Vergleich zwischen CCR6 Expression im Primärtumor und CCR6 in der anhängenden normalen Kolonmukosa wurde der Vorzeichen-Test durchgeführt.

In der multivariaten Analyse mit Lebermetastasen als abhängige Variable wurde eine binäre logistische Regressionsanalyse mit Vorwärts- und Rückwärts-Selektion zur Modell-Identifikation durchgeführt (siehe Tabelle 6). Die Beurteilung der diagnostischen Genauigkeit der CCR6 Expression in Bezug auf das Vorhandensein von Lebermetastasen erfolgte mittels ROC-Analyse (receiver operating characteristic).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Analyse des Chemokinrezeptors CCR6 auf Tumorzellen mittels

##### Fluoreszenzdurchflusszytometrie

Um die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 in KRK Zellen zu bestimmen, untersuchten wir vierzehn von menschlichen KRK stammende Tumorzelllinien. Die Chemokinrezeptor Expression wurde sowohl auf der Membran sowie nach Permeabilisierung auch im Zytoplasma bestimmt. Die vierzehn untersuchten KRK Zelllinien exprimieren kein oder nur wenig CCR6 auf der Zellmembran. Demgegenüber sind alle untersuchten Zelllinien in variierender Intensität im Zytoplasma positiv für CCR6 (siehe Abbildung 4). Bei der Hälfte der Zelllinien handelt es sich um Einfachbestimmungen. Bei der anderen Hälfte der Zelllinien wurde die CCR6 Expressionsmessung wiederholt was zu vergleichbaren Ergebnissen führte (Daten nicht gezeigt).

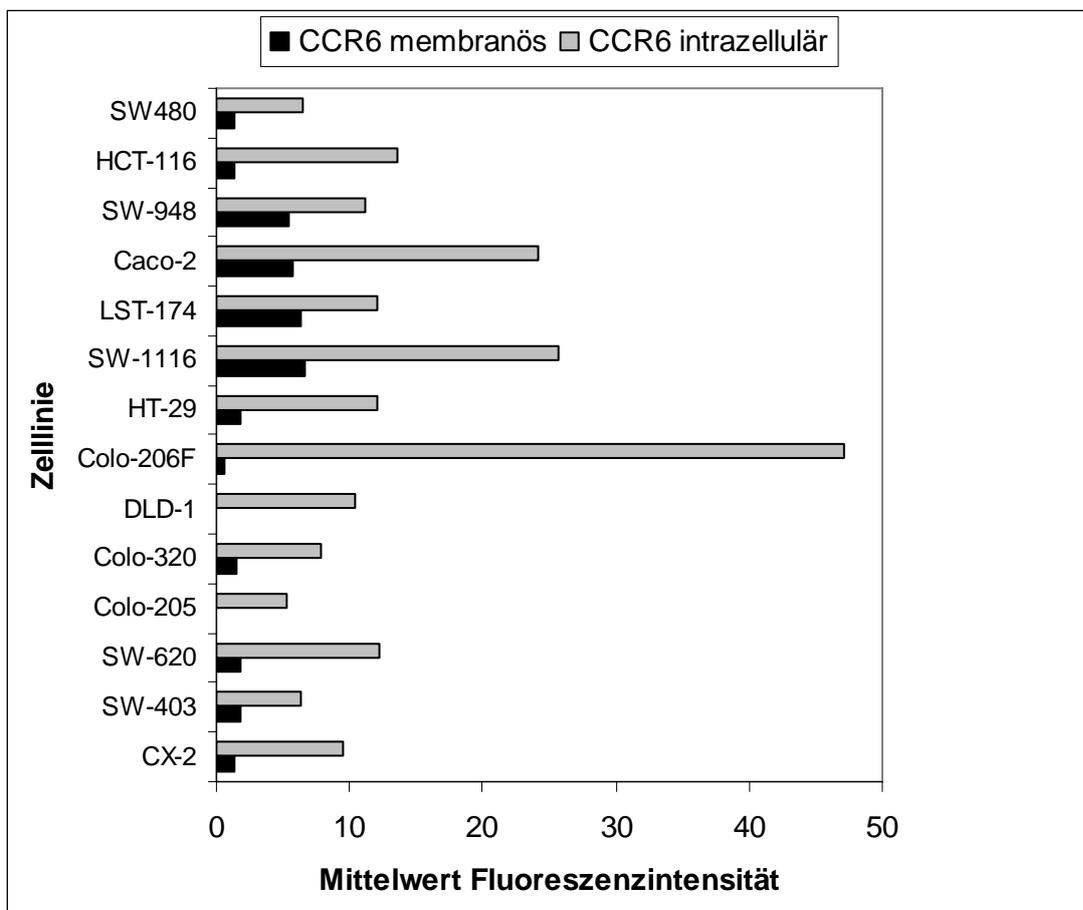


Abbildung 4: CCR6 Expression auf KRK Zelllinien, jeweils membranös und intrazellulär. (Mittelwert Fluoreszenzintensität=Mittelwert des spezifischer Antikörper-Mittelwert der Isotypenkontrolle)

### 3.2 CCR6 Expression auf KRK Primärtumoren

Um die Expression von CCR6 beim KRK zu verifizieren und um eine Korrelation der Expressionslevel mit klinischen und pathologischen Eigenschaften der Gewebeprobe zu ermöglichen, untersuchten wir die CCR6 Expression auf 64 KRK Paraffinschnitten mit verschiedenen TNM Stadien (Tabelle 4).

In allen primären KRK Schnitten war die überwiegende Mehrheit (>95%) der Tumorzellen und der anhängenden normalen Kolonschleimhaut positiv für CCR6. Das Färbungsmuster war größtenteils zytoplasmatisch, und es wurde keine klare membranöse oder nukleäre Färbung beobachtet. Die CCR6 Färbeintensität wurde sowohl semiquantitativ durch visuelle Auswertung als auch quantitativ durch digitale Bildanalyse (DIA) ausgewertet. Die semiquantitative Auswertung erbrachte eine unterschiedliche Färbeintensität unter den primären KRK Schnitten.

<b><u>Patienten und Tumor-Demografik</u></b>	
Fallzahl	64
Alter	
< 70 years	39 (60.9%)
≥ 70 years	25 (39.1%)
Geschlecht	
Männlich	31 (48.4%)
Weiblich	33 (51.6%)
Lokalisation	
Kolon	59 (92.2%)
Rektum	5 (7.8%)
Gewebeprobe	
Primärtumoren	64
UICC/AJCC Stadium	
pI	6 (9.4%)
pII	17 (26.6%)
pIII	17 (26.6%)
pIV	24 (37.5%)
Lebermetastasen *	24 (37.5%)
Differenzierung	
Gut	1 (1.6%)
Mittel	27 (42.2%)
Schlecht	36 (56.3%)
Präoperatives Serum CEA	
Erhöht	20 (31.3%)
Normal	26 (40.6%)
Nicht bestimmt	18 (28.1%)
*24 Patienten hatte synchrone Lebermetastasen	

Tabelle 4: Patienten und Tumor Demografik

CCR6 war schwach in 21 (33%), mittelstark in 32 (50%) und stark in 11 (17%) der Tumoren (siehe Abbildung 5).

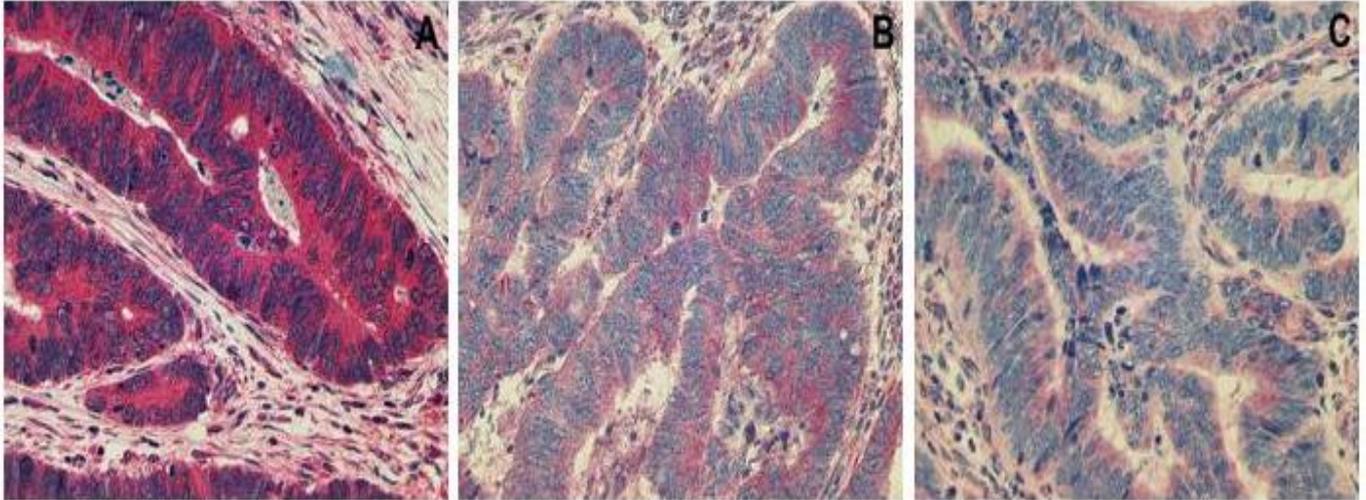


Abbildung 5: CCR6 Expression in KRK Primärtumoren mit A starker, B mittelstarker und C schwacher Expression (Originalvergrößerung, x 100). Die CCR6 Area Fraction Werte (CCR6-AF) der DIA für die starke, mittelstarke und schwache CCR6 Expression waren 90.1 %, 18.9 % und 0.02 %.

Gleichermaßen zeigte die quantitative Auswertung mittels DIA einen bis zu 3-log Unterschied in den CCR6-AF Werten von 0.01% bis 90.1% (Median, 19.3%) für die Primärtumoren. Erfreulicherweise korrelierte die DIA-quantifizierte CCR6-AF stark mit der visuellen Auswertung ( $P < .0005$ ; siehe Abbildung 6).

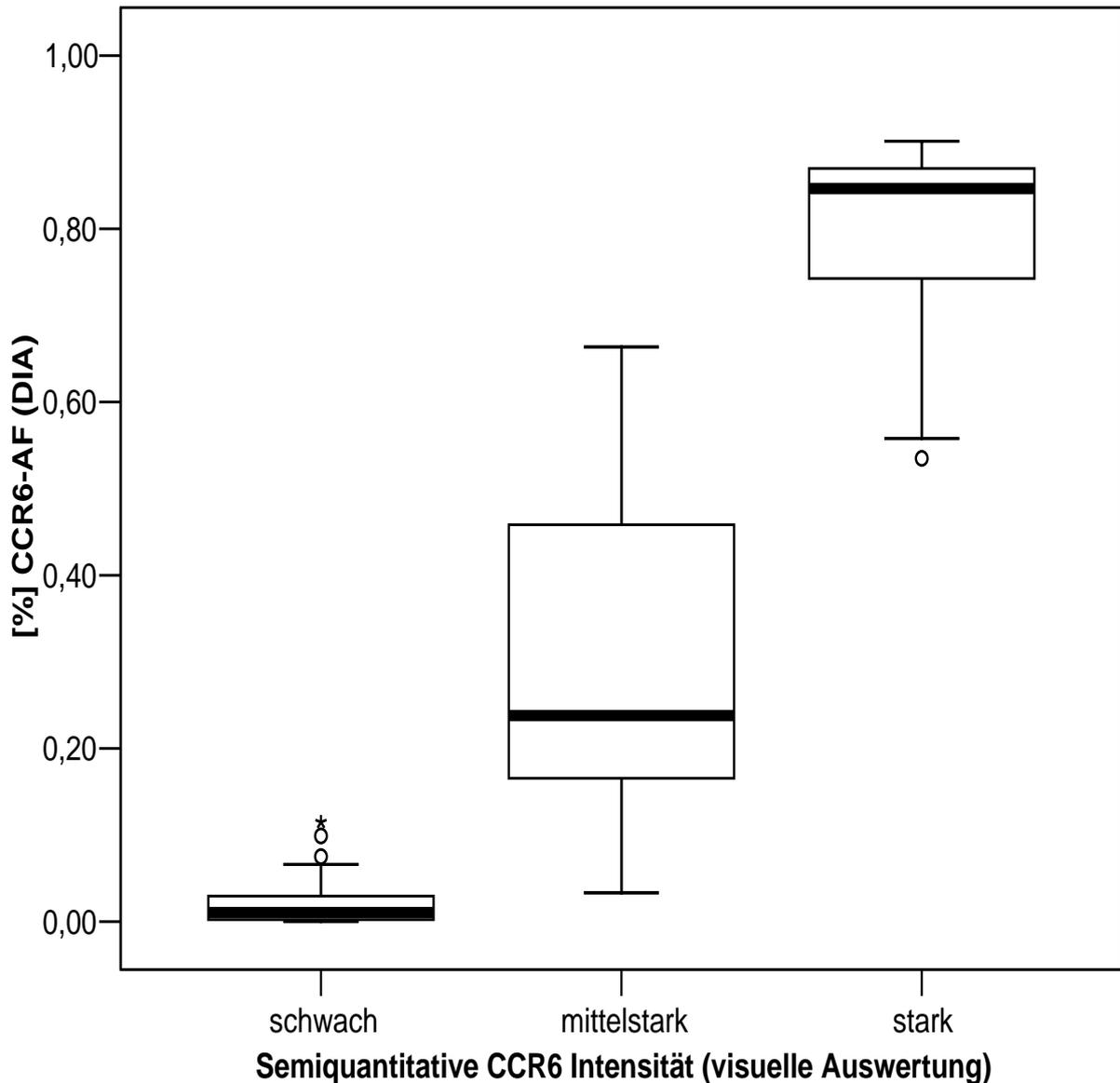


Abbildung 6: Korrelation der Ergebnisse der semiquantitativen, visuellen Auswertung für die CCR6 Expression auf KRK Primärtumoren, eingeteilt in drei Gruppen mit schwach (n = 21), mittelstark (n = 32) und stark (n = 11), mit den entsprechenden CCR6 Area Fraction (CCR6-AF) Werten der quantitativen DIA Auswertung ( $P < .0005$ ), Kreise repräsentieren Ausreißer, Sternchen repräsentieren Extremwerte.

### 3.3 Expressionsunterschiede zwischen normaler Kolonmukosa und KRK Primärtumoren

Auf den untersuchten Schnitten war in 53 von 64 Fällen (82,8%) auch anhängende normale Kolonmukosa vorhanden. CCR6 war in der überwiegenden Anzahl der Schleimhautzellen exprimiert (>95%), überwiegend intrazellulär. Wie auf dem KRK Tumorgewebe konnte auch in

der normalen Kolonmukosa keine eindeutig membranöse oder nukleäre Expression von CCR6 nachgewiesen werden.

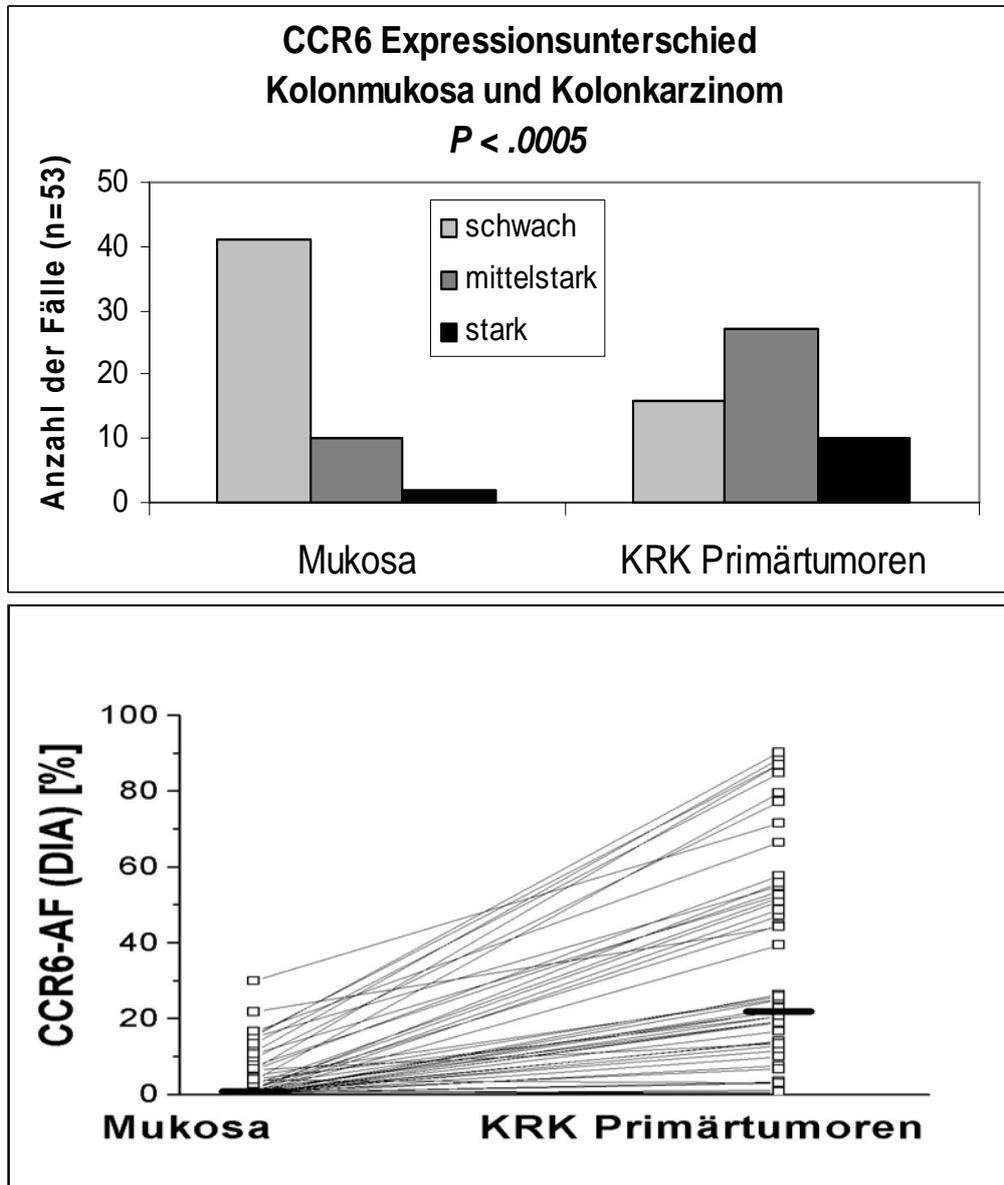


Abbildung 7: CCR6 Expressionsunterschiede bei 53 gepaarten Fällen mit normaler Kolonmukosa und KRK Tumorgewebe. A, semiquantitative visuelle Auswertung. B, quantitative Auswertung mittels DIA (*P* jeweils < .0005)

In der semiquantitativen Auswertung wurden bezüglich der CCR6 Expression von den 53 Mukosa Fällen 41 (77.4%) als schwach, 10 (18.9%) als mittelstark und 2 (3.8%) als stark klassifiziert. Im direkten Vergleich der korrespondierenden gepaarten KRK Primärtumoren mit der Kolonmukosa war die CCR6 Expression auf den Primärtumoren in 29 (54.7%) der Fälle

stärker, in 24 Fällen genauso stark und in keinem Fall schwächer als auf der Mukosa ( $P < .0005$ ; siehe Abbildung 7). Bei der quantitativen Auswertung mittels DIA waren ebenfalls im Vergleich zur normalen Kolonmukosa (CCR6-AF: Median, 0.7%; Streubreite, 0.02%-29.9%) die CCR6-AF Werte in den KRK stark hochreguliert ( $P < .0005$ ; siehe Abbildung 7).

### **3.4 Expressionsunterschiede zwischen KRK Primärtumoren und zugehörigen Lebermetastasen**

Um eine mögliche Herunter-Regulierung von CCR6 auf den Lebermetastasen, wie für intrahepatische CD8+ T-Zellen bereits beschrieben (SHIMIZU), zu untersuchen, analysierten wir soweit verfügbar auch das Gewebe der synchronen Lebermetastasen. Dies war in 16 der 24 Fälle (66.6%) möglich. In den untersuchten Lebermetastasen war CCR6 in der überwiegenden Mehrheit der Tumorzellen (>95%) exprimiert, vorwiegend im Zytoplasma; es wurde auch hier keine eindeutige membranöse oder nukleäre Expression nachgewiesen. In der semiquantitative Auswertung bezüglich der CCR6 Expression wurden von den Lebermetastasen 5 (31.2%) Fälle als schwach, 10 (62.5%) als mittelstark und 1 (6.3%) Fall als stark klassifiziert. Von den korrespondierenden gepaarten Primärtumoren wurde 1 (6.3%) Fall als schwach, 9 (56.3%) als mittelstark und 6 (37.5%) Fälle als stark klassifiziert. Beim direkten CCR6 Expressionsvergleich zwischen gepaarten Lebermetastasen und Primärtumoren war die CCR6 Expression in den Lebermetastasen in 8 (50%) Fällen schwächer, in 7 (43.7%) Fällen gleichstark und in 1 (6.3%) Fall stärker als in den korrespondierenden Primärtumoren (siehe Abbildung 8). Die CCR6-AF Werte in den Lebermetastasen (Median, 27.8%; Streubreite, 0.2%-64.4%; n=16) waren niedriger als in den gepaarten Primärtumoren (Median, 55.4%; Streubreite, 9.9%-90.1%) bei 12 der 16 Patienten ( $P = .02$ ; siehe Abbildung 8).

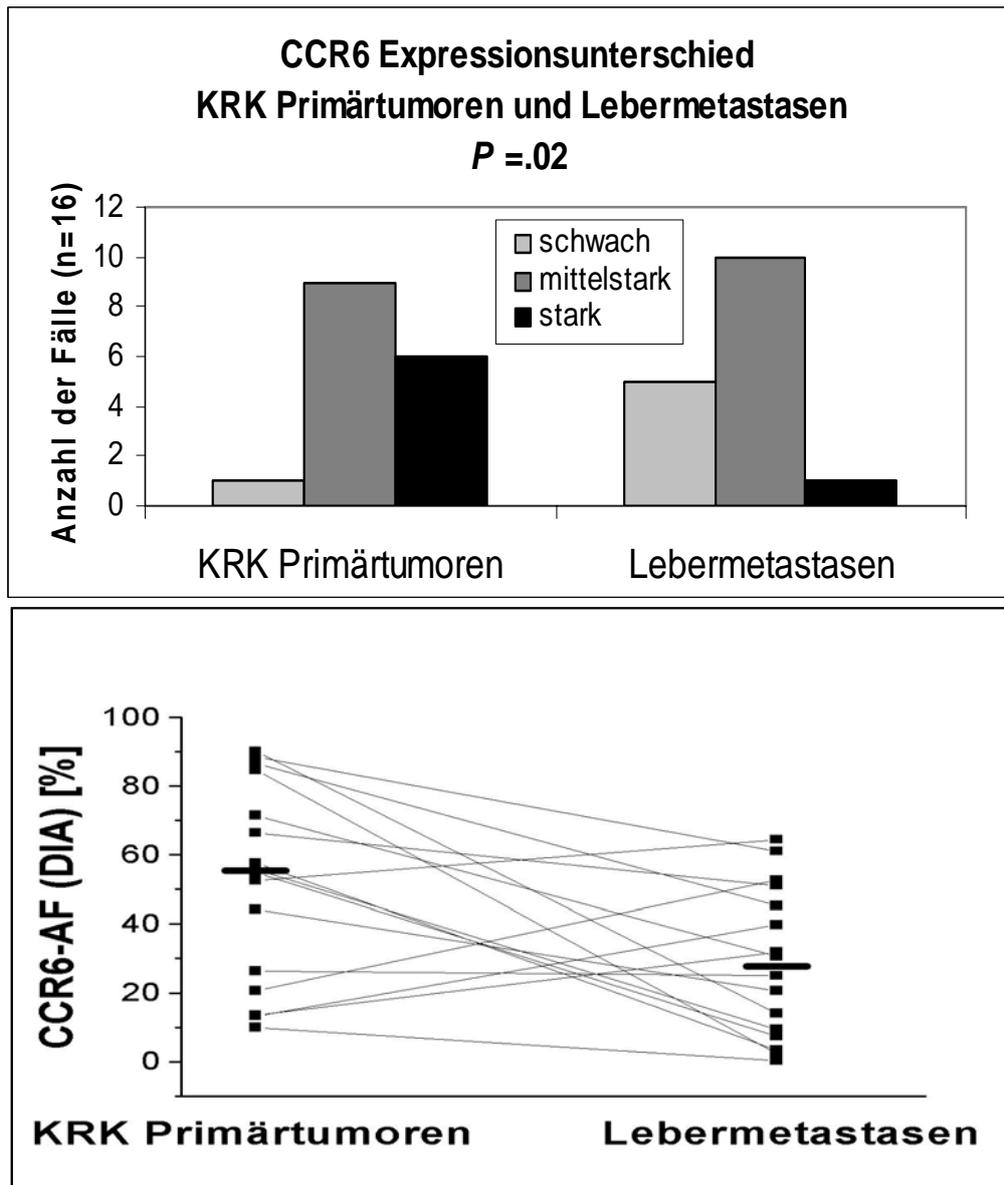


Abbildung 8: CCR6 Expressionsunterschiede bei 16 gepaarten Fällen KRK Primärtumoren und Lebermetastasen. A, semiquantitative visuelle Auswertung. B, quantitative Auswertung mittels DIA, (jeweils  $P=.02$ )

### 3.5 Korrelation zwischen CCR6 Expression der KRK Primärtumoren und Lebermetastasierung

Es wurden für die 64 Patienten Alter, Geschlecht, Lokalisation des Primärtumors, Differenzierung, Tumorgröße, Lymphknotenbefall, Vorhandensein von Lebermetastasen und präoperativer Serum CEA Wert erhoben (siehe Tabelle 4).

Vierundzwanzig der 64 Patienten hatten synchrone Lebermetastasen. Die univariate Analyse zeigte eine starke Assoziation zwischen CCR6 Färbeintensität und dem Vorhandensein von

Lebermetastasen ( $P < .0005$  sowohl für die visuelle Auswertung als auch für die Auswertung mittels DIA; siehe Tabelle 5). Von den 21 Patienten mit schwacher CCR6 Intensität hatten nur zwei Patienten Lebermetastasen. Im Vergleich dazu hatten von den 11 Patienten mit starker CCR6 Intensität 9 Patienten Lebermetastasen. Die DIA erbrachte einen CCR6-AF Median von 12% für Patienten ohne Lebermetastasen und 54% für Patienten mit Lebermetastasen. Außerdem zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen CCR6 und American Joint Committee on Cancer (AJCC) Stadium, verursacht durch die Verteilung der Stadium IV Patienten mit Lebermetastasen. Wir fanden ebenfalls eine Assoziation zwischen CCR6-AF und dem Vorhandensein von drei oder weniger regionalen Lymphknotenmetastasen (N1), aber nicht zwischen CCR6-AF und weiter fortgeschrittenen Lymphknotenmetastasen (N2 oder N3). Eine Assoziation zwischen CCR6-AF und weiblichem Geschlecht zeigte sich in der DIA, dies bestätigte sich aber nicht in der semiquantitativen visuellen Auswertung.

Es bestand keine Assoziation zwischen der CCR6 Expression und Alter, Geschlecht, Tumorgroße, Differenzierung und präoperativem Serum CEA.

Für die definitive konfirmatorische Analyse benutzten wir die CCR6-AF Werte der DIA Auswertung der Primärtumoren. Die Patienten wurden nach dem Vorhandensein von Lebermetastasen gruppiert und es wurde eine univariate Analyse sowie eine binäre logistische Regressionsanalyse durchgeführt um herauszufinden, ob CCR6-AF Werte einen unabhängigen Risikofaktor für Lebermetastasen darstellen (siehe Tabelle 6).

Die univariate Analyse zeigte wiederum eine hochsignifikante Assoziation zwischen Lebermetastasen und CCR6-AF Werten der Primärtumoren ( $P < .0005$ ).

Lebermetastasen waren ebenfalls mit Lymphknotenmetastasen ( $P = .008$ ) und präoperativem Serum CEA ( $P = .055$ ) assoziiert. Es bestand keine Assoziation zwischen Lebermetastasen und Alter, Geschlecht, Tumorgroße und Differenzierung.

<u>Klinische und pathologische Charakteristika und CCR6 Intensität bei primären kolorektalen Karzinomen</u>									
Klinischer Status	<u>CCR6 semiquantitative Auswertung</u>			P	<u>Quantitative digitale Bildanalyse</u>				P
	schwach	mittel.	stark		Mittelwert (% CCR6-AF)	SD (% CCR6 AF)	Median (% CCR6-AF)	Streuung (%CCR6-AF)	
Patienten	21	32	11		29.4	28.7	19.3	0.01-90.1	
Synchrone Lebermetastasen									
nein	19	19	2	< .0005	16.3	19.0	11.8	0.01-77.1	< .0005
ja	2	13	9		51.1	29.4	53.8	2.8-90.1	
Tumorgroße									
pT1	0	1	0	NS	20.5		20.5		NS
pT2	4	2	1		17.9	30.9	1.4	0.02-84.7	
pT3	8	20	8		34.5	29.2	22.3	0.01-90.1	
pT4	9	9	2		24.7	27.1	10.4	0.21-87.1	
Lymphknoten Metastasen									
pN0	10	14	3	.025	21.8	25.5	13.9	0.01-86.6	.009
pN1	0	10	4		50.6	22.4	51.3	13.3-87.1	
pN2	8	6	4		29.2	33.3	17.6	0.03-90.1	
pN3	3	2	0		11.4	7.5	9.9	2.9-19.3	
UICC/AJCC Stadium									
pI	3	3	0	.007	10.2	11.2	7.6	0.02-25.1	< .0005
pII	7	9	1		16.7	19.7	12.1	0.01-77.1	
pIII	9	7	1		18.2	20.9	5.8	0.03-53.5	
pIV	2	13	9		51.2	29.4	53.8	2.8-90.1	
Differenzierung									
gut	0	1	0	NS	13.9		13.9		NS
mäßig	13	11	3		22.6	25.8	16.1	0.03-84.7	
schlecht	8	20	8		34.9	30.3	23.1	0.01-90.1	
Präoperatives CEA, n = 46									
normal	8	15	3	NS	24.4	26.9	16.4	0.01-90.1	NS
erhöht	10	7	3		25.1	30.5	10.5	0.03-88.5	
Alter									
< 70 Jahre	13	19	7	NS	30.4	29.9	19.3	0.01-90.1	NS
≥ 70 Jahre	8	13	4		27.7	27.3	19.3	0.2-86.6	
Geschlecht									
weiblich	7	19	7	NS	34.9	27.9	24.9	2.8-87.1	.022
männlich	14	13	4		23.4	28.8	12.8	0.01-90.1	

Abkürzungen: AF, Area Fraction; mittel., Mittelstark; SD, Standardabweichung; UICC, International Union Against Cancer; AJCC, American Joint Committee on Cancer; CEA, Carcino-Embryonales-Antigen; NS, Nicht signifikant.

Tabelle 5: Klinische und pathologische Charakteristika und CCR6 Intensität bei primären KKR

Die binäre logistische Regressionsanalyse, mit dem Vorhandensein von Lebermetastasen als abhängige Variable und allen anderen klinischen und pathologischen Parametern als unabhängige Variablen, bestätigte, dass das Vorhandensein von Lebermetastasen stark mit den CCR6-AF Werten assoziiert ist, nach Vorwärts- und Rückwärts-Selektion (odds ratio = 2.1 bezogen auf 10 Einheiten Zuwachs in den quantitativen DIA Messungen;  $P = .002$ ; siehe Tabelle 6). In dem ausgewählten Modell war das Vorhandensein von Lebermetastasen ebenfalls assoziiert mit erhöhten präoperativen Serum CEA Werten (odds Ratio = 12.1;  $P = .027$ ) und mit Lymphknotenmetastasen (odds Ratio = 3.2;  $P = .032$ ). Vergleichbare Ergebnisse wurden erzielt bei Durchführung der multiplen logistischen Regressionsanalyse mit den Ergebnissen der semiquantitativen, visuellen Auswertung mit Klassifizierung der CCR6 Färbeintensität in schwach, mittelstark und stark (Daten nicht gezeigt).

Desweiteren erbrachte die ROC Analyse (Quantifizierung der Fehlerfreiheit von diagnostischen Parametern: Sensitivität und Spezifität) eine Fläche unter der Kurve von 0.92 (95% CI, 0.83 bis 1.0) für CCR6, Lymphknotenstatus und präoperativem Serum CEA Wert kombiniert, beziehungsweise 0.85 (95% CI, 0.75 bis 0.94), 0.69 (95% CI, 0.56 bis 0.82), und 0.67 (95% CI, 0.50 bis 0.84) für CCR6, Lymphknotenstatus und CEA Wert alleine.

<u>CCR6 und weitere klinisch-pathologische Eigenschaften in Bezug auf Vorhandensein von Lebermetastasen</u>						
		<u>Univariate Analyse</u>		<u>Multivariate Analyse</u>		
		Anzahl der Patienten mit Lebermetastasen (n=24)/ Anzahl aller Patienten (n=64)	<i>P</i> *	Odds Ratio [after forward / backward model selection]	<i>P</i> **	
klinischer Faktor						
CCR6	schwach	2 / 21	< .0005†	2.239‡	.005	
	mittelstark	13 / 32		[2.134]‡		
	stark	9 / 11				
CEA, n = 46	normal	5 / 26	.055	29.929	.026	
	Erhöht	10 / 20		[12.079]		
Geschlecht	weiblich	13 / 33	.800	.268	.291	
	männlich	11 / 31				
Alter	< 70	17 / 39	.291	.236	.265	
	≥ 70	7 / 25				
Tumorgröße	pT1	0 / 1	.542	1.318	.746	
	pT2	1 / 7				
	pT3	15 / 36				
	pT4	8 / 20				
Lymphknoten	pN0	4 / 27	.008	2.997	.075	
	pN1	8 / 15				[3.205]
	pN2	10 / 17				
	pN3	2 / 5				
Differenzierung	gut	0 / 1	.752	.311	.335	
	mäßig	9 / 27				
	schlecht	15 / 36				

Abkürzungen: CEA, Carcino-Embryonales-Antigen

\* Gemäß dem exakten Fisher' s Test

\*\*Gemäß multipler binärer logistischer Regressionsanalyse [nach Vorwärts/ Rückwärts selektion]

† *P* Wert entspricht sowohl den Ergebnissen der quantitativen digitalen Bildanalyse als auch denen der semiquantitativen visuellen Auswertung

‡ Odds Ratios beziehen sich auf zehn Einheiten Zuwachs in den quantitativen DIA Messungen

Tabelle 6: CCR6 und weitere klinisch-pathologische Eigenschaften in Bezug auf Vorhandensein von Lebermetastasen

## 4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit habe ich die Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR6 für das Auftreten von Lebermetastasen beim KRK untersucht. Als herausragendes Ergebnis zeigte sich, dass eine hohe CCR6 Expressionsstärke hochsignifikant mit Lebermetastasierung assoziiert ist. Darüber hinaus stellt CCR6 einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten von synchronen Lebermetastasen dar (GHADJAR).

### 4.1 CCR6 Expression beim KRK

Um die CCR6 Expression beim KRK zu beurteilen, wurden auf Proteinebene durchflusszytometrisch Zelllinien untersucht sowie immunhistochemisch KRK Tumormaterial analysiert. Die durchflusszytometrische Untersuchung der Zelllinien stellt eine geeignete Methode dar die CCR6 Expression in Tumorzellen zu quantifizieren und die Lokalisation von CCR6 auf der Zellmembran bzw. im Zytoplasma zu beschreiben. Um Patientenmaterial zu analysieren, stellt wegen der ausgezeichneten Erhaltung der Morphologie die immunhistochemische Analyse formalinfixierter und paraffineingebetteter Gewebe, die Methode der Wahl dar.

Auf allen 14 untersuchten Zelllinien ließ sich eine CCR6 Expression nachweisen. Die CCR6 Expressionsstärke variierte von Linie zu Linie (Abbildung 4), wobei CCR6 vorwiegend intrazytoplasmatisch lokalisiert war. In der immunhistochemischen CCR6 Färbung war in allen untersuchten 64 KRK Primärtumoren der überwiegende Anteil der Tumorzellen (>95%) CCR6 positiv. Die CCR6 Expressionsstärke variierte von schwach über mittelstark bis stark (Tabelle 5; Abbildung 5). CCR6 ist demnach regelmäßig und in der überwiegenden Mehrzahl der Tumorzellen beim KRK exprimiert. Eine CCR6 Expression von KRK Zellen auf Proteinebene ist bereits von verschiedenen Autoren beschrieben worden. (IZADPANA, DELLACASAGRANDE). Dies konnte von uns und anderen bestätigt werden (YANG, GHADJAR, BRAND 2006, RUBIE 2006(b)). Yang et al. waren allerdings die einzigen Autoren, die mittels Durchflusszytometrie eine deutliche membranöse CCR6 Expression auf drei untersuchten KRK-Zelllinien zeigen konnten. Diese membranöse Expression konnte von YANG darüber hinaus mittels konfokaler Lasermikroskopie bestätigt werden.

In 53 der 64 untersuchten KRK Schnitte war neben dem Tumorgewebe auch benachbarte Kolonmukosa im Präparat vorhanden, sodass hier zusätzlich die CCR6 Expression der Kolonmukosa untersucht und mit der des korrespondierenden Primärtumors verglichen werden konnte. In allen 53 untersuchten Fällen war CCR6 in der überwiegenden Anzahl der Kolonmukosazellen exprimiert (>95%). Allerdings war die CCR6 Expressionsstärke auf der Kolonmukosa signifikant schwächer als auf den Primärtumoren (Abbildung 7). In der Entwicklung von normalen Kolonmukosazellen zu malignen KRK Zellen findet demzufolge anscheinend eine CCR6 Hochregulation statt. Die Expression von CCR6 auf Kolonmukosa ist bereits beschrieben worden (IZADPANA). Eine CCR6 Hochregulation beim KRK ist erstmals von uns gezeigt worden (GHADJAR) und konnte kurze Zeit später auch von anderen bestätigt werden (RUBIE 2006(b)). Rubie et al. verglichen in ihrer Arbeit anhand von 30 Fällen KRK Gewebe mit der korrespondierenden Kolonmukosa. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CCR6 Transkripten auf dem KRK Tumorgewebe im Vergleich zur Kolonmukosa nahezu achtfach erhöht war. Diese Beobachtung auf mRNA Ebene konnte mittels Westernblot Analyse auch auf der Proteinebene bestätigt werden. Die beschriebene Hochregulation von CCR6 von der Kolonmukosa auf maligne Tumorzellen ist bemerkenswert und deutet auf eine Funktion von CCR6 in der Pathologie des KRK hin. Eine vergleichbare Hochregulation eines Chemokinrezeptors beim KRK ist in der Literatur ebenfalls für CXCR4 beschrieben worden (OTTAIANO).

Von den 64 untersuchten KRK Patienten hatten 24 synchrone Lebermetastasen. In 16 Fällen wurde ebenfalls Gewebe der Lebermetastasen untersucht, sodass ein CCR6 Expressionsvergleich zwischen Primärtumor und gepaarter Lebermetastase möglich war. Wie bei den Primärtumoren zeigte sich auch hier in der überwiegenden Anzahl der Tumorzellen (95%) eine CCR6 Expression. Im Vergleich zu den gepaarten Primärtumoren war die CCR6 Expressionsstärke in den meisten der untersuchten Lebermetastasen allerdings schwächer. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant (Abbildung 8). Es gibt beim KRK demzufolge offenbar einen Unterschied in der CCR6 Expression zwischen Primärtumorgewebe und Tumorgewebe von synchronen Lebermetastasen. Eine CCR6 Expression auf KRK Lebermetastasen war bisher in einer anderen Studie gezeigt worden (DELLACASAGRANDE). Hier wurde eine deutliche Hochregulation von CCR6 in einer kleinen (<2 cm) KRK Lebermetastase im Vergleich zu normalem Lebergewebe gezeigt. Die CCR6 Expression auf zwei größeren Lebermetastasen (9 cm und 9.5 cm) war dagegen im Vergleich zur normalen Leber (und der kleinen Lebermetastase) geringer. Ein direkter Vergleich der CCR6 Expressionsstärke zwischen KRK Lebermetastase

und Primärtumor ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Interessanterweise konnte die von uns erstmals beschriebene Herunterregulierung von CCR6 auf KRK Lebermetastasen im Vergleich zum Primärtumor (GHADJAR) kürzlich von anderen bestätigt werden (BRAND 2006). Brand untersuchte in seiner Arbeit KRK Primärtumorgewebe von 15 Patienten sowie Gewebe von KRK Lymphknotenmetastasen (n = 4) und Lebermetastasen (n= 6). Eine mittelstarke bis starke CCR6 Expression zeigte sich in 66.6% der Primärtumoren und im Vergleich nur in 50 % der Lymphknotenmetastasen, bzw. nur in 33.3% der Lebermetastasen.

Es ist beschrieben worden, dass die spezifische Bindung des Liganden generell die Internalisierung und den Abbau von Chemokinrezeptoren bewirkt (NEEL). Da CCL20 vor allem in der Leber exprimiert ist, könnte die niedrigere CCR6 Expressionsstärke auf den Tumorzellen der Lebermetastasen demzufolge durch eine CCL20-induzierte Herunterregulierung bedingt sein. Diese These wird von einer Studie unterstützt, in der eine CCR6 Herunterregulierung auf leberinfiltrierenden CD8+ T-Zellen im Vergleich zu CD8+ T-Zellen des peripheren Bluts gezeigt und weiter eine Herunterregulierung von CCR6 auf T-Zellen durch externe CCL20 Stimulation in vitro demonstriert werden konnte (SHIMIZU).

Assoziation von Chemokinrezeptor Expression mit KRK Lebermetastasen wurde abgesehen von CCR6 bislang nur für CXCR4 untersucht. Obwohl der CXCR4 Chemokin Ligand CXCL12 ebenfalls unter anderem verstärkt im Lebergewebe exprimiert ist, wurde in KRK Lebermetastasen im Vergleich zum Primärtumor eine CXCR4 Hochregulation beschrieben (ZEELLENBERG, KIM). Die CXCR4 Expressionsstärke auf Tumorzellen in KRK Lebermetastasen scheint daher anders als erwartet reguliert zu werden.

## **4.2 CCR6 und Lebermetastasierung beim KRK**

Beim KRK ist die Leber das am häufigsten von hämatogenen Fernmetastasen betroffene Organ. Die Tumorzellen gelangen hämatogen über den Pfortaderkreislauf in die Leber. Fasst man synchrone (20%) und metachrone Lebermetastasierung (20-30%) zusammen, bekommen etwa 40-50% aller Patienten im Krankheitsverlauf Lebermetastasen, was die 5-Jahres Gesamtüberlebenschance der Patienten auf etwa 5% senkt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die CCR6 Expressionsstärke der Primärtumoren von 64 KRK Patienten, von denen 24 synchrone Lebermetastasen hatten, mit klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Die CCR6 Expressionsstärke der immunhistochemisch gefärbten

Schnittpräparate wurde von zwei unabhängigen und bezüglich TNM Stadium geblindeten Gutachtern sowohl visuell am Mikroskop (DING), als auch mittels digitaler Bildanalyse (DIA; NOUTSIAS 2001 und 2002) ausgewertet. Erfreulicherweise korrelieren die Ergebnisse der DIA hochsignifikant mit denen der visuellen Auswertung (Abbildung 6).

Als herausragendes Ergebnis zeigte sich, dass eine hohe CCR6 Expressionsstärke auf KRK Primärtumoren mit dem Auftreten von synchronen Lebermetastasen assoziiert ist. Dieser Zusammenhang war statistisch hochsignifikant, sowohl für die visuelle Auswertung, als auch für die DIA (Tabelle 5). Die CCR6 Expressionsstärke war ebenfalls mit dem AJCC Stadium sowie mit dem Vorhandensein von 1-3 Lymphknotenmetastasen (Stadium N1) assoziiert, nicht jedoch mit weiter fortgeschrittener Lymphknotenmetastasierung (Stadium N2 oder N3). Die CCR6 Expressionsstärke war nicht mit Tumorgröße (T Stadium), Differenzierung (Grading), erhöhtem CEA Wert oder dem Patientenalter assoziiert. Beim Geschlecht ergab die DIA, die visuelle Auswertung dagegen nicht, einen statistisch schwach signifikanten Zusammenhang zwischen weiblichem Geschlecht und CCR6 Expressionsstärke (Tabelle 5). Die durchgeführte multiple logistische Regressionsanalyse, unter Einbeziehung anderer wichtiger Parameter, zeigte darüber hinaus bedeutenderweise, dass CCR6 einen unabhängigen Risikofaktor für die Entstehung von synchroner Lebermetastasierung darstellt (Tabelle 6). Präoperativ erhöhtes CEA und positiver Lymphknotenstatus sind Parameter, die bekannterweise beim KRK mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (COMPTON) und waren in unserer Patientenpopulation in der multivariaten Analyse ebenfalls unabhängige Risikofaktoren für Lebermetastasierung. Der Zusammenhang der CCR6 Expressionsstärke mit dem AJCC Stadium lässt sich dadurch erklären, dass AJCC Stadium IV definitionsgemäß den Fällen mit Fernmetastasierung entspricht. Der beobachtete Zusammenhang zwischen CCR6 Expressionsstärke und begrenzter Lymphknotenmetastasierung lässt sich ebenfalls durch die Fallverteilung erklären, da von den 27 Fällen ohne Lymphknotenbeteiligung (N0) nur vier Patienten, von den 37 Patienten mit Lymphknotenbeteiligung (N+) dagegen 20 Patienten Lebermetastasen hatten. Betrachteten wir nur die 40 Fälle ohne Lebermetastasierung (23 N0, 17 N+), konnten wir in dieser Untergruppe keinen Zusammenhang zwischen CCR6 Expressionsstärke und Lymphknotenmetastasierung feststellen (Daten nicht gezeigt).

Der von uns gefundene Zusammenhang zwischen CCR6 Expression des Primärtumorgewebes und synchroner Lebermetastasierung impliziert eine wichtige Rolle von CCR6 in der Pathogenese von Lebermetastasen beim KRK. Der genaue Mechanismus, durch den CCR6 zu verstärkter Lebermetastasierung führt, ist bislang jedoch noch nicht aufgeklärt. Gestützt auf die

Daten zahlreicher Tiermodelle käme als Mechanismus die verstärkte Chemotaxis von Chemokinrezeptor tragenden Tumorzellen in bestimmte Gewebe durch selektive Expression von Chemokinen in Betracht (MULLER, WILEY).

Hierzu passend wird der CCR6 Ligand CCL20 vor allem im Lebergewebe konstitutiv exprimiert. In immunhistologischen Färbungen ist CCL20 periportal lokalisiert, also genau dort, wo vermutlich die metastatischen KRK Zellen zuerst in das Leberparenchym eindringen (SHIMIZU). Hierzu passend ist in der Literatur beschrieben worden, dass intrahepatische CD4+ T-Zellen CCR6 signifikant stärker exprimieren als CD4+ T-Zellen im peripheren Blut (SHIMIZU). Außerdem konnte in einem CCR6-knockout Modell gezeigt werden, dass das T-Zell Homing in die Leber von der CCR6 Expression der T-Zellen abhängig ist (VARONA). So konnten Varona et al. zeigen, dass 3 Wochen nach Transplantation von Mäusen mit wild-Typ T-Zellen die Expression von CD4 mRNA in der Leber der Empfängermause etwa 10-fach höher war als bei einer Transplantation der Mäuse mit CCR6-defizienten T-Zellen. Legt man dieses Homing-Konzept zugrunde, könnten im Blut zirkulierende KRK Tumorzellen eine Chemoattraktion durch periportal exprimiertes CCL20 erfahren, welche durch eine veränderte CCR6 Expressionsstärke auf den Tumorzellen moduliert werden könnte. Die von uns beschriebene starke CCR6 Expression auf bestimmten KRK Primärtumoren könnte entsprechend dazu in diesen Fällen möglicherweise zu verstärkter Lebermetastasierung führen.

Neben der Expression von CCR6 beim KRK ist in der Literatur ebenfalls eine Expression des CCR6 Liganden CCL20 durch KRK Zellen beschrieben worden. CCL20 wird beim KRK konstitutiv exprimiert und in verschieden starkem Ausmaß sezerniert (IZADPANAHA, FUJIE, KWON, YANG, RUBIE 2006(b)). Wachsen die KRK Zellen polarisiert, so ist CCR6 größtenteils apikal lokalisiert, CCL20 wird dagegen vor allem basolateral sezerniert. Da bereits bei anderen Tumorentitäten gezeigt wurde, dass Chemokine durch autokrine Stimulation zu verstärkter Tumorprogression beitragen (WANG 2006), ist zusätzlich ein zweiter Mechanismus vorstellbar, durch den eine erhöhte CCR6 Expression auf KRK Zellen zu Tumorprogress und Metastasierung führen könnte. Die von uns beschriebene CCR6 Hochregulierung von normaler Kolonmukosa auf KRK könnte über verstärkte autokrine CCL20 Stimulation zu verstärkter Zellproliferation und Zellmigration führen (BRAND 2006) und damit Tumorprogress und Metastasierung begünstigen. Allerdings ist beschrieben worden, dass die CCL20 Expression auf kolorektal Karzinomzellen schwächer ist als auf normaler Kolonmukosa und dass auf KRK Tumorgewebe die CCL20 Expression mit zunehmendem TNM Stadium abnimmt (BRAND 2006).

Eine kürzlich erschienene Studie von Rubie et al. (RUBIE 2006(b)) zeigt interessanterweise, dass die CCL20 Expression in dem perimetastatischen, normalen Lebergewebe bei Patienten mit KRK Lebermetastasen im Vergleich zu normalem Lebergewebe von gesunden Patienten erhöht ist. Rubie et al. hatten die CCL20 Expression in 10 KRK Lebermetastasen mit 10 Proben von gutartigem Lebergewebe verglichen. Die Ergebnisse von Rubie sprechen dafür, dass Patienten, die KRK Lebermetastasen entwickeln, in ihrer Leber mehr CCL20 exprimieren als Patienten ohne Lebermetastasen. Dies deutet auf einen möglichen parakrinen Mechanismus hin: Der Tumor ist unter Umständen selbst in der Lage, die CCL20 Produktion im umliegenden Lebergewebe zu erhöhen. Dies könnte durch parakrine CCL20 Stimulation der KRK Zellen zu verstärkter Proliferation und Migration der Tumorzellen in der Leber führen (BRAND 2006).

In der Literatur sind aus der Familie der Chemokinrezeptoren, abgesehen von CCR6, noch CCR7 und CXCR4 im Zusammenhang mit Metastasierung beim KRK beschrieben worden. CCR7 Expression auf KRK Primärtumoren konnte in einer Studie mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen in Zusammenhang gebracht werden (GUNTHER). In einer anderen Studie konnte dies nicht bestätigt werden (SCHIMANSKI).

In einer Arbeit von Kim et al. wurde die prognostische Bedeutung einer starken Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 mittels einer multivariaten Analyse untersucht. Es konnte ein Zusammenhang von CXCR4 Expression und Tumorrezidivierung sowie niedrigerer Überlebenswahrscheinlichkeit nachgewiesen werden (KIM). Im Unterschied zu unserer Arbeit über CCR6 wurde in dieser Arbeit jedoch keine Assoziation zwischen CXCR4 und Lebermetastasierung beschrieben. In einer weiteren Studie wurde eine Assoziation von CXCR4 mit Fernmetastasierung beim KRK beschrieben (SCHIMANSKI). Schimanski zeigte, dass eine starke CXCR4 Expression signifikant mit erhöhtem AJCC Stadium, Lymphknotenmetastasen und mit Fernmetastasen assoziiert war. Allerdings wurde in dieser Studie die Organlokalisierung der Fernmetastasierung nicht angegeben. Außerdem wurde in dieser Arbeit keine multivariate statistische Analyse durchgeführt, sodass die Relevanz der Daten nur eingeschränkt beurteilbar ist. In einem Tierversuch ist gezeigt worden, dass eine Verringerung der membranösen CXCR4 Expression zu einer deutlich geringeren Metastasierungshäufigkeit der KRK Tumorzellen führt (ZEELLENBERG).

Um weitere Einblicke in die genaue Funktion von CCR6 bei der Lebermetastasierung des KRK zu erhalten, sollten sich weitere Versuche anschließen. Wichtig wäre es zu zeigen, ob die CCR6 Funktion durch einen neutralisierenden Anti-CCR6 Antikörper von außen blockiert werden

kann. Sollte dies der Fall sein, wäre es im nächsten Schritt von großer Bedeutung, in einem Tiermodell das Homing-Konzept für CCR6 Expression und Lebermetastasierung zu überprüfen und zu versuchen, Lebermetastasierung durch neutralisierende Anti-CCR6 Antikörper *in vivo* zu verhindern. Weiter könnten KRK Zelllinien mit si-RNA so transfiziert werden, dass die Zellen kein CCL20 mehr produzieren können. Dann sollten die Auswirkungen der Transfektion auf das Proliferations-, und Migrationsverhalten der Zellen überprüft werden. So könnte ein möglicher autokriner Stimulationsmechanismus durch CCL20 beim KRK untersucht werden.

### **4.3 Funktionalität von CCR6 beim KRK**

Angesichts der gefundenen Hochregulierung von CCR6 beim KRK, sowie dem Zusammenhang zwischen CCR6 Expression und Lebermetastasierung, stellt sich die Frage nach der Funktionalität von CCR6 beim KRK. Im Rahmen dieser Arbeit wurden von uns zwar keine funktionellen Untersuchungen durchgeführt, die Funktionalität von CCR6 beim KRK ist allerdings bereits von anderen untersucht und beschrieben worden. So wurde von Yang et al. gezeigt, dass CCL20 Stimulation von KRK Zellen eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung von p130<sup>cas</sup> bewirkt, was mit verstärkter Zelladhäsion assoziiert ist (YANG). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch CCL20 Stimulation in KRK Zellen CCL20 mRNA sowie die Produktion von IL-8 induziert wird. Weiter führt CCL20 Stimulation zur vorübergehenden Aktivierung der mitogen-activated protein (MAP) Kinasen ERK-1/2, was in Verbindung mit verstärkter Zellmigration steht. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CCL20 Stimulation signifikant die Proliferation einer KRK Zelllinie (HT-29) und Migration einer anderen KRK Zelllinie (SW480) verstärkt (BRAND 2006). Obwohl wir, sowohl durchflusszytometrisch als auch immunhistochemisch, CCR6 hauptsächlich intrazytoplasmatisch lokalisiert nachgewiesen haben, stellt CCR6 beim KRK also offenbar einen funktionellen Rezeptor dar. Es ist möglich, dass schon ein geringes Ausmaß an membranöser CCR6 Expression ausreicht, die beschriebene CCR6 Funktion zu erklären. Eine andere Erklärung wäre, dass es sich beim intrazellulären CCR6 um einen regulatorischen, intrazellulären Pool handelt, welcher eine rasche membranöse CCR6 Expression möglich macht (EBERT). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Yang et al. in einer Studie durchflusszytometrisch eine membranöse CCR6 Expression auf drei KRK Zelllinien nachweisen konnten, und diese membranöse Expression mittels konfokaler Lasermikroskopie auch bestätigen konnten (YANG).

Für CXCR4 ist beim KRK ebenfalls eine Funktionalität nach Stimulation mit dem Liganden CXCL12 beschrieben worden. CXCR4 ist beim KRK grundsätzlich stärker auf der Membran der Zellen exprimiert als CCR6, zusätzlich liegt CXCR4 in noch größerer Intensität im Zytoplasma vor als CCR6. Stimulation mit CXCL12 führt ebenfalls zu verstärkter Migration und Proliferation von KRK Tumorzellen (JORDAN, OTTAIANO, BRAND 2005).

#### **4.4 CCR6 als Zielstruktur für neue Therapiestrategien**

Die Aufklärung der Mechanismen, durch welche CCR6 und CCL20 zur Entstehung von Lebermetastasen beitragen, ist von großer Bedeutung, da es sich potentiell um neue Ziele für spezifische, therapeutische Interventionen handelt. Der Versuch, Metastasierung zu verhindern, indem Chemokinrezeptor-Chemokin Wechselwirkungen beeinträchtigt werden, ist eine vielversprechende neue Behandlungsstrategie (JOHNSON, WELLS). Verschiedene Chemokinrezeptor-Antagonisten sind zur Zeit in Entwicklung im Rahmen von Phase I-III Studien zur Behandlung von Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen und seit kurzem auch zur Behandlung von Krebserkrankungen. Die Beeinflussung der CCR6 und CCL20 Wechselwirkungen stellt eine neue Behandlungsstrategie dar, die zur Verhinderung von Lebermetastasen beim KRK entwickelt werden könnte.

#### **4.5 Schlussfolgerung**

Zusammenfassend liefert die vorliegende Studie den Nachweis einer signifikanten Assoziation zwischen CCR6 Expression auf KRK Primärtumorgewebe und dem Vorhandensein von synchronen Lebermetastasen. Weiter stellt die CCR6 Expression auf KRK Primärtumoren einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten von synchronen Lebermetastasen dar. Dadurch wird impliziert, dass CCR6 möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Lebermetastasen beim KRK spielt. Der genaue Mechanismus, durch den CCR6 zur Lebermetastasierung beitragen könnte, ist noch nicht bekannt. Einerseits könnten im Blut zirkulierende, CCR6 tragende Tumorzellen durch das in der Leber periportal exprimierte CCL20 chemotaktisch angelockt werden (Homing-Konzept). Andererseits könnte von den Tumorzellen selbst produziertes CCL20 zu verstärkter Proliferation und Migration der Tumorzellen führen (autokriner Mechanismus). Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass der Tumor selbst eine

Induktion der CCL20 Produktion in der Leber bewirkt, was dann wiederum zu verstärkter Proliferation und Migration der metastatischen KRK Tumorzellen führen könnte (parakriner Mechanismus). Für das genauere Verständnis und als Grundlage für die Entwicklung wirksamer neuer Therapiestrategien ist es notwendig, die Mechanismen, über die CCR6 an der Lebermetastasierung des KRK beteiligt ist, weiter zu charakterisieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Beim KRK ist die Leber das am häufigsten von hämatogenen Fernmetastasen betroffene Organ. In etwa 20% der Fälle liegen bei Erstdiagnose bereits synchrone Lebermetastasen vor, was die Fünf-Jahres-Überlebensrate der Patienten auf etwa 5% senkt. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR6 auf T-Zellen ist im Tiermodell mit deren Migration in die Leber assoziiert. Auch KRK-Zellen exprimieren CCR6. Diese Arbeit wurde durchgeführt um zu untersuchen, in welchem Ausmaß CCR6 beim KRK exprimiert ist, und ob die CCR6 Expressionsstärke mit dem Auftreten von synchronen Lebermetastasen assoziiert ist. Die CCR6 Expression wurde mittels Durchflusszytometrie an 14 Zelllinien und mittels Immunhistologie an 64 KRK Primärtumoren mit anhängender normaler Kolonmukosa bestimmt. Vierundzwanzig der 64 Patienten hatten synchrone Lebermetastasen. Die Auswertung der immunhistologischen Färbungen erfolgte semiquantitativ durch visuelle Auswertung und quantitativ durch digitale Bildanalyse (DIA). CCR6 Expression wurde auf allen Zelllinien, in allen 53 untersuchten Kolonmukosa Geweben und in allen der 64 Primärtumoren in verschiedenen Intensitäten nachgewiesen. 21 Tumoren (33%) waren schwach CCR6 positiv, 32 (50%) waren mittelstark CCR6 positiv und 11 (17%) waren stark CCR6 positiv. Die quantitative Auswertung mittels DIA, die eng mit der semiquantitativen Auswertung korrelierte, zeigte einen 3-log Unterschied in der CCR6 Expression. Die CCR6 Expression in den Tumorzellen war signifikant höher als in der normalen Kolonmukosa ( $P < .0005$ ). Eine hohe CCR6 Expressionsstärke war für beide Auswertungsmethoden hochsignifikant mit dem Auftreten von synchronen Lebermetastasen assoziiert ( $P < .0005$ ). Die durchgeführte multiple logistische Regressionsanalyse, welche die Faktoren Alter, Geschlecht, T-Stadium, N-Stadium, histologische Differenzierung und präoperatives Carcino-Embryonales-Antigen (CEA) mit einbezog, zeigte darüber hinaus, dass die CCR6 Expressionsstärke im Primärtumor, unabhängig von anderen relevanten Parametern, mit dem Vorhandensein von synchronen Lebermetastasen assoziiert war (odds ratio = 2.1;  $P = .002$ ).

Der Zusammenhang zwischen der CCR6 Expressionsstärke auf KRK Primärtumoren und dem Vorhandensein von synchronen Lebermetastasen deutet daraufhin, dass CCR6 und sein Ligand CCL20 an der Entwicklung von Lebermetastasen beteiligt sein könnten. Aus diesem Grund stellt CCR6 ein potentielles Ziel für zukünftige spezifische therapeutische Interventionen dar.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Arya M, Patel HR, Williamson M. Chemokines: key players in cancer. *Curr Med Res Opin* 2003;19(6):557-64.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001;357(9255):539-45.

Bradstock KF, Makrynikola V, Bianchi A, Shen W, Hewson J, Gottlieb DJ. Effects of the chemokine stromal cell-derived factor-1 on the migration and localization of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells within bone marrow stromal layers. *Leukemia* 2000;14(5):882-88.

Brand S, Dambacher J, Beigel F, et al. CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 2005;310(1):117-30.

Brand S, Olszak T, Beigel F, et al. Cell differentiation dependent expressed CCR6 mediates ERK-1/2, SAPK/JNK, and Akt signaling resulting in proliferation and migration of colorectal cancer cells. *J Cell Biochem* 2006;97(4):709-23.

Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am* 2001;10(2):243-55.

Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, et al. Prognostic factors in colorectal cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124(7):979-94.

Cyster JG, Ngo VN, Ekland EH, Gunn MD, Sedgwick JD, Ansel KM. Chemokines and B-cell homing to follicles. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;246:87-93.

Delilbasi CB, Okura M, Iida S, Kogo M. Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol* 2004;40(2):154-57.

Dellacasagrande J, Schreurs OJ, Hofgaard PO, et al. Liver metastasis of cancer facilitated by chemokine receptor CCR6. *Scand J Immunol* 2003;57(6):534-44.

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;9(9):3406-12.

Ebert LM, McColl SR. Up-regulation of CCR5 and CCR6 on distinct subpopulations of antigen-activated CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2002;168(1):65-72.

Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272(5263):872-77.

Forster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999;99(1):23-33.

Fujiie S, Hieshima K, Izawa D, et al. Proinflammatory cytokines induce liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ /CCL20 in mucosal epithelial cells through NF-kappaB. *Int Immunol* 2001;13(10):1255-63.

Ghadjar P, Coupland SE, Na IK, et al. Chemokine receptor CCR6 expression level and liver metastasis in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(12):1910-16.

Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(1):258-63.

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;116(5):726-33.

Harrisons Innere Medizin, 15. Auflage, Deutsche Ausgabe in Zusammenhang mit der Charité. McGraw-Hill, ABW Wissenschaftsverlag 2002:642-647.

Hieshima K, Imai T, Opdenakker G, et al. Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J Biol Chem* 1997;272(9):5846-53.

Homey B, Muller A, Zlotnik A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol* 2002;2(3):175-84.

Hromas R, Gray PW, Chantry D, et al. Cloning and characterization of exodus, a novel beta-chemokine. *Blood* 1997;89(9):3315-22.

Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997;91(4):521-30.

Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM, Kagnoff MF. Regulated MIP-3 $\alpha$ /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280(4):G710-19.

Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55(1):10-30.

Johnson Z, Schwarz M, Power CA, Wells TN, Proudfoot AE. Multi-faceted strategies to combat disease by interference with the chemokine system. *Trends Immunol* 2005;26(5):268-74.

Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE, et al. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest* 1999;104(8):1061-69.

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.

Kawada K, Sonoshita M, Sakashita H, et al. Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. *Cancer Res* 2004;64(11):4010-17.

Keller ET, Zhang J, Cooper CR, et al. Prostate carcinoma skeletal metastases: cross-talk between tumor and bone. *Cancer Metastasis Rev* 2001;20(3-4):333-49.

Kim J, Takeuchi H, Lam ST, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol* 2005;23(12):2744-53.

Kimsey TF, Campbell AS, Albo D, Wilson M, Wang TN. Co-localization of Macrophage inflammatory Protein-3alpha (MIP-3alpha) and its receptor, CCR6, promotes pancreatic cancer cell invasion. *Cancer J* 2004;10(6):374-80.

Kleeff J, Kusama T, Rossi DL, et al. Detection and localization of MIP-3alpha/LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1999;81(4):650-57.

Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, et al. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000;6(9):3530-35.

Kwon JH, Keates S, Bassani L, Mayer LF, Keates AC. Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;51(6):818-26.

Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, et al. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol* 2004;122(3):685-90.

Liang Z, Wu T, Lou H, et al. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res* 2004;64(12):4302-8.

Liotta LA. An attractive force in metastasis. *Nature* 2001;410(6824):24-25.

Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86(3):367-77.

Mantovani A, Muzio M, Garlanda C, Sozzani S, Allavena P. Macrophage control of inflammation: negative pathways of regulation of inflammatory cytokines. *Novartis Found Symp* 2001;234:120-31.

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.

Mochizuki H, Matsubara A, Teishima J, et al. Interaction of ligand-receptor system between stromal-cell-derived factor-1 and CXC chemokine receptor 4 in human prostate cancer: a possible predictor of metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320(3):656-63.

Mohle R, Failenschmid C, Bautz F, Kanz L. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* 1999;13(12):1954-59.

Mohle R, Schittenhelm M, Failenschmid C, et al. Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2000;110(3):563-72.

Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001;2(2):123-28.

Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410(6824):50-56.

Murakami T, Maki W, Cardones AR et al. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2002;62(24):7328-34.

Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994;12:593-633.

Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 2001;345(11):833-35.

Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(6):637-58.

Nicolson GL. Cancer progression and growth: relationship of paracrine and autocrine growth mechanisms to organ preference of metastasis. *Exp Cell Res* 1993;204(2):171-80.

Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, et al. Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 2001;104(3):275-80.

Noutsias M, Pauschinger M, Ostermann K, et al. Digital image analysis system for the quantification of infiltrates and cell adhesion molecules in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2002;8(5):MT59-71.

Ottaiano A, di Palma A, Napolitano M, et al. Inhibitory effects of anti-CXCR4 antibodies on human colon cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54(8):781-91.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889;1:571-73.

Qian F, Hanahan D, Weissman IL. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(7):3976-81.

Quillent C, Oberlin E, Braun J, et al. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 1998;351(9095):14-18.

Rawstron AC, Barrans SL, Blythe D, et al. In multiple myeloma, only a single stage of neoplastic plasma cell differentiation can be identified by VLA-5 and CD45 expression. *Br J Haematol* 2001;113(3):794-802.

Rodig SJ, Jones D, Shahsafaei A, Dorfman DM. CCR6 is a functional chemokine receptor that serves to identify select B-cell non Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol* 2002;33(12):1227-33.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-42.

Rubie C, Frick VO, Wagner M, et al. Enhanced expression and clinical significance of CC-chemokine MIP-3 alpha in hepatocellular carcinoma. *Scand J Immunol* 2006(a);63(6):468-77.

Rubie C, Oliveira V, Kempf K, et al. Involvement of chemokine receptor CCR6 in colorectal cancer metastasis. *Tumor Biol* 2006(b);27(3):166-74.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382(6593):722-25.

Schutysse E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14(5):409-26.

Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, et al. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behaviour of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(5):1743-50.

Shah MH, Porcu P, Mallery SR, Caligiuri MA. AIDS-associated malignancies. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 2002;20:633-64.

Shimizu Y, Murata H, Kashii Y, et al. CC-chemokine receptor 6 and its ligand macrophage inflammatory protein 3alpha might be involved in the amplification of local necroinflammatory response in the liver. *Hepatology* 2001;34(2):311-19.

Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, McCauley LK. Use of the stromal cell-derived Factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002;62(6):1832-37.

Takanami I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: Correlation with lymph node metastasis. *Int J Cancer* 2003;105(2):186-89.

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.

Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E, Hoon DS. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res* 2004;10(7):2351-58.

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.

Uchida D, Begum NM, Almofti A, et al. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 2003;290(2):289-302.

Uchida H, Iwashita Y, Sasaki A, et al. Chemokine receptor CCR6 as a prognostic factor after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21(1):161-68.

Varona R, Cadenas V, Gomez L, Martinez-A C, Marquez G. CCR6 regulates CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease responses. *Blood* 2005;106(1):18-26.

Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002;13(2):143-54.

Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149(2):755-61.

Wang JM, Deng X, Gong W, Su S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods* 1998;220(1-2):1-17.

Wang J, Xi L, Hunt JL, et al. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer Res* 2004;64(5):1861-66.

Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F, Parker MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res* 2006;66(6):3071-77.

Wells TN, Power CA, Shaw JP, Proudfoot AE. Chemokine blockers – therapeutics in the making? *Trends in Pharmacol Sci* 2006;27(1):41-47.

Wiley HE, Gonzales EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(21):1638-43.

Yang CC, Ogawa H, Dwinell MB, McCole DF, Eckmann L, Kagnoff MF. Chemokine receptor CCR6 transduces signals that activate p130Cas and alter cAMP-stimulated ion transport in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;288(2):321-28.

Yeatman TJ, Nicolson GL. Molecular basis of tumor progression: mechanisms of organ-specific tumor metastasis. *Semin Surg Oncol* 1993;9(3):256-63.

Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(24):9233-37.

Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 2003;63(13):3833-39.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12(2):121-27.

Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* 2004;14(3):181-85.

## **7 LEBENSLAUF**

„Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.“

## Veröffentlichungen:

Ghadjar P, Coupland SE, Na IK, Noutsias M, Letsch A, Stroux A, Bauer S, Buhr HJ, Thiel E, Scheibenbogen C, Keilholz U. Chemokine receptor CCR6 expression level and liver metastasis in colorectal cancer. J Clin Oncol 2006;24(12):1910-1916.

Scheibenbogen C, Ghadjar P, and Keilholz U. Chemokine Receptor CCR6 Expression in Colorectal Liver Metastasis, Reply to correspondence. J Clin Oncol 2006;24(32):5174.

## Poster:

Na IK, Ghadjar P, Coupland SE, Letsch A, Stroux A, Buhr HJ, Thiel E, Keilholz U, Scheibenbogen C. CCR6 expression levels in colorectal cancer are strongly associated with liver metastasis. ISBTc, 20<sup>th</sup> Annual Meeting 2005, Alexandria, Virginia, USA.

Na IK, Scheibenbogen C, Coupland S, Heufelder K, Ghadjar P, Bauer S, Letsch A, Busse A, Thiel E, Keilholz U. Colorectal cancer cells express a cytoplasmatic variant of CCR7 unreactive to external stimulation with the natural ligands CCL19 and CCL21: implications for the metastatic process. DGHO 2005, Hannover, Germany

Na IK, Scheibenbogen C, Adam C, Stroux A, Keilholz U, Ghadjar P, Busse A, Thiel T, Coupland SE. Nuclear CXCR4 is correlated with lymph node metastasis in lung cancer DGHO 2006, Leipzig, Germany

Datum

Unterschrift

## 8 ERKLÄRUNG

„Ich, Pirus Ghadjar, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Chemokinrezeptor CCR6 Expressionsstärke und Lebermetastasierung beim kolorektalen Karzinom selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## 9 DANKSAGUNG

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen für die Bereitstellung des Themas und für die wissenschaftliche Leitung, sowie für das mir in diesem Zusammenhang entgegengebrachte Vertrauen. Ganz herzlich bedanke ich mich auch für die exzellente Betreuung, die sehr gute fachliche Unterstützung, das professionelle Umfeld und die anregende und motivierende Kritik bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. Eckhard Thiel danke ich für die Bereitstellung der Forschungsmittel und der Forschungsstätte innerhalb seiner Klinik.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Keilholz möchte ich für die Anregungen und Hinweise danken, welche für das gute Gelingen meiner Arbeit entscheidend und für mich lehrreich und prägend waren.

Ich danke Frau PD Dr. med. Sarah Coupland für die gute Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut. Danke auch für die unzähligen Aufmunterungen und netten Worte die unsere Zusammenarbeit zu einer Freude gemacht haben.

Frau Dr. med. Anne Letsch sei herzlich für die kompetente, geduldige und liebe Einarbeitung gedankt. Gedankt sei gleichermaßen auch Dr. med. Dirk Nagorsen für die darauf folgende Betreuung meiner Arbeit.

Ich danke Frau Sandra Bauer für die freundlichen Erklärungen in Fragen der alltäglichen Laborarbeit, sowie die ständige Bereitschaft zu helfen und Fragen zu beantworten.

Ich danke Frau Margarete Bonitz für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke meinen Freunden Raimund Torpai, Herdis Schoenfelder, Kai Wagner, meinem Bruder Jaschar-Luis Ghadjar und meiner Freundin Juliane Block für ihr Interesse an meiner Laborarbeit, für ihr Verständnis und für ihre Unterstützung.

Ich bedanke mich von Herzen bei meinen Eltern für ihr Interesse und ihre großzügige Unterstützung zu jeder Zeit. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.