

Aus der
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression und Funktionalität der Chemokinrezeptoren
CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien
und melanomreaktiven T-Zellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Geraldine Anna Maria Lerch geb. Assfalg
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Scheibenbogen
2. Prof. Dr. rer. nat. P. Walden
3. Prof. Dr. rer. nat. St. Martin

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	7
1 Einleitung	8
1.1 Chemokine	8
1.2 Chemokinrezeptoren	10
1.3 CCR9 und sein Ligand Teck	10
1.4 CXCR4 und sein Ligand SDF-1 α	12
1.5 Funktionalität von Chemokinrezeptoren	14
1.6 Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei der T-Zell- Antwort gegen Tumoren	15
1.7 Chemokinrezeptoren und das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen	17
1.8 Bedeutung von Chemokinrezeptoren für die Metastasierung beim malignen Melanom	18
1.9 Zielsetzung der Arbeit	20
1.10 Experimentelle Vorgehensweise	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Material	21
2.2 Methoden	26
2.2.1 Gewinnung von mononukleären Zellen aus Vollblut	26
2.2.2 Auftauen von PBMCs	26
2.2.3 Separation von Tumorzellen aus Tumor/Metastasengewebe	26
2.2.4 Zellkultur	27
2.2.5 Bestimmung der Zellzahl.....	27
2.2.6 Durchflusszytometrie.....	28
2.2.7 Färbung von CCR9 und CXCR4 auf unstimulierten CD3+/CD8+ T- Lymphozyten	28
2.2.8 Färbung von CCR9 und CXCR4 auf melanomreaktiven T-Lymphozyten.....	29
2.2.9 Funktionelle Analyse von CXCR4 auf unstimulierten T-Zellen	30
2.2.10 Funktionelle Analyse von CXCR4 auf melanomreaktiven T-Zellen	31
2.2.11 CCR9- und CXCR4-Nachweis auf Melanomzelllinien	32
2.2.12 CCR9- Nachweis „in vivo“ auf Melanomzellen	32
2.2.13 Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR9	32
2.2.14 Aktinpolymerisation als Antwort auf TECK	33
2.2.15 Funktionalität von CXCR4 auf Melanomzellen	33
2.2.16 Statistische Analysemethoden	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Expression von CCR9 und CXCR4 auf CD3- und CD8-positiven T-Zellen bei gesunden Spendern und Melanompatienten.....	35
3.2 Expression von CCR9 und CXCR4 auf melanomspezifischen T-Zellen.....	36

3.3	Funktionelle Analyse von CXCR4 auf PBMCs gesunder Spender und Melanompatienten.....	38
3.4	Funktionelle Analyse von CXCR4 auf melanomreaktiven T-Zellen	39
3.5	Expression von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien.....	40
3.6	CCR9-Expression und Metastasierung in den Dünndarm.....	43
3.7	Expression von CCR9 auf unkultivierten Tumorzellen	43
3.8	Funktionelle Analyse von CCR9 - Rezeptor-Internalisation und Aktinpolymerisation	44
3.9	Funktionelle Analyse von CXCR4 - Kalziummobilisation.....	47
3.10	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	49
3.10.1	Sind signifikante Unterschiede in der Expression von CCR9 und CXCR4 auf CD3+/CD8+ T-Lymphozyten zwischen gesunden Spendern und Melanompatienten vorhanden?.....	49
3.10.2	Sind signifikante Unterschiede der CCR9- und CXCR4-Expression auf der Gesamtpopulation der CD3+/CD8+ T-Lymphozyten im Vergleich zu tumorreaktiven CD3+/CD8+ T-Lymphozyten nachweisbar?	51
3.10.3	Besteht ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Metastasen und der (funktionellen) Expression von CCR9 bzw. CXCR4 auf Melanomzelllinien?.....	53
3.10.4	Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien?	59
4	Diskussion	60
4.1	Expression von CCR9 und CXCR4 auf CD3+/CD8+ T-Zellen	60
4.2	Expression und Funktionszustand von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien.....	63
4.3	Chemokinrezeptoren und deren Funktion in Zusammenhang mit Metastasierung.....	67
4.4	Klinische Bedeutung.....	68
5	Zusammenfassung.....	69
	Literaturverzeichnis	70
	Lebenslauf.....	84
	Veröffentlichungen	85
	Danksagung.....	86
	Erklärung.....	87

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AM	Azetomethylester
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATCC	American type culture collection
BM	Bone marrow
BSA	Bovines Serumalbumin
CBF	Charité, Campus Benjamin Franklin
CCL	C-Chemokin Ligand
CCR	C-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CLA	Cutaneous lymphocyte-associated antigen
CVK	Charité, Campus Virchow-Klinikum
CXCL	CX-Chemokin Ligand
CXCR	CX-Chemokinrezeptor
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment cristalline/cristallizable
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	(Vielfaches der mittleren) Erdbeschleunigung
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-colony-stimulating factor
gp120	Glykoprotein 120
GPR-9-6	G-Protein gebundener Rezeptor-9-6
HAART	Highly active anti-retroviral therapy
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IC IFN- γ	Intrazelluläres Interferon- γ
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton

MC	Mononuclear cells
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NED	No evidence of disease
n. d.	nicht durchgeführt
Pat.	Patient
PB	Peripheral blood
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PMA	Phorbol-Myristat-Azetat
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Realtime polymerase chain reaction
s	Sekunde
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor-1 α
Tab.	Tabelle
TECK	Thymus expressed chemokine
Th2	T-Helferzellen 2
TUZ	Tumorzellen
U/min	Umdrehungen pro Minute
UICC	Union internationale contre le cancer
Verd.	Verdünnungsfaktor
VLA	Very late antigen
Vol.	Volumen
z. B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Herkunft der Tumorzelllinien
- Tab. 2: CCR9- und CXCR4-Expression auf CD3+/CD8+ T-Zellen gesunder Spender
- Tab. 3: CCR9- und CXCR4-Expression auf unstimulierten CD3+/CD8+ T-Zellen von Melanompatienten
- Tab. 4: CCR9- und CXCR4-Expression auf melanomspezifischen CD3+/CD8+ T-Zellen
- Tab. 5: Zusammenfassung der Expression und Funktionalität von CCR9 und CXCR4 auf Tumorzelllinien
- Tab. 6: Vergleich der CCR9- (A) bzw. CXCR4- (B) Expression auf unstimulierten T-Lymphozyten von gesunden Spendern und Melanompatienten
- Tab. 7: Vergleich der Expression von CCR9 (A) und CXCR4 (B) auf unstimulierten und melanomreaktiven CD3+/CD8+ T-Lymphozyten von Melanompatienten
- Tab. 8: Zusammenhang zwischen der CCR9-Expression auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisation
- Tab. 9: Zusammenhang zwischen der funktionellen Expression von CCR9 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisation
A) Internalisation von CCR9 in Reaktion auf TECK (Intern. TECK)
B) Aktinpolymerisation in Reaktion auf TECK (Aktinpol. TECK)
- Tab. 10: Zusammenhang zwischen der Expression von CXCR4 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisation
- Tab. 11: Zusammenhang zwischen der funktionellen Expression von CXCR4 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisation
- Tab. 12: Zusammenhang zwischen der Expression von CCR9 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisation Dünndarm
- Tab. 13: Zusammenhang zwischen der funktionellen Expression von CCR9 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisation Dünndarm
A) Rezeptor-Internalisation nach Stimulation mit TECK (Intern. TECK)
B) Aktinpolymerisation nach Stimulation mit TECK (Aktinpol. TECK)
- Tab. 14: Zusammenhang zwischen der Expression von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Wirkungsbereiche von Chemokinen
- Abb. 2: Strukturelle Einteilung der Chemokine
- Abb. 3: IFN- γ Sekretion von CD3+/CD8+ T-Lymphozyten vor und nach Stimulation (links) mit autologen Tumorzellen (TUZ), CCR9-Expression (rechts oben) sowie CXCR4-Expression (rechts unten) jeweils auf unstimulierten und mit autologen Tumorzellen stimulierten (melanomreaktiven) T-Lymphozyten bei Patient 8 (UKBF-Mel 13A)
- Abb. 4: A) Expression von CXCR4 auf CD3+/CD8+ T-Zellen
B) Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-3 nach Stimulation mit SDF-1 α (bei t=400 s) auf CD3+/CD8+ T-Zellen von Patient 1 (UKBF-Mel 12)
- Abb. 5: Produktion von IFN- γ auf CD8+ T-Zellen (links), Kalziummobilisation in Reaktion auf den CXCR4-Liganden SDF-1 α (rechts) bei IFN- γ +/CD8+ Lymphozyten von Patient 1 (UKBF-Mel 12)
- Abb. 6: CCR9-Expression auf Melanomzelllinien
- Abb. 7: CXCR4-Expression auf Melanomzelllinien
- Abb. 8: CCR9-Expression auf frisch gewonnenen Zellen aus einer Dünndarmmetastase
- Abb. 9: A) und B) Funktionalität von CCR9
- Abb. 10: Funktionalität von CCR9 in der frisch gewonnenen Einzelzellsuspension
A) Fluoreszenzintensität von CCR9 (in der ersten Zeile unstimuliert und in der zweiten Zeile nach Stimulation der Zellen mit TECK)
B) Prozentualer F-Aktin-Gehalt ohne Stimulation und nach Zugabe von TECK bzw. der Positivkontrolle PMA sowie des CCR7-Liganden CCL21
- Abb. 11: Funktionalität von CXCR4 bei Patient 1 (UKBF-Mel 12)

1 Einleitung

1.1 Chemokine

Das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen sowie die Wanderung von Leukozyten im Gewebe sind Prozesse, die nicht zufällig sind, sondern einer hoch organisierten Steuerung unterliegen. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass Chemokine und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Migration spielen.

Die Chemokine sind eine Familie kleiner chemotaktischer Zytokine, die aus 70–125 Aminosäuren bestehen (KIM 1999). Ihre Wirkung entfalten sie über Rezeptoren auf der Plasmamembran ihrer Zielzellen. Hier induzieren sie eine Veränderung des Zytoskeletts (BAGGIOLINI), Adhäsion an Endothelzellen (CAMPBELL, ENGL) und gerichtete Migration (ZLOTNIK). In verschiedenen Mengen können sie von allen Zelltypen sezerniert werden (MURPHY). Manche Chemokine, wie z. B. das Fraktalkin, werden nicht sezerniert, sondern auf der Zelloberfläche exprimiert (IMAI). Die Produktion der meisten Chemokine setzt inflammatorische Signale anderer Zellen voraus, weshalb sie als inflammatorische Chemokine bezeichnet werden. Einige Chemokine jedoch, wie SDF-1 α und TECK, sind Produkte ruhender Zellen (MURPHY) und werden gewebespezifisch exprimiert. Sie werden als konstitutive Chemokine bezeichnet. Ursprünglich wurden Chemokine durch ihre Fähigkeit charakterisiert, Chemotaxis (oder transendotheliale Migration) in Leukozyten zu induzieren. Das erste Chemokin wurde 1987 aus Monozyten isoliert und durch seine chemotaktischen Eigenschaften auf neutrophile Granulozyten definiert (YOSHIMURA, WALZ). Es wurde später als Interleukin-8 bzw. CXCL8 bezeichnet. Seitdem sind mehr als 40 verschiedene Chemokine beschrieben. Ihnen wird eine wichtige Bedeutung (siehe Abb. 1) bei entzündlichen Erkrankungen, Hämatopoese, Angiogenese, Tumorabwehr und HIV-Infektion beigemessen (ROSSI, SALLUSTO, BALESTRIERI). Ihr Einfluss auf das Immunsystem bezieht sich vor allem auf T-Zellen, von denen zahlreiche Untergruppen jeweils durch ein spezifisches Profil an Chemokinen von verschiedenen Geweben angelockt werden (SEBASTIANI). Es konnte auch gezeigt werden, dass Chemokine in allen Stadien der Tumorentwicklung und Tumorprogression involviert sind. Hierunter fallen die neoplastische Transformation von Zellen (BURGER), die Proliferation der Tumorzellen (ZEELLENBERG, MURAKAMI), die aberrante Bildung von Blutgefäßen (KOCH) sowie die klonale Expansion und das Wachstum (SCHANDENDORF). Zusätzlich sind Chemokine an der Wanderung von Tumorzellen durch

die extrazelluläre Matrix und in Blut- und Lymphgefäße beteiligt (BAR-ELI) sowie an der organspezifischen Metastasierung (MÜLLER).

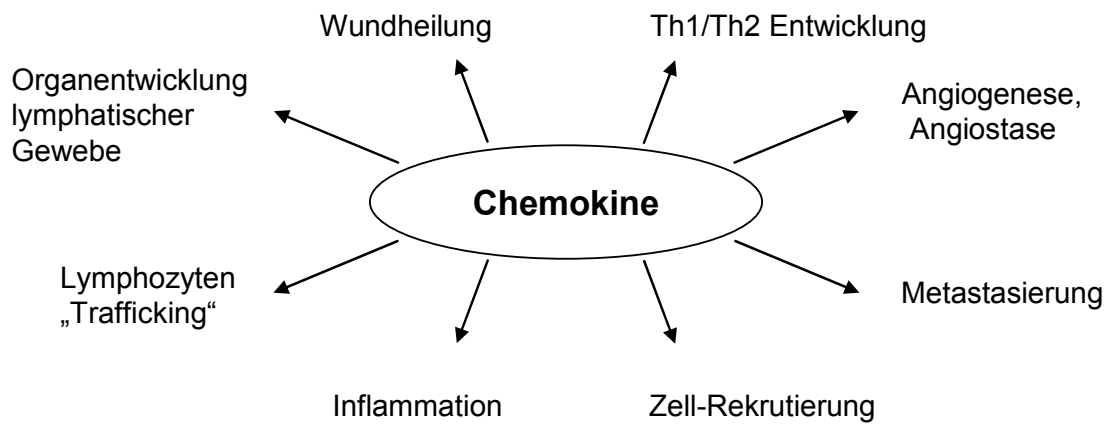


Abb. 1: Wirkungsbereiche von Chemokinen
(nach Rossi D, et al. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol 2000;18:217-242.)

Es wurde eine Unterteilung der Chemokine in vier Familien (CXC, CC, C und CX3C) vorgenommen (siehe Abb. 2), welche sich jeweils in Anzahl und Position der Zysteinreste (C) unterscheiden. Drei Chemokin-Familien haben vier Zysteinreste, während die vierte Familie nur zwei besitzt. Bei den CXC-Chemokinen trennt eine Aminosäure (X) -außer Zystein- die ersten beiden Zysteinreste voneinander; bei den CX3C-Chemokinen befinden sich drei Aminosäuren (X3) zwischen dem ersten und dem zweiten Zysteinrest. In der Gruppe der CC-Chemokine liegen die ersten beiden Zysteinreste nebeneinander, während bei den C-Chemokinen zwei Zysteinreste (der erste und der dritte) fehlen (ARYA). Die zwei Hauptfamilien sind die CXC- und die CC-Chemokine (ROBLEDO). Viele Chemokine teilen sich Rezeptoren und binden ihrerseits auch an verschiedene Rezeptoren.

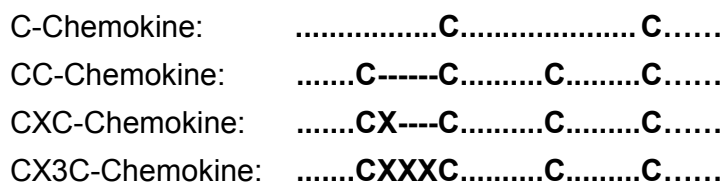


Abb. 2: Strukturelle Einteilung der Chemokine
C: Zystein; X: Aminosäure außer Zystein
(nach Arya M, et al. Chemokines: key players in cancer. Curr Med Res Opin 2003;19(6):557-564.)

1.2 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in einer Länge von 340-370 Aminosäuren mit sieben Transmembran-Domänen und einer komplexen Bindungsstelle für Chemokine (RABIN). Die große Gruppe der G-Protein-gekoppelten und damit durch Pertussis-Toxin hemmbaren Rezeptoren umfasst neben Chemokinrezeptoren noch andere Rezeptoren, hierunter solche für Hormone, Neurotransmitter, parakrine Substanzen und Entzündungsmediatoren (ARYA). Chemokinrezeptoren werden nach der Familie der Chemokine, an die sie binden, in vier Familien unterteilt (IUIS/WHO subcommittee on chemokine nomenclature). Die Nummerierung erfolgt in der chronologischen Reihenfolge ihrer Identifizierung. Zurzeit sind ca. 20 menschliche Chemokinrezeptoren beschrieben. Zudem gibt es eine Reihe von Rezeptoren mit Ähnlichkeit zu Chemokinrezeptoren, deren Liganden und Funktionen noch nicht bestimmt worden sind. Chemokinrezeptoren spielen eine Rolle bei der Migration von Lymphozyten und Tumorzellen. Durch Interaktion eines Chemokins mit seinem Rezeptor werden verschiedene Signalkaskaden ausgelöst. Hierzu gehören die Bildung von F-Aktin, die vorübergehende Mobilisation von Kalzium, die Senkung des Levels von zyklischem Adenosinmonophosphat sowie die Aktivierung der Proteinkinase C und der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (YOUN 2001). Je nach Rezeptor verändern diese Signale die Fähigkeit der Zelle, an Blutgefäßen zu adhären (CARDONES) oder die Eigenschaften der Zelle bezüglich ihrer Migrationsfähigkeit (ROBLEDO). Auch das Überleben der Zelle kann durch Chemokinrezeptoren positiv beeinflusst werden (MURAKAMI).

1.3 CCR9 und sein Ligand Teck

Der Chemokinrezeptor CCR9 wurde zunächst als GPR-9-6 bezeichnet (G-Protein-gebundener Rezeptor-9-6) (YOUN 1999). CCR9 wird auf der Mehrzahl der Thymozyten in allen Stadien der T-Zell-Entwicklung bis kurz vor dem Austritt in die Peripherie exprimiert (ZABEL). Unreife CD4-/CD8- (doppelt negative) sowie CD4+/CD8+ (doppelt positive) Zellen zeigen jeweils eine CCR9-Expression, welche im Reifungsprozess zu CD4+ oder CD8+ (einfach positiven) Zellen schrittweise herunterreguliert wird (UEHARA). CCR9 scheint hier für die normale Entwicklung der Thymozyten und für deren geordnete Lokalisation innerhalb des Thymus wichtig zu sein (UEHARA). Nur wenige Lymphozyten im peripheren Blut zeigen eine Expression dieses Rezep-

tors. Auf zirkulierenden Zellen wird CCR9 lediglich von CD4- und CD8-T-Zellen exprimiert, welche zum Darm wandern (Koexpression von Darm-Homing-Rezeptor $\alpha 4\beta 7$), wogegen auf T-Zellen, welche zur Haut wandern (CLA+), dieser nicht nachgewiesen wurde (ZABEL). Das Expressionsprofil von CCR9 auf T-Lymphozyten korreliert mit der Migration in Richtung des Liganden TECK (thymus expressed chemokine), welche durch Blockung von CCR9 inhibiert werden kann (ZABEL). Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn wurden erhöhte Frequenzen an CCR9-positiven T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen, welche hier proinflammatorisch wirken sollen (SARUTA). Alle Lamina-propria- und intraepithelialen Lymphozyten im Dünndarm exprimieren CCR9 (ZABEL), im Dickdarm dagegen sind nur wenige Lymphozyten CCR9-positiv (KUNKEL). CCR9 scheint sowohl für die T-Zell-Entwicklung als auch für die Schleimhaut-Immunantwort im Dünndarm eine Rolle zu spielen (ZABEL). CD8+ T-Zellen, welche in den mesenterischen Lymphknoten aktiviert wurden, wandern CCR9-vermittelt selektiv in die Mucosa des Dünndarmes (SVENSSON). Für plasmazytoide dendritische Zellen ist im Mausmodell bei CCR9-defizienten Tieren ein Mangel dieser Immunzellen im Dünndarm sowohl in der inflammatorischen Situation als auch ohne Entzündung beschrieben worden (WENDLAND). Auf B-Lymphozyten wird CCR9 auch teilweise exprimiert, jedoch zeigen diese Zellen keine Chemotaxis in Richtung von TECK (ZABEL). CCR9 wird nicht auf natürlichen Killer-Zellen, Monozyten, eosinophilen, neutrophilen und basophilen Granulozyten exprimiert (ZABEL). Die Untersuchung von Tumorzelllinien mittels RT-PCR zeigte bei zwölf Melanomzelllinien und sieben Mammakarzinomlinien keine Expression von CCR9 (MÜLLER). Für die T-Zell-Leukämiecelllinien MOLT-4 und MOLT-13 wurde eine Expression von CCR9 beschrieben (YOUN 2001, ZABEL).

Der derzeit einzige bekannte Ligand für den Rezeptor CCR9 ist das Chemokin TECK. Der systematische Name für TECK ist CCL25. TECK wurde erstmals aus dem fetalen Darm isoliert (VICARI). Es wird im Dünndarm von Epithelzellen, mit einem Maximum in den Lieberkühnschen Krypten, gebildet (KUNKEL, WURBEL). Ihm wird eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Immunzellen in das intestinale Epithel zugesprochen (KUNKEL), wobei z. B. der Eintritt von T-Zellen in die Lamina propria des Dünndarmes über Venolen durch CCL25 vermittelt wird (HOSOE). Im Thymus wird TECK/CCL25 von Epithelzellen (WURBEL) und von dendritischen Zellen (VICARI) sezerniert.

1.4 CXCR4 und sein Ligand SDF-1 α

CXCR4 wird auf der Zelloberfläche der Mehrheit der T-Lymphozyten, aller B-Zellen und Monozyten sowie schwach auf natürlichen Killerzellen exprimiert. Nicht nachweisbar ist der Rezeptor auf Neutrophilen (HORI). Die physiologischen Funktionen von CXCR4 betreffen ein breites Spektrum an Organen und Abläufen, hierunter die B-Zell-Lymphopoese, die Knochenmark-Myelopoese, die Ventrikelseptum-Bildung und die Vaskularisierung des Magen-Darmtraktes (TACHIBANA). CXCR4-knockout-Mäuse sterben deshalb intrauterin oder kurz nach der Geburt (TACHIBANA), genauso wie Mäuse ohne den dazugehörigen Liganden SDF-1 α (NAGASAWA 1996). Eine Steigerung der Expression von CXCR4 ist vor allem auf Th2-Zellen durch IL-4 möglich (JOURDAN). Beim oralen Plattenepithelkarzinom scheint es eine positive Korrelation von CXCR4-Expression und Metastasierung in Lymphknoten zu geben (ISHIKAWA). Ebenso spielt CXCR4 möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Metastasierung des Mammakarzinoms in Lunge, Leber, Lymphknoten und Knochenmark (MÜLLER). Normale Epithelzellen der Brust exprimieren kein CXCR4, maligne transformierte Zellen wiederum zeigen eine starke CXCR4-Expression (MÜLLER). Durch Blockade des CXCR4-Rezeptors auf Mammakarzinomzellen mit einem neutralisierenden Antikörper konnte im Tiermodell ein therapeutischer Effekt erzielt werden, der in einer Verringerung der Metastasierung in Lunge und Lymphknoten bestand (MÜLLER). Beim Endometriumkarzinom verringerte ein solcher Antikörper die Anzahl und Größe peritonealer, hepatischer und pulmonaler Metastasen bei Nacktmäusen (GELMINI). Durch das bizyklische Molekül AMD3100, welches reversibel die Bindung von CXCR4 an SDF-1 α inhibiert, sowie durch einen CXCR4-Antikörper (MAB171) konnte die Migration von Zellen des multiplen Myeloms verhindert werden (ALSAYED). In vitro wurde bei Zellen des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms durch CXCR4-spezifische Antikörper ebenfalls eine Blockade der CXCR4-abhängigen Migration, Invasion und Adhäsion nachgewiesen (SU). Das Wachstum primärer Hirntumoren - sowohl glialen als auch neuronalen Ursprungs - konnte im Mausmodell durch einen CXCR4-Antagonisten inhibiert werden (RUBIN). Die Apoptose der Tumorzellen wurde sowohl beim Glioblastom als auch beim Medulloblastom gesteigert, während die Proliferation nur beim Medulloblastom verringert wurde (RUBIN). Als Marker für eine schlechte Prognose wurde die Expression von CXCR4 auf den Zellen des Primärtumors beim Melanom, beim Pankreaskarzinom sowie beim Kolonkarzinom identifiziert (SCALA 2005, MARECHAL, KIM 2005). Beim malignen

Melanom hatten Patienten mit CXCR4-positiven Tumoren (43,6% der Patienten) ein deutlich erhöhtes Risiko, ein Rezidiv zu erleiden oder zu sterben als Patienten mit CXCR4-negativen Tumoren (SCALA 2005). Patienten mit einer hohen Expression von CXCR4 im Primärtumor hatten beim Pankreaskarzinom ein höheres Risiko für Lymphknotenmetastasen und Leberbefall sowie ein kürzeres Gesamtüberleben als Patienten mit einer niedrigen CXCR4-Expression (MARECHAL). Beim Kolonkarzinom hatten Patienten mit einer hohen CXCR4-Expression im Tumor in frühen Stadien ein deutlich erhöhtes Risiko sowohl für ein Lokalrezidiv als auch für Metastasen und bei fortgeschrittenen Tumoren eine reduzierte Überlebenszeit im Vergleich zu Patienten, deren Tumoren nur eine niedrige CXCR4-Expression zeigten (KIM 2005). Eine erhöhte Aggressivität bei verstärkter Expression von CXCR4 durch den Primärtumor wurde beim papillären Schilddrüsenkarzinom postuliert (GONZALEZ). Auch hier korrelierte die CXCR4-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium. Zusammen mit CCR5 ist CXCR4 ein Korezeptor bei der Bindung des HI-Virus-1 an die CD4-Zielzelle (MOORE 2004). Nach Bindung an das CD4-Glykoprotein benötigt das gp120-Hüllprotein des HIV noch einen weiteren Rezeptor, um in die T-Zelle zu gelangen. In frühen Krankheitsstadien ist das meist CCR5, der im weiteren Verlauf der Erkrankung teilweise von CXCR4 abgelöst wird. HIV-Entry-Inhibitoren auf der Basis von Korezeptor-Antagonisten befinden sich in klinischer Prüfung und sollen die HAART (Highly active anti-retroviral therapy) ergänzen (LUSSO).

SDF-1 α (stromal cell-derived factor) bzw. CXCL12 ist der einzige bisher beschriebene Ligand des Chemokinrezeptors CXCR4. Zusätzlich zu CXCR4 ist SDF-1 α auch einer der Liganden des Chemokinrezeptors CXCR7 (BURNS, MIAO). Ursprünglich wurde SDF-1 α als Wachstumsfaktor von Prä-B-Zellen bei der Maus identifiziert (NAGASAWA 1994). SDF-1 α wird von Stromazellen gebildet, hierunter auch Fibroblasten und Endothelzellen. Es wird in Knochenmark, Lunge, Leber und Lymphknoten hoch exprimiert und scheint ein konstitutives Chemokin (im Vergleich zu den inflammatorischen Chemokinen) zu sein und damit verantwortlich für die Wanderung von Zellen zu verschiedenen Bestimmungsorten (BLEUL). Beim multiplen Myelom konnte eine mehr als doppelt so hohe Konzentration von SDF-1 α im Knochenmark der Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden werden (ALSAYED). In vitro Daten beim Prostatakarzinom (TAICHMAN) und beim Neuroblastom (GEMINDER) deuten auf einen Einfluss von SDF-1 α bei der Metastasierung dieser Tumoren ins Knochenmark hin. Tumorzellen binden im Rahmen der Invasion von Geweben und

der Metastasierung an eine Reihe von extrazellulären Matrixproteinen wie z. B. Fibronectin. Es wurde gezeigt, dass VLA-4 und VLA-5 als Mediatoren bei der Adhäsion von Melanomzellen an Fibronectin wirken (MOULD, ROBLEDO). SDF-1 α erhöht die über die Integrine VLA-4 und VLA-5 vermittelte Bindungsfähigkeit der Melanomzelllinie MeWo an Fibronectin (ROBLEDO). Ein Mitwirken von Chemokinen, darunter auch SDF-1 α , bei der Integrin-vermittelten Zelladhäsion wurde auch für hämatopoetische Vorläuferzellen, Lymphozyten und Leukämiezellen beschrieben (ROBLEDO).

1.5 Funktionalität von Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren können in verschiedenen Funktionszuständen vorliegen. Wird ein Rezeptor auf der Oberfläche einer Zelle exprimiert, so bedeutet dies nicht zwingend, dass er auch funktionell ist und die Signalkaskade durch Interaktion mit dem Liganden in Gang gesetzt wird. In vielen Fällen sind Chemokinrezeptoren zwar auf der Oberfläche von Zellen nachweisbar, jedoch funktionell inaktiv. Dies wurde z. B. in der B-Zell-Lymphopoese für ausgereifte B-Zellen beschrieben (HONCZARENKO). Diese exprimieren den Rezeptor CXCR4 sogar in höheren Konzentrationen als ihre unreiferen Vorläuferzellen, jedoch ist dieser hier funktionell inaktiv, während er auf den Vorläuferzellen in aktivem Zustand vorliegt. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei der Zelllinie HepG2 aus einem hepatozellulären Karzinom gemacht. Eine Expression von CXCR4 wurde nachgewiesen, ebenso die Bindung des Liganden SDF-1 α , aber keine zelluläre Reaktion auf diesen Liganden (MITRA). Die Funktionalität eines Chemokinrezeptors kann auf verschiedene Arten geprüft werden. Ein funktioneller Rezeptor löst Chemotaxis der Zelle in Richtung auf den Liganden aus, was nachgewiesen werden kann, indem man die zu untersuchenden Zellen einem Chemokin-Gradienten aussetzt (RABIN). Eine weitere Nachweismöglichkeit für die Funktionalität eines Chemokinrezeptors ist der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Mobilisation intrazellulärer Speicher nach Interaktion des Liganden mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor (D'APUZZO). Zudem kann die Polymerisation von Aktinfilamenten gemessen werden, welche nach Stimulation mit dem Liganden in der Zelle stattfindet und einen einleitenden Schritt für Strukturveränderungen im Sinne von Wanderungsbewegungen der Zelle darstellt (BLEUL). Ein Vergleich der Rezeptordichte vor und nach Stimulation mit dem entsprechenden Liganden eignet sich ebenfalls zum Nachweis eines funktionell aktiven Rezeptors, da nach Interaktion mit

dem Liganden ein aktiver Rezeptor von der Zelloberfläche verschwindet (AMARA, KLEINHANS). Dieser Vorgang wird als Rezeptor-Internalisation bezeichnet.

1.6 Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei der T-Zell-Antwort gegen Tumoren

Eine Vielzahl klinischer und experimenteller Daten stützt das Konzept der immunologischen Überwachung von Tumoren. Erstmals von Paul EHRLICH um 1908 in einem Vortrag „Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung“ formuliert, wurde die Theorie von Frank Macfarlane BURNET in „The concept of immunological surveillance“ 1970 beschrieben. Die Hypothese einer möglichen Immunantwort gegen Tumoren wurde zusätzlich dadurch gestärkt, dass teilweise eine mit der Leukozyteninfiltration einhergehende Tumor-Regression beobachtet werden konnte (MANTOVANI). Ein Zusammenhang zwischen Leukozyteninfiltration des Tumors und einer günstigen Prognose ist z. B. für das Mammakarzinom beschrieben worden (HAMLIN, BÄSSLER). Inzwischen ist schon viel über die Rolle des Immunsystems beim Aufspüren und Zerstören von Tumorzellen bekannt. So haben immungeschwächte Individuen, z. B. Patienten mit HIV-Infektion oder unter immunsuppressiver Therapie ein erhöhtes Risiko, maligne Erkrankungen zu entwickeln (LEVINE, HERNANDEZ). Nach Absetzen bzw. Reduktion der immunsuppressiven Therapie bilden sich solche Tumoren zum Teil wieder zurück (STARZL, KEOGH). Zudem geht aus einigen Untersuchungen hervor, dass ein progressives Tumorwachstum mit einer Suppression der endogenen Immunantwort einhergehen kann (Zusammenstellungen bei ZEA, JEWETT). Zu den hierbei zu beobachtenden Fehlfunktionen gehören eine erniedrigte Anzahl (SEDELMAYR) oder auch eine funktionelle Paralyse zytotoxischer T-Zellen (CAMP, KOLENKO), eine eingeschränkte Aktivität der natürlichen Killer-Zellen (SARZOTTI, COCA) sowie eine verminderte Fähigkeit der Lymphokin-Produktion (FISCHER). Auch Botenstoffe, die durch die Tumorzellen selbst produziert werden, wie z. B. Interleukin-6, können die Interaktion der Immunzellen stören, indem die Reifung der dendritischen Zellen oder die T-Zell-Polarisation verhindert werden (PARK, RHODUS, DIEHL).

Spontanremissionen, wie sie beim Melanom (MACKENSEN) oder beim Nierenzellkarzinom (LUDWIG) beschrieben wurden, deuten auf eine Tumorbekämpfung von Seiten des Immunsystems hin, welches außer Krankheitserregern auch maligne entartete Zellen erkennen und gezielt vernichten kann. Eine besondere Rolle bei der

Immunantwort gegen Tumoren scheinen die CD3+/CD8+ zytotoxischen Effektor-T-Zellen zu spielen. Diese lassen sich teilweise in hoher Anzahl im peripheren Blut bei Tumorpatienten nachweisen (LETSCH). Sie besitzen ex vivo lytische Fähigkeiten gegenüber autologen und zum Teil auch HLA-identen allogenen Tumorzellen (VALMORI). Die Tumorzellyse konnte durch MHC-Klasse-1-Antikörper sowie durch Antikörper gegen T-Zell-Rezeptoren blockiert werden, was für eine über MHC-Klasse-1 vermittelte spezifische Erkennung von Tumorzellen spricht (HOM 1991). Neben ihrer zytotoxischen Funktion sind diese Lymphozyten in der Lage, nach Tumorerkennung eine Reihe von Zytokinen wie GM-CSF, Interferon- γ und Tumornekrosefaktor zu sezernieren, welche wiederum andere Abwehrzellen anlocken (HOM 1993). Im Mausmodell konnte durch intratumorale Injektion von dendritischen Zellen, auf welche durch einen adenoviralen Vektor das Chemokin CCL21 transduziert wurde, eine Tumoreradikation in 60% der Fälle erreicht werden (YANG). Hier wurden erhöhte Frequenzen von CD4- und CD8-positiven T-Zellen nachgewiesen (YANG). Werden Lymphozyten durch ein Antigen aktiviert, werden auf ihrer Zelloberfläche eine Reihe von Chemokinrezeptoren hochreguliert (WARD), wodurch die Sensitivität gegenüber Chemokinen erhöht wird. Durch die jeweils in den verschiedenen Geweben vorhandenen Chemokine wird im Zusammenspiel mit Adhäsionsmolekülen das Wanderungsverhalten der Lymphozyten gesteuert (KIM 1999). Manche Chemokine fördern die intravaskuläre Adhäsion, andere wiederum leiten Leukozyten aus den Blutgefäßen heraus und in die Gewebe. Da Lymphozyten nur dann mit anderen Zellen korrekt interagieren können, wenn sie sich am richtigen Ort befinden, kommt dem Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren und der Art und Verteilung der Chemokine in den Geweben eine wichtige Rolle bei der Immunantwort zu (VON ANDRIAN).

1.7 Chemokinrezeptoren und das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen

Metastasierung ist der Hauptgrund für Mortalität und Morbidität maligner Tumorerkrankungen. Seit den Arbeiten von Stephen PAGET vor mehr als hundert Jahren weiß man, dass verschiedene Tumoren über ein für sie charakteristisches Verhalten bezüglich ihrer Metastasierung verfügen. Das Mammakarzinom metastasiert bevorzugt in regionale Lymphknoten, Lunge, Leber und Knochenmark. Das maligne Melanon besitzt ein ähnliches Metastasierungsmuster und hat zusätzlich eine hohe Inzidenz von Hautmetastasen. Zellen des Prostatakarzinoms hingegen bilden vor allem Metastasen im Knochenmark (MOORE 2001). Um diese Spezifität zu erklären, wurden verschiedene Theorien aufgestellt, von denen eine, auch „soil and seed“ genannt, davon ausgeht, dass verschiedene Organe mehr oder weniger optimale Bedingungen für das Wachstum bestimmter Tumorzellen bieten. Die Vertreter der „Homing-Theorie“ hingegen machen spezielle chemotaktische Eigenschaften der Gewebe, Tumorzellen anzulocken und festzuhalten, für das Metastasierungsverhalten verantwortlich. Beide Theorien haben ihre Berechtigung, wobei die genauen Abläufe auf molekularer Ebene erst nach und nach aufgeklärt werden müssen. Zusätzlich prädisponieren die jeweiligen Blut- und Lymphabflusswege des Primärtumors teilweise auch für bestimmte Metastasenlokalisationen. Für die Homing-Theorie sprechen die Ergebnisse von MÜLLER et al., die 2001 von der Rolle des Chemokinrezeptors CXCR4 und seines Liganden SDF-1 α bei der Metastasierung von Brustkrebs im Mausmodell berichteten. Es wurde gezeigt, dass, im Gegensatz zu unverändertem Brustgewebe, maligne Tumoren der Brust sowie deren Metastasen den Chemokinrezeptor CXCR4 hoch exprimieren, wobei die Gewebe, in welche das Mammakarzinom am häufigsten metastasiert, auch diejenigen sind mit der höchsten Konzentration des CXCR4-Liganden SDF-1 α (MÜLLER). Im Mausmodell konnte durch die Blockade von CXCR4 eine Reduktion bzw. Inhibierung der Metastasierung von Brustkrebszellen in Leber, Lunge und Lymphknoten erreicht werden (MÜLLER). Auch T140, ein ursprünglich für die HIV-Therapie entwickelter CXCR4-Antagonist, führte im Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion von Lungenmetastasen durch Mammakarzinomzellen (TAMAMURA). Beim Rhabdomyosarkom wurde durch Antikörper die CXCR4-SDF-1 α -Interaktion gestört und dadurch die Migration von Sarkomzellen in Richtung Knochenmark-Stromazellen reduziert (STRAHM). Für CCR7 wurde berichtet, dass Tumorzellen, die durch Transfektion diesen Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren, verstärkt in Lymphknoten metastasieren. In Lymphknoten wiederum ist

in hoher Konzentration das Chemokin CCL21 zu finden, welches der entsprechende Ligand für den Rezeptor CCR7 ist (WILEY). Für die „soil-and-seed-Theorie“ spricht, dass bei einer Zelllinie des Kolonkarzinoms gezeigt werden konnte, dass CXCR4 für das Wachstum von Mikrometastasen eine Bedeutung hat. Zellen, die durch Transfektion den Chemokinrezeptor nicht auf der Oberfläche exprimierten, proliferierten nicht in der Lunge (ZEELLENBERG). MURAKAMI et al. konnten nachweisen, dass der Chemokinrezeptor CXCR4 auf Maus-Melanomzellen transfiziert, deren Metastasierungsrate drastisch erhöht und dass das dazugehörige Chemokin „in vitro“ bei Mangelernährung der Zellen die Proliferation steigert.

1.8 Bedeutung von Chemokinrezeptoren für die Metastasierung beim malignen Melanom

Abhängig vom Tumorstadium entwickeln insgesamt ungefähr zehn Prozent der Melanompatienten symptomatische Metastasen (CARDONES), teilweise nach jahrelanger Latenz. Die Metastasierung erfolgt kutan im Sinne von Satelliten- oder In-Transit-Metastasen, lymphogen in die regionären Lymphknoten und hämatogen in Lunge, Leber, Gehirn, Knochenmark und Gastrointestinaltrakt. Mikrometastasen kommen im Knochenmark bei ca. 23% der Melanompatienten vor und sind ein Indikator für eine schlechte Prognose (FODSTAD). Im Gastrointestinaltrakt werden Metastasen des Melanoms am häufigsten im Dünndarm gefunden, gefolgt vom Kolon und Anorektum (BLECKER, DASGUPTA). Allgemein sind Dünndarmtumoren eher selten, sie machen nur 2-5% der Tumoren im Magen-Darm-Trakt aus und sind meistens Melanommetastasen (BENDER, GILL). Ungefähr 5% der Melanompatienten entwickeln klinisch relevante Dünndarmmetastasen, aber es gibt auch Hinweise auf einen mit 60% viel höheren Prozentsatz von Dünndarmmetastasen in postmortalen Untersuchungen (BLECKER). Das Melanom zeichnet sich durch sehr geringe Überlebensraten der Patienten aus, sobald eine Invasion in tiefe Hautschichten und eine Fernmetastasierung stattgefunden haben. Bei Vorliegen von regionalen Lymphknotenmetastasen ist in Abhängigkeit von begleitender Ulzeration und Anzahl der betroffenen Lymphknoten mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 13-69% zu rechnen, bei disseminierter Erkrankung leben nach einem Jahr nur noch ca. 50-60% der Patienten (BALCH). Hierfür sind verschiedene Mechanismen verantwortlich, die es den Melanomzellen ermöglichen, die wirtseigene Abwehr zu umgehen und sowohl lokal invasiv als auch metastasierend zu wachsen. Es wurden, wie bei anderen Tumoren

auch, Matrix-Metalloproteinasen beschrieben (HOFMAN), welche Anteil an der Invasions- und Disseminationsfähigkeit des malignen Melanoms haben. Herunterregulierung der Expression von HLA-(Haupthistokompatibilitätskomplex) Molekülen der Klasse eins (FISHMAN), Modulation der Entzündungsantwort über Zytokine (MANTOVANI) und bestimmte Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren (MÜLLER) scheinen dazu beizutragen, dass sich das Melanom körpereigenen Tumorabwehrmechanismen entzieht, obwohl es stark immunogen ist, was anhand hoher Frequenzen melanomreaktiver T-Zellen bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung gezeigt werden konnte (LETSCH). MÜLLER et al. fanden 2001 bei Melanomzellen im Vergleich zu normalen Melanozyten hohe Level der Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR7 und CCR10. Die korrespondierenden Liganden für diese Rezeptoren CXCL12/SDF-1 α , CCL21 und CCL27 zeigen eine sehr hohe Expression in Lymphknoten, Lunge, Leber, Knochenmark und Haut, was im Einklang mit bevorzugten Orten für Metastasierung steht. Die Beeinflussung von Chemokinrezeptoren und Chemokinen stellt daher beim Melanom und möglicherweise bei anderen Tumoren ein vielversprechendes neues Behandlungskonzept dar, zumal bisherige Therapieansätze mit Chemotherapie (SUN), Bestrahlung, Interferon oder Interleukinen (ATKINS) beim Melanom nur geringe Erfolgsraten aufweisen.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Eine Vielzahl klinischer und experimenteller Daten stützt die Hypothese, dass Metastasierung nicht zufällig auftritt, sondern einen hochgradig organisierten, organspezifischen Prozess darstellt. Aktuelle Ergebnisse legen nahe, dass Chemokine und deren Rezeptoren wesentlich an der organspezifischen Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Expression und Funktionalität der Chemokinrezeptoren CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien untersucht werden. CCR9 wurde zuvor noch nicht auf Melanomzelllinien nachgewiesen. Als nächstes sollte eruiert werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression dieses Rezeptors und der Metastasierung in den Dünndarm gibt. Des Weiteren sollte das chemokinbedingte Migrationspotential von zytotoxischen T-Zellen beim Melanom untersucht werden, da eine effektive Immunantwort gegen Tumoren voraussetzt, dass tumorspezifische T-Zellen in die gleichen Kompartimente migrieren wie Tumorzellen. Insbesondere sollte die Fähigkeit der T-Zellen, in den Dünndarm bzw. ins Knochenmark einzuwandern, anhand der Expression von CCR9 und CXCR4 getestet werden.

1.10 Experimentelle Vorgehensweise

Zusätzlich zu den bereits im Labor vorhandenen Melanomzelllinien wurden aus Melanommetastasen unterschiedlicher Lokalisation weitere Zelllinien generiert. Die Expression der Chemokinrezeptoren wurde auf Tumorzellen und Lymphozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Für die funktionellen Analysen von CCR9 und CXCR4 wurden Nachweisverfahren etabliert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tumorzelllinien

Gewebe aus Melanommetastasen wurde uns von Melanompatienten, die in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie der Medizinischen Fakultät Charité, Campus Benjamin Franklin behandelt wurden, nach deren Aufklärung und Einwilligung zur Verfügung gestellt. Weitere Zelllinien wurden uns aus Partnerlaboren vom Campus Virchow-Klinikum sowie aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg zur Verfügung gestellt. Hier hatten die Patienten ebenfalls der Verwendung des Gewebes für Studienzwecke zugestimmt. Die Lokalisation der Metastasen war Haut (n=9), Lymphknoten (n=6), Weichteilgewebe (n=1), ZNS (n=1) und Dünndarm (n=3) (siehe Tab. 1). Nach der chirurgischen Resektion wurde das Gewebe frisch aufbereitet und daraus wurden autologe Tumorzelllinien gezogen.

Die Tumorzelllinie MOLT-4 wurde von der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) bezogen.

Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut

Von sechs Melanompatienten, aus deren Gewebe Tumorzelllinien gezüchtet werden konnten, wurden aus heparinisiertem Vollblut (Abnahmezeitpunkt nahe Datum der Metastasenresektion) PBMCs kryokonserviert. Als Kontrollgruppe dienten sechs gesunde Spender.

Tab. 1: Herkunft der Tumorzelllinien

Patient	Zelllinie	Metastasen-lokalisierung	Herkunft der Zelllinie	Zusätzl. Material
1	UKBF-Mel 12	Dünndarm	CBF	+Blut
2	MA-Mel 16	Dünndarm	DKFZ	
3	UKRV-Mel 18B	Dünndarm	CVK	
	UKRV-Mel 18A	Lymphknoten	CVK	
4	UKBF-Mel 19	Haut	CBF	
5	UKRV-Mel 17	Lymphknoten	CVK	
6	SB-Mel	Lymphknoten	CBF	
7	MKR	Lymphknoten	CBF	
	ZKR	ZNS	CBF	
8	UKBF-Mel 13A	Haut	CBF	+Blut
	UKBF-Mel 13C	Haut	CBF	
9	UKBF-Mel 11	Weichteilgewebe	CBF	+Blut
10	UKBF-Mel 14A	Haut	CBF	+Blut
	UKBF-Mel 14B	Haut	CBF	
11	UKBF-Mel 16	Lymphknoten	CBF	+Blut
12	UKBF-Mel 17	Haut	CBF	
13	UKBF-Mel 18	Haut	CBF	+Blut
14	UKBF-Mel 20	Haut	CBF	
15	UKRV-Mel 15A	Lymphknoten	CVK	
16	UKRV-Mel 38	Haut	CVK	
17	Frische Zellen	Dünndarm	CBF	
Kontrolllinie	MOLT-4	T-Zell-Leukämie	ATCC	

Kulturmedien

Die Tumorzellen wurden in RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Biochrom AG), 1 mM L-Glutamin, 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (alles Biochrom AG) kultiviert.

Als Kulturmedium für die Lymphozyten diente Iscove's modified DMEM (Biochrom AG) mit 10% AB-Serum (PAA, Linz, Österreich), 1 mM L-Glutamin, 100 U/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin (alles Biochrom AG). Diese Medien werden im Folgenden als Standardmedien bezeichnet.

Phosphatpuffer

Als Phosphatpuffer diente PBS (phosphate-buffered saline) -Dulbecco (Biochrom AG, Berlin) ohne Zusatz von Magnesium und Kalzium.

Enzym-Mix

Der Enzym-Mix, der bei der Aufarbeitung des Tumorgewebes benutzt wurde, enthielt RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin (alles Biochrom AG), 250 U/ml Collagenase (Type VII-S, Sigma, Deisenhofen), 10 U/ml Hyaluronidase (Type IV-S, Sigma) und 0,4 mg/ml DNase (Type I, Sigma).

Dichtegradient

Zur Isolierung von Lymphozyten aus heparinisiertem Vollblut wurde Biocoll Separating Solution (Biochrom AG) mit der Dichte 1,0077 kg/l verwendet.

Einfriermedien

Die mononukleären Zellen wurden in Iscoves's modified DMEM (Biochrom AG) mit 40% humanem AB-Serum (PAA, Linz) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt) eingefroren.

Weitere Reagenzien

EDTA	Sigma, Deisenhofen
Immunglobulin G	(Flebogamma 5%) Grifols, Langen
Brefeldin A	Sigma, Deisenhofen
FACS Lyse	BD Bioscience, Heidelberg
FACS Perm	BD Bioscience, Heidelberg
PMA	Sigma, Deisenhofen

FACS-Antikörper (jeweils monoklonale Maus-anti-Mensch-AK und korrespondierende Isotypenkontrollen mit gleicher Markierung)

CCR7 PE	R&D Systems, Wiesbaden
Isotypenkontrolle IgG2A	R&D Systems, Wiesbaden
CCR9 PE	R&D Systems, Wiesbaden
Isotypenkontrolle IgG2A	R&D Systems, Wiesbaden
CXCR4 PE	BD Bioscience, Heidelberg
Isotypenkontrolle IgG2A	BD Bioscience, Heidelberg
S100 FITC	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Isotypenkontrolle IgG2B	Abcam, Cambridge, Großbritannien
IFN- γ FITC	BD Bioscience, Heidelberg
Isotypenkontrolle IgG2B	BD Bioscience, Heidelberg
IFN- γ PE	BD Bioscience, Heidelberg
Isotypenkontrolle IgG1	BD Bioscience, Heidelberg
CD3 PerCP	BD Bioscience, Heidelberg
Isotypenkontrolle IgG1	BD Bioscience, Heidelberg
CD4 APC	BD Bioscience, Heidelberg
Isotypenkontrolle IgG1	BD Bioscience, Heidelberg
CD8 APC	BD Bioscience, Heidelberg
Isotypenkontrolle IgG1	BD Bioscience, Heidelberg
CD8 FITC	Beckman Coulter, Krefeld
Isotypenkontrolle IgG1	Beckman Coulter, Krefeld

FACS-Lösungen

FACS-Flow	(Trägerflüssigkeit) Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	(Reinigungslösung) Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Safe	(Desinfektionslösung) Becton Dickinson, Heidelberg

Chemokine (rekombinante menschliche Chemokine)

CCL21	R&D Systems, Wiesbaden
TECK/CCL25	R&D Systems, Wiesbaden
SDF-1 α /CXCL12	R&D Systems, Wiesbaden

Kalzium-Indikator

Fluo-3 AM (Azetomethylester) von Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Aktinpolymerisation

BSA	Sigma, Deisenhofen
FITC Phalloidin	Sigma, Deisenhofen
1-Lysophosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen

Sekretions-Assay

Es wurde ein IFN- γ -Sekretions-Kit von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach verwendet, welcher ein IFN- γ Auffangreagenz (IFN- γ Catch: Anti-IFN- γ -Anti-CD45RA-Antikörperkonjugat) sowie einen PE-markierten IFN- γ -Detektionsantikörper enthält.

Formalin

Formalin 37% von Sigma, Deisenhofen wurde jeweils mit PBS verdünnt, so dass eine 1-prozentige Lösung entstand.

Durchflusszytometer und Auswertungs-Software

Es wurde das Gerät FACSCalibur, welches mit einem Argon-Laser ausgestattet ist, verwendet. Die Daten wurden mit der Software CellQuest ausgewertet. Gerät und Software stammen von der Firma Becton Dickinson, Heidelberg.

Ethikkommission

Für die vorliegenden Analysen lag ein positives Votum der Ethikkommission der Charité Campus Benjamin Franklin, damals Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, vor.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von mononukleären Zellen aus Vollblut

Heparinisiertes Vollblut wurde mit sterilem PBS 1:2 verdünnt, in 50 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) zu je 35 ml über 15 ml Ficoll Hypaque geschichtet und 20 min bei Raumtemperatur mit 2000 U/min (800 g) ohne Bremse zentrifugiert (Beckman Zentrifuge GS-6R von Beckman Coulter, Krefeld). Granulozyten und Erythrozyten sedimentieren aufgrund ihrer höheren Dichte auf dem Boden der Röhrchen, während Lymphozyten und Monozyten (mononukleäre Zellen) eine Interphase auf dem Ficoll und unter der Plasma-Phase bilden. Diese Interphase wurde vorsichtig abpipettiert, und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Portionen von je $1-2 \times 10^7$ Zellen wurden in Iscove's DMEM Medium mit 40% humanem AB-Serum und 10% DMSO in vorgekühlten speziellen Einfrierboxen (Nunc, Wiesbaden) in 1,8 ml-Röhrchen (Cryo Tube Vials von Nunc, Wiesbaden) auf -80°C heruntergekühlt und einige Tage später in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingelagert.

2.2.2 Auftauen von PBMCs

Nach der Entnahme der Zellen aus dem flüssigen Stickstoff wurde der Inhalt der Einfrieröhrchen sofort in 25 ml warmes Iscove's DMEM mit 4% AB-Serum in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dabei wurde mehrmals je 500 μl warmes Medium zu den gefrorenen Zellen gegeben, wodurch ein schnelles Auftauen und damit eine kurze Verweildauer der Zellen im toxischen Einfriermedium (10% DMSO) gewährleistet wurden. Nach Zentrifugation über 10 min wurde der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in Standardmedium aufgenommen, in 14 ml-Rundbodenröhrchen (BD Falcon Polypropylene Test Tube (snap cap) von BD Biosciences, Heidelberg) überführt und bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank aufbewahrt.

2.2.3 Separation von Tumorzellen aus Tumor/Metastasengewebe

Das Tumorgewebe wurde je innerhalb einer Stunde nach Exzision weiterverarbeitet. Die ca. 1 cm^3 großen Gewebestücke wurden zunächst mit Skalpell und Präparierschere unter sterilen Bedingungen mechanisch zerkleinert, in Enzym-Mix (inkl. Collagenase, Hyaluronidase, DNase) aufgenommen und für 45 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Gewebesuspension in 30 ml

RPMI-Standardmedium aufgenommen und zweimal durch einen sterilen Mullfilter gegeben. Das Filtrat wurde dann 10 min bei 1000 U/min (200 g) zentrifugiert, erneut in 30 ml RPMI-Standardmedium aufgenommen und durch einen 100 µm Nylonfilter (Falcon BD Cell-Strainer, von BD Biosciences, Heidelberg) gepresst. Nach der Filtration erfolgten zwei Waschschrte mit RPMI-Standardmedium, woraufhin die nun einzeln oder in kleineren Zellverbänden vorliegenden Tumorzellen in Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) überführt wurden.

2.2.4 Zellkultur

Die Tumorzelllinien wuchsen adhärent. Als Kulturmedium diente RPMI-Standardmedium, worin die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Typ BB16 von Heraeus, Hanau) aufbewahrt wurden. Für die Analysen wurden die Zellen mit einem Zellschaber (Falcon BD Cell Scraper von BD Biosciences, Heidelberg) vom Boden der Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) gelöst.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Eine kleine Menge der Zellsuspension wurde zu gleichen Teilen mit Trypan-Blau (Sigma, Deisenhofen), welches zuvor 1:2 mit PBS verdünnt wurde, angefärbt. In einer Neubauer-Kammer (Sigma) wurden je vier Großquadrate unter dem Mikroskop (BX 300 von Will, Wetzlar) ausgezählt und die Gesamtzellzahl in der Ausgangslösung nach folgender Formel berechnet:

Gesamtzellzahl = 0,25 x gezählte Zellen x Verd. x 10⁴ x Vol.

Verd.: Verdünnungsfaktor, hier 2, da 1:2 mit Trypan-Blau Lösung verdünnt wurde

Vol.: Volumen der Ausgangslösung in ml

Ein Großquadrat enthielt 0,1 µl Zell-Trypan-Blau-Gemisch, deshalb Multiplikation mit 10⁴ für Angaben in ml.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, kurz FACS (flow-assisted cell scans) dient der Analyse von Oberflächenstrukturen auf Zellen und intrazellulär gelegener Bestandteile. Intra- und extrazelluläre Strukturen können mit einem speziellen Färbeprotokoll auch gleichzeitig gemessen werden. Dies hat den Vorteil, dass man reaktive Zellen anhand ihrer Interferon- γ -Sekretion auswählen kann und gleichzeitig mit Antikörpern gegen zell-spezifische Strukturen wie CD3 und CD8 phänotypisieren kann (ASEMISSEN). Hierbei werden Fluoreszenz-markierte monoklonale Antikörper (bei menschlichen Zellen meist Maus-anti-Mensch) verwendet oder es wird ein primärer unmarkierter Antikörper (Maus-anti-Mensch) mit einem sekundären markierten Antikörper (z. B. Ziege-anti-Maus) gekoppelt (indirekte Färbung). In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde die direkte Färbung verwendet. Isotypenspezifische Antikörper (jeweils PE-, APC-, PerCP- oder FITC-markiert) dienten zur Anfärbung der Negativkontrolle. Die Dichte der angefärbten Struktur korreliert mit der im Durchflusszytometer gemessenen Fluoreszenzintensität. In der Auswertung sind verschiedene Darstellungen der Ergebnisse möglich. Verwendet wurde die Darstellung der Fluoreszenz von Einzelzellen im sogenannten „dot plot“, wobei um eine bessere Übersichtlichkeit zu erzielen nicht immer alle gemessenen Zellen, sondern teilweise nur 30% oder 50% dargestellt wurden. Der dot-plot eignet sich besonders, wenn zwei Fluoreszenzen gleichzeitig abgebildet werden sollen. Eine weitere anschauliche Darstellungsform ist der so genannte „histogram plot“, in dem man auch zwei verschiedene Messungen übereinander legen kann. Hierdurch lassen sich zum Beispiel Fluoreszenzintensität von angefärbter Struktur und Isotypenkontrolle vergleichen. Im Histogramm kann jeweils nur eine Fluoreszenz gezeigt werden. Die Färbungen erfolgten nach folgenden Standardprotokollen:

2.2.7 Färbung von CCR9 und CXCR4 auf unstimulierten CD3+/CD8+ T-Lymphozyten

Die PBMCs wurden aufgetaut und über Nacht im Brutschrank in Iscove`s Medium mit Zusätzen aufbewahrt. Die Zellen wurden mit kaltem PBS mit 2% humanem Immunglobulin G bei 4°C und 2000 U/min (800 g) zentrifugiert, in 1 mM EDTA aufgenommen und in 5 ml-Rundbodenröhrchen (Falcon BD Polystyrene Test Tube, von BD Biosciences, Heidelberg) überführt. Pro Röhrchen wurden ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen

verwendet. Nach 10 min Inkubation wurden die Zellen mit kaltem PBS unter Zusatz von IgG gewaschen. Das humane Immunglobulin G dient zur Absättigung freier Fc-Rezeptoren und minimiert so die unspezifische Antikörper-Bindung. Die extrazellulär bindenden monoklonalen Antikörper (CD3 PerCP, CD8 APC von BD Bioscience, Heidelberg und PE-markierte Antikörper gegen die Chemokinrezeptoren CCR9 und CXCR4 bzw. die jeweilige Isotypenkontrolle, alle von R&D Systems, Wiesbaden) wurden in Mengen von 5 bis 15 µl in gelieferten Konzentrationen hinzugegeben und bei 4°C im Dunkeln für 15 min auf den Zellen belassen. Danach wurden die Zellen gewaschen und mit PBS + 1% Formaldehyd fixiert. Die Analyse erfolgte mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer mit Argon Laser unter Verwendung der CellQuest Software (beides von BD Biosciences, San José, USA). Es wurden ca. 1000 Zellen/s bei Raumtemperatur analysiert, wobei tote Zellen durch Setzen eines Schwellenwertes innerhalb des Vorwärts-Streulichtes (Scatter) eliminiert wurden. Es wurde ein Lymphozyten-Fenster gesetzt, und nähere Phänotypisierungen wurden anhand der gefärbten Oberflächenstrukturen vorgenommen. Abweichend von den Tumorzelllinien, bei denen vorhandene oder fehlende Rezeptor-Expression interessierte, wurden hier Prozentzahlen der Chemokinrezeptor-exprimierenden T-Lymphozyten dargestellt.

2.2.8 Färbung von CCR9 und CXCR4 auf melanomreaktiven T-Lymphozyten

Die PBMCs wurden aufgetaut und über Nacht im Brutschrank in Iscove`s Standardmedium aufbewahrt. Am Folgetag wurden die Zellen mit autologen Tumorzellen im Verhältnis PBMCs zu Tumorzellen 10:1, 10 µg/ml Influenzapeptid oder PMA stimuliert. Nach zwei Stunden wurde 10 µg Brefeldin A hinzugegeben. Der Transportinhibitor Brefeldin A dient zum Nachweis der zellspezifischen Zytokinproduktion. Hierdurch wird eine intrazelluläre Akkumulation der induzierten Zytokine erreicht (DINTER). Eine erneute Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ über 16 Stunden folgte. Die Zellen wurden mit kaltem PBS mit 2% humanem Immunglobulin G bei 4°C und 2000 U/min (800 g) zentrifugiert, in 1 mM EDTA aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Pro Röhrchen wurden ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen verwendet. Nach 10 min Inkubation wurden die Zellen mit kaltem PBS unter Zusatz von IgG gewaschen. Die extrazellulär bindenden monoklonalen Antikörper (CD3 PerCP, CD8 APC, PE-markierte Antikörper gegen die Chemokinrezeptoren CCR9 und CXCR4 bzw. die Isotypenkontrollen) wurden in Mengen von 5 bis 15 µl in gelieferten Konzentrationen hinzugegeben und bei

4°C im Dunkeln für 15 min auf den Zellen belassen, woraufhin ein Waschschrift mit FACS Lysing Solution folgte. Die Zellen wurden mit FACS Perm permeabilisiert und einmal gewaschen. IFN- γ FITC, ein intrazellulär bindender Antikörper, welcher die reaktiven IFN- γ produzierenden Zellen markiert, wurde zu je 20 μ l pipettiert und die Zellen inkubierten für 30 min unter Lichtabschluss bei 4°C. Danach wurden sie erneut gewaschen und mit PBS + 1% Formalin (Sigma) fixiert. Die Messung erfolgte wie oben beschrieben.

2.2.9 Funktionelle Analyse von CXCR4 auf unstimulierten T-Zellen

Die Bindung eines Chemokins an seinen Rezeptor führt bei fast allen Chemokinrezeptoren zu einer Aktivierung von Phospholipase C, welche über Inositoltriphosphat und Diacylglycerol eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt. Dies geschieht durch eine Mobilisierung aus intrazellulären Speichern und Aktivierung der Proteinkinase C (OLSON).

Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM ist 100-300 mal heller in der Gegenwart von Kalzium als in seiner Kalzium-freien Form. Dies ermöglicht eine sensible Kalziummessung (BURCHIEL).

PBMCs, welche am Vortag aufgetaut wurden und über Nacht im Brutschrank in 14 ml-Röhrchen in Iscove's Standardmedium inkubierten, wurden zweimal mit RPMI (37°C) ohne Zusätze gewaschen. 10 μ l des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3 AM wurden hinzugefügt. Nach 45 min Inkubation bei 37°C unter Lichtabschluss wurden die Zellen erneut mit lauwarmen RPMI gewaschen. Ein zweiter Färbeschritt erfolgte mit markierten Antikörpern gegen die Oberflächenstrukturen CXCR4 und CD8 (je 5 μ l). Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 15 min im Dunkeln. Danach wurden die Zellen in RPMI bei Raumtemperatur gewaschen, in 150 μ l Medium aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur bis zur Messung aufbewahrt. Die Messung erfolgte je am gleichen Tag mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer und der CellQuest Software.

Nach Etablierung einer Grundlinie für die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 angefärbten Zellen wurde nach 400 s 1 μ g SDF-1 α hinzugegeben. Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration wurde durch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Fluo-3 AM ersichtlich.

2.2.10 Funktionelle Analyse von CXCR4 auf melanomreaktiven T-Zellen

Zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen wurde ein IFN- γ -Sekretions-Kit verwendet, welcher ein IFN- γ -Auffangreagenz und einen PE-markierten Detektionsantikörper enthält. Nach dem Auftauen wurden die PBMCs über Nacht in Iscove's Standardmedium inkubiert und nach Zentrifugation ca. 2×10^6 Zellen mit 2×10^5 autologen Tumorzellen bzw. als Kontrolle ohne Tumorzellen für sechs Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Standardmedium inkubiert. Es folgte ein Waschvorgang mit RPMI ohne Zusätze bei 1000 U/min (200 g) und 4°C für 10 min. Pro 10^6 Zellen wurde 10 μ l IFN- γ Auffangreagenz (IFN-Catch: Anti-IFN- γ -Anti-CD45RA-Antikörperkonjugat) hinzugefügt, worin die Zellen für 5 min auf Eis schüttelnd inkubierten. Dann wurde 1 ml warmes RPMI Standardmedium pro 10^6 Zellen hinzugegeben und die Zellen hierin bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert, um das sezernierte IFN- γ aufzufangen. Nach 45 min wurden die Zellen zentrifugiert, das Pellett wurde in PBS mit Zusätzen (2mM EDTA und 2% Flebogamma) aufgenommen und erneut bei 1000 U/min (200 g) für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden nacheinander extrazelluläres CD8 und an der Zelloberfläche gebundenes IFN- γ angefärbt. Hierzu wurde 20 μ l CD8-FITC zugegeben und nach 15 min auf Eis 20 μ l IFN- γ -Detektionsantikörper (PE-markiert) pro 10^6 Zellen zugefügt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde mit kaltem PBS zweimal gewaschen, woraufhin die Zellen mit 1 μ g des Kalzium-Indikators Fluo-3 AM (Acetomethylester) beladen wurden und 45 min lang unter Lichtabschluss inkubierten. Die Zellen wurden gewaschen und in RPMI ohne Zusätze bis zur Messung aufbewahrt. Diese erfolgte innerhalb einer Stunde mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer. Nach Etablierung einer Basislinie der Fluoreszenzintensität FLUO-3-AM-markierter Zellen wurde die Änderung der intrazellulären Kalziumfreisetzung nach Zugabe von 1 μ g SDF-1 α (rekombinantes menschliches SDF-1 α) nach ca. 200 s und 2 μ g/ml Ionomycin als Positivkontrolle nach 500-600 s als Anstieg der Fluoreszenzintensität gemessen. Durch „Gaten“ der CD8-positiven IFN- γ -sezernierenden Zellen wurde nur der Anstieg des intrazellulären Kalziums im Sinne einer Veränderung der Fluoreszenzintensität der melanomreaktiven Lymphozyten bestimmt.

2.2.11 CCR9- und CXCR4-Nachweis auf Melanomzelllinien

Nach dem Lösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche wurden die Melanomzellen bei 2000 U/min (800 g) zentrifugiert und anschließend für 10 min bei 4°C mit PBS + 2% Immunglobulin G inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Färbung von $1-5 \times 10^5$ Zellen pro Ansatz mit dem PE-markierten monoklonalen Antikörper gegen den jeweiligen Chemokinrezeptor oder der PE-markierten Isotypenkontrolle in vorher austitrierten Konzentrationen für 15 min bei 4°C unter Lichtabschluss. Danach wurden die Melanomzellen erneut mit PBS gewaschen und abschließend mit PBS + 1% Formaldehyd fixiert. Die Analyse erfolgte am gleichen oder am darauf folgenden Tag mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer unter Verwendung der CellQuest Software. Es wurden nur Zelllinien als Rezeptor-positiv gewertet, bei denen mindestens eine Verdoppelung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Isotypenkontrolle zu verzeichnen war.

2.2.12 CCR9- Nachweis „in vivo“ auf Melanomzellen

Eine frisch resezierte Dünndarmmetastase des Patienten 17 wurde mechanisch zerkleinert, in RPMI-Standardmedium suspendiert und rasch weiter verarbeitet. Nach Zentrifugation in PBS wurden die Zellen unter Lichtabschluss bei 4°C mit FITC-konjugiertem S100 als Melanomzellmarker und PE-konjugiertem monoklonalem CCR9-Antikörper für 15 min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen sofort ohne Fixierung mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer gemessen.

2.2.13 Internalisierung des Chemokinrezeptors CCR9

Eine der Zellantworten auf einen Stimulus mit einem Liganden, für den die Zelle einen Rezeptor trägt, ist dessen Internalisierung nach Bindung des Liganden (KLEINHANS, AMARA). Um diesen Mechanismus als Reaktion auf den Liganden TECK bei dem Chemokinrezeptor CCR9 zu untersuchen, wurden Melanomzellen aller CCR9-positiven Zelllinien 45 min mit 1 µg/ml TECK bzw. als Negativkontrolle nur in RPMI-1640 Medium bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit dem PE-konjugierten monoklonalen CCR9-Antikörper bzw. der Isotypenkontrolle 15 min bei 4°C unter Lichtabschluss inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen in PBS und der Fixierung mit 1% Formaldehyd in PBS erfolgte die sofortige Messung.

2.2.14 Aktinpolymerisation als Antwort auf TECK

Die Aktinpolymerisation ist ein frühes Ereignis in der Zelle nach Stimulation mit einem Chemokin bei Expression eines funktionell aktiven Rezeptors (BLEUL). Sie kann durch Anfärbung des intrazellulären filamentösen Aktins mit fluoreszierendem Phalloidin (FITC-Phalloidin) gemessen werden. Hierzu wurden die Melanomzellen sowie die frische Einzelzellsuspension einmal im Standard-Kulturmedium gewaschen und das Pellet bei einer Temperatur von 37°C in RPMI 1640-Medium mit 0,5% BSA aufgenommen und danach mit TECK, dem Liganden für den zu untersuchenden Chemokinrezeptor CCR9 in einer Konzentration von 1 µg/ml bei 1×10^6 Zellen/ml inkubiert. Als Negativkontrolle diente das Chemokin CCL21, welches spezifisch für den Rezeptor CCR7 ist. Dieses wurde in einer Konzentration von 200 nM zugegeben. Als Positivkontrolle diente 100 ng/ml PMA. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurden 50 µl einer Lösung mit 4×10^{-7} mol/l FITC-markiertem Phalloidin und 0,5 mg/ml 1-Lysophosphatidylcholin hinzugegeben. Danach wurden die Zellen mit 1% Formaldehyd in PBS fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit einem FACSCalibur-Durchflusszytometer gemessen. Die Ergebnisse wurden in Relation zur mittleren Fluoreszenzintensität einer Probe (bezeichnet als 00) ohne Zugabe von PMA oder Chemokinen dargestellt.

2.2.15 Funktionalität von CXCR4 auf Melanomzellen

Die Tumorzellen wurden vom Boden der Kulturflaschen mit einem Zellschaber abgeschabt, in 14 ml-Röhrchen überführt und zweimal je 10 min in RPMI bei 2000 U/min (800 g) gewaschen. 10 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo-3 AM wurden hinzugefügt. Nach 45 min Inkubation bei 37°C unter Lichtabschluss wurden die Zellen erneut mit lauwarmem RPMI gewaschen. Ein zweiter Färbeschritt erfolgte mit dem CXCR4-Antikörper. Die Inkubation erfolgte bei 4°C 15 min lang im Dunkeln. Danach wurden die Zellen in RPMI bei Raumtemperatur gewaschen, in 150 µl Medium aufgenommen, in FACS-Röhrchen überbracht und bei Raumtemperatur bis zur Messung aufbewahrt. Die Messung erfolgte je am gleichen Tag wie die Färbung mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer und CellQuest Software.

Nach Etablierung einer Grundlinie für die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-3 AM angefärbten Zellen wurde nach 400 s 1 µg SDF-1α hinzugegeben. Eine Erhöhung

der intrazellulären Kalziumkonzentration wurde durch einen Anstieg der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Fluo-3 AM ersichtlich.

2.2.16 Statistische Analysemethoden

Für die Analysen wurden der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung, der Wilcoxon-Rangsummentest und der exakte Test nach Fischer (in seiner Erweiterung auf beliebig große Tabellen auch Freeman-Halton-Test genannt) verwendet. Für alle Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% angewendet. Die statistische Berechnung wurde unter Verwendung des Statistical Analysis System (SAS) Version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von CCR9 und CXCR4 auf CD3- und CD8-positiven T-Zellen bei gesunden Spendern und Melanompatienten

Es wurde die Expression von CCR9 und CXCR4 auf CD3+/CD8+ T-Zellen aus dem peripheren Blut von sechs gesunden Spendern (siehe Tab. 2) und sechs Melanompatienten (siehe Tab. 3) untersucht. CCR9 war durchschnittlich auf 2,5% der CD3+/CD8+ Lymphozyten bei gesunden Spendern und zum gleichen Prozentsatz bei Melanompatienten exprimiert. CXCR4 wurde mit einem Mittelwert von 96,5% bei den gesunden Kontrollpersonen und 92,2% bei den Melanompatienten exprimiert.

Tab. 2: CCR9- und CXCR4-Expression auf CD3+/CD8+ T-Zellen gesunder Spender

Spender	CCR9-Expression [%]	CXCR4-Expression [%]
1	1	93
2	1	97
3	3	99
4	2	96
5	4	95
6	4	99
Mittelwert	2,50	96,50
Median	2,50	96,50
Standardabweichung	±1,38	±2,35

Tab. 3: CCR9- und CXCR4-Expression auf unstimulierten CD3+/CD8+ T-Zellen von Melanompatienten

Patient	zugehörige Zelllinie	CCR9-Expression [%]	CXCR4-Expression [%]
1	UKBF-Mel 12	1	80
8	UKBF-Mel 13A	1	94
9	UKBF-Mel 11	4	92
10	UKBF-Mel 14A	1	97
11	UKBF-Mel 16	1	96
13	UKBF-Mel 18	7	94
Mittelwert		2,50	92,17
Median		1,00	94,00
Standardabweichung		±2,51	±6,21

3.2 Expression von CCR9 und CXCR4 auf melanomspezifischen T-Zellen

Nachdem zuvor die Expression von CCR9 und CXCR4 auf unstimulierten PBMCs gesunder Spender und Melanompatienten untersucht wurde, folgte nun die Analyse dieser Chemokinrezeptoren auf CD3+/CD8+ T-Zellen der Melanompatienten, die spezifisch IFN- γ gegen autologe Melanomzellen produzierten. In Abb. 3 wird jeweils ein Beispiel für CCR9 bzw. CXCR4 gezeigt. Die PBMCs der sechs Melanompatienten wurden mit den jeweiligen autologen Tumorzellen bzw. als Kontrolle ohne diese für 18 h inkubiert. Die unspezifische IFN- γ -Sekretion der unstimulierten Zellen wurde subtrahiert. Je nach Patient zeigten sich 0,2-1,2% melanomreaktive CD3+/CD8+ T-Zellen. Wie in Tab. 4 gezeigt, konnte auf durchschnittlich 7,17% der tumorreaktiven T-Zellen der Melanompatienten eine Expression von CCR9 nachgewiesen werden. CXCR4 war auf der Zelloberfläche von im Durchschnitt 81,17% der melanomreaktiven CD3+/CD8+ T-Lymphozyten zu finden.

Tab. 4: CCR9- und CXCR4-Expression auf melanomspezifischen CD3+/CD8+ T-Zellen

Patient	zugehörige Zelllinie	CCR9-Expression [%]	CXCR4-Expression [%]
1	UKBF-Mel 12	18	75
8	UKBF-Mel 13A	10	73
9	UKBF-Mel 11	7	82
10	UKBF-Mel 14A	8	68
11	UKBF-Mel 16	0	94
13	UKBF-Mel 18	0	95
Mittelwert		7,17	81,17
Median		7,50	78,50
Standardabweichung		±6,77	±11,27

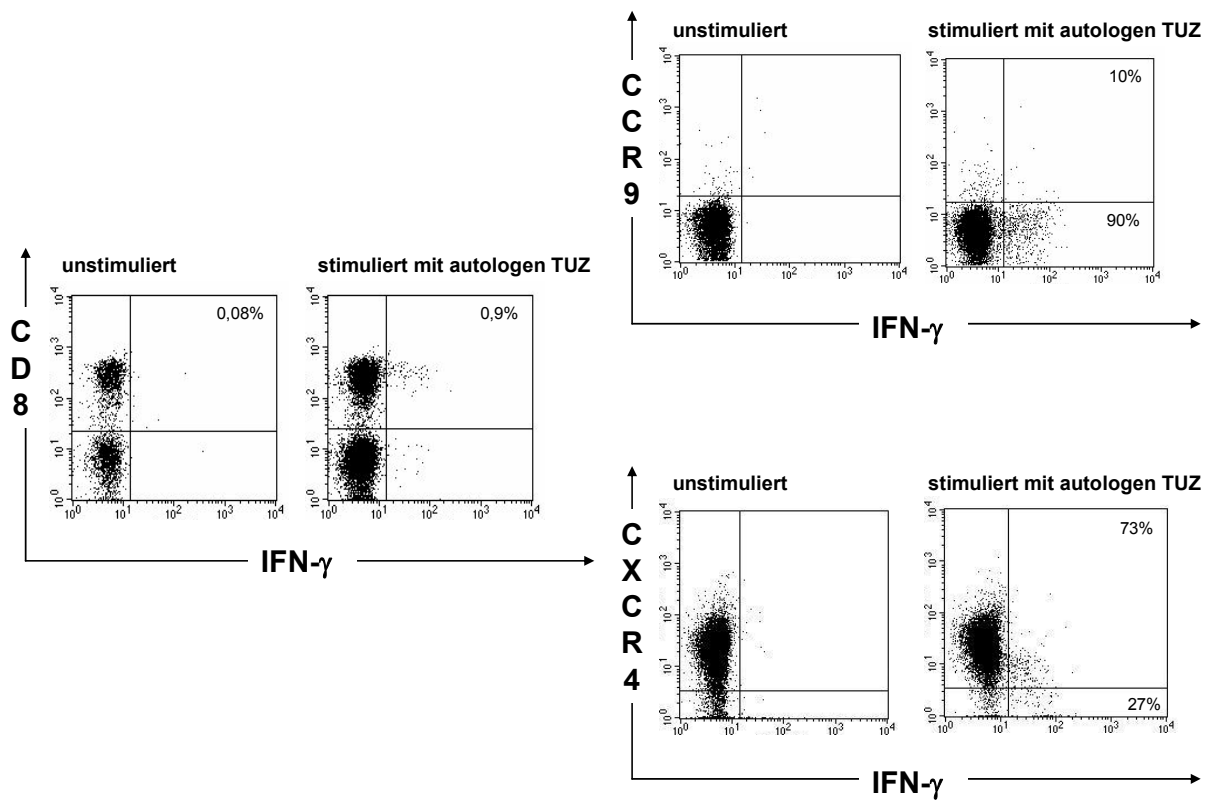


Abb. 3: IFN- γ Sekretion von CD3+/CD8+ T-Lymphozyten vor und nach Stimulation (links) mit autologen Tumorzellen (TUZ), CCR9-Expression (rechts oben) sowie CXCR4-Expression (rechts unten) jeweils auf unstimulierten und mit autologen Tumorzellen stimulierten (melanomreaktiven) CD3+/CD8+ T-Lymphozyten bei Patient 8 (UKBF-Mel 13A)

3.3 Funktionelle Analyse von CXCR4 auf PBMCs gesunder Spender und Melanompatienten

Um den funktionellen Zustand von CXCR4 auf unstimulierten CD3+/CD8+ T-Zellen bei gesunden Spendern und Melanompatienten zu überprüfen, wurde die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Antwort auf den CXCR4-Liganden SDF-1 α untersucht. Es wurden SDF-1 α -Konzentrationen von 10-300 ng/ml verwendet, welche in keiner der Proben der sechs gesunden Spender und der sechs Melanompatienten zu einem signifikanten Einstrom von Kalzium aus intrazellulären Speichern ins Zytoplasma der Zellen führte. Dies wird in Abb. 4 am Beispiel von Patient 1 gezeigt. Um auszuschließen, dass der monoklonale Antikörper gegen CXCR4 einen Blockierungseffekt bewirkt und es deshalb nicht zu einer Reaktion des Rezeptors auf seinen Liganden kommt, wurde der Versuch parallel ohne Zugabe des monoklonalen Antikörpers gegen CXCR4 durchgeführt. Auch hier konnte kein Anstieg des intrazellulären Kalziums beobachtet werden. Zur Kontrolle der Versuchsanordnung wurde der Kalzium-Flux bei CD3+/CD4+ T-Zellen gemessen, wobei eine deutliche Antwort auf SDF-1 α zu sehen war.

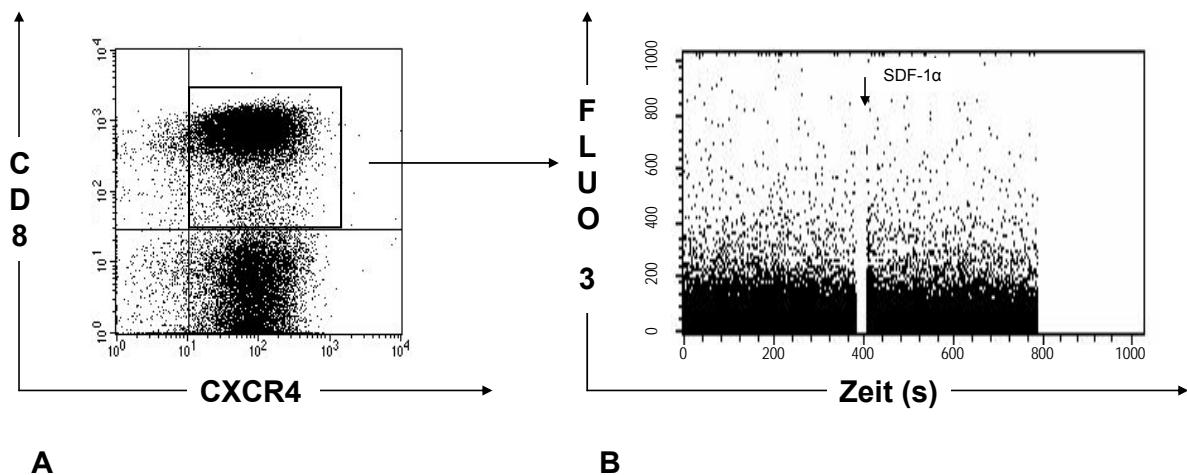


Abb. 4: A) Expression von CXCR4 auf CD3+/CD8+ T-Zellen
B) Analyse der Fluoreszenzintensität von Fluo-3 nach Stimulation mit SDF-1 α (bei t=400 s) auf CD3+/CD8+ T-Zellen von Patient 1 (UKBF-Mel 12)

3.4 Funktionelle Analyse von CXCR4 auf melanomreaktiven T-Zellen

Um festzustellen, ob CXCR4 auf CD3+/CD8+ T-Zellen, welche nach Inkubation mit dem autologen Tumor IFN- γ produzieren, funktionell aktiv ist, wurde die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration als Antwort auf die Stimulation mit dem Liganden von CXCR4 (SDF-1 α) untersucht. Hierfür wurde mit den Zellen von Patient Nr.1 (UKBF-Mel 12), bei welchem die höchste Frequenz melanomreaktiver T-Zellen nachgewiesen werden konnte, eine IFN- γ -Sekretionsanalyse in Kombination mit intrazellulärer Kalziummessung durchgeführt. Die IFN- γ -Sekretionsanalyse nach Inkubation mit den autologen Melanomzellen zeigte, wie in Abb. 5 (links) ersichtlich, 1,1% tumorreaktive CD8+ T-Zellen. Durch Setzen eines Gates auf diese tumorreaktiven Zellen konnte eine spezifische Kalziummessung durchgeführt werden. Ein Anstieg in der Fluoreszenzintensität des Kalziumfarbstoffes Fluo-3 AM in Reaktion auf die Zugabe von SDF-1 α zeigte die Funktionalität des Rezeptors CXCR4 (siehe Abb. 5 rechts). Zur Kontrolle wurde die erneute Steigerung der Fluoreszenzintensität durch Ionomycin gemessen.

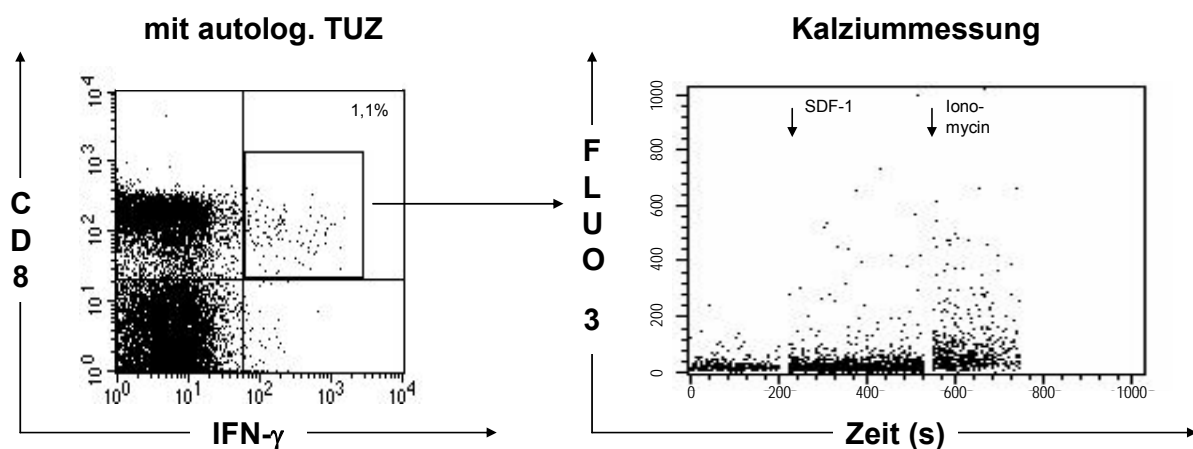


Abb. 5: Produktion von IFN- γ auf CD8+ T-Zellen (links), Kalziummobilisation in Reaktion auf den CXCR4-Liganden SDF-1 α (rechts) bei IFN- γ +/CD8+ Lymphozyten von Patient 1 (UKBF-Mel 12) (nach Letsch A, et al. Bone marrow contains melanoma-reactive CD8+ effector T cells and, compared with peripheral blood, enriched numbers of melanoma-reactive CD8+ memory T cells. *Cancer Res* 2003;63(17):5582-5586.)

3.5 Expression von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien

Die Expression von CCR9 und CXCR4 wurde auf 20 bzw. 19 Melanomzelllinien gemessen, welche aus Metastasen in Dünndarm, Haut, Weichteilgewebe, Lymphknoten und ZNS generiert werden konnten. CCR9 wurde, wie in Abb. 6 gezeigt, auf acht von 20 Melanomzelllinien (40%) exprimiert. Hierbei war die Höhe der Expression vergleichbar mit der T-Zell-Leukämieinie MOLT-4, für die bereits eine CCR9-Expression beschrieben wurde (YOUN 2001). Alle drei Zelllinien aus Dünndarmmetastasen zeigten eine CCR9-Expression sowie vier Zelllinien aus Lymphknotenmetastasen und eine aus einer Hautmetastase. CXCR4 wurde auf 14 von 19 untersuchten Melanomzelllinien (74%) gefunden (siehe Abb. 7). Davon zeigten vier von fünf untersuchten Melanomzelllinien aus Lymphknotenmetastasen eine CXCR4-Expression, vier von acht Zelllinien aus Hautmetastasen, alle drei Zelllinien aus Dünndarmmetastasen sowie die Melanomzelllinien aus einer Weichteil- und einer ZNS-Metastase. Unter den 14 CXCR4-positiven Melanomzelllinien befanden sich alle acht CCR9-positiven Zelllinien.

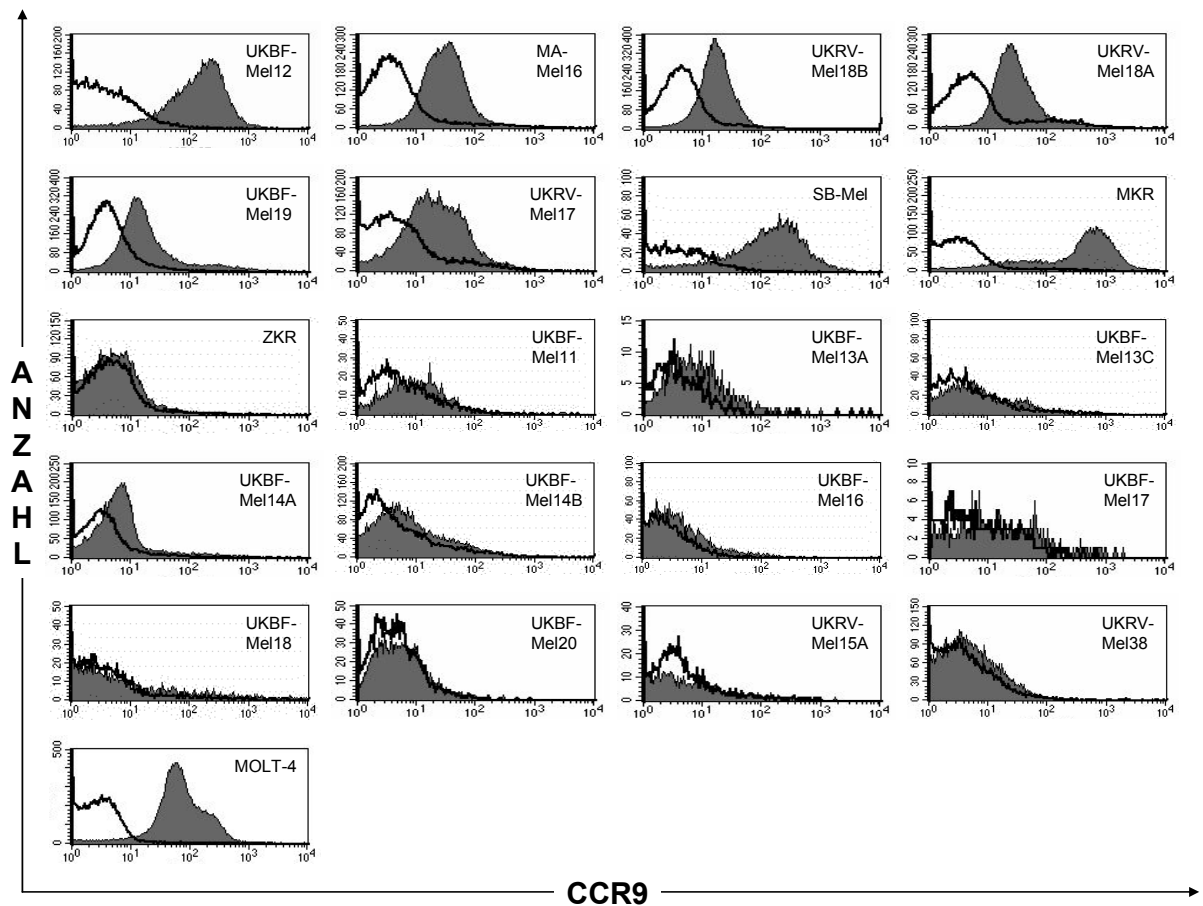


Abb. 6: CCR9-Expression auf Melanomzelllinien
 (Die Linie zeigt die Isotypenkontrolle, schattiert wird die Fluoreszenzintensität des PE-markierten CCR9-Antikörpers dargestellt. In der untersten Reihe befindet sich die Kontrolllinie MOLT-4 mit bereits beschriebener CCR9-Expression.)
 (nach Letsch A, et al. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. J Invest Dermatol 2004;122(3):685-690.)

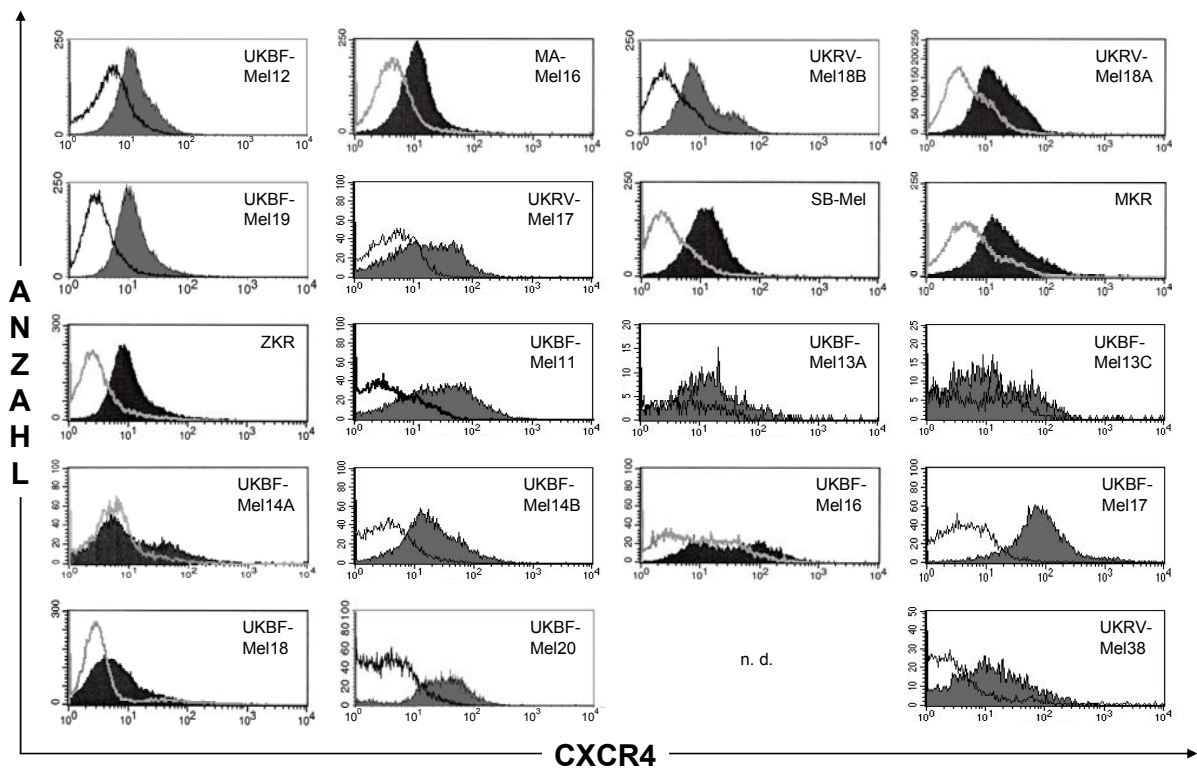


Abb. 7: CXCR4-Expression auf Melanomzelllinien
(Die Linie zeigt die Isotypenkontrolle, schattiert dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des PE-markierten CXCR4-Antikörpers.)

3.6 CCR9-Expression und Metastasierung in den Dünndarm

Die drei aus Dünndarmmetastasen stammenden Zelllinien (UKBF-Mel 12, MA-Mel 16 und UKRV-Mel 18B) zeigten alle eine Expression von CCR9. Bei einem dieser Patienten (UKRV-Mel 18B) wurde sieben Monate vor Diagnose und Resektion der Dünndarmmetastase eine CCR9-positive Zelllinie aus einer Lymphknotenmetastase generiert (UKRV-Mel 18A). Bei den anderen vier Patienten, deren Zelllinien CCR9-positiv waren (UKBF-Mel 19 aus einer Hautmetastase, UKRV-Mel 17, SB-Mel und MKR jeweils aus Lymphknotenmetastasen), wurden keine Dünndarmmetastasen klinisch manifest.

3.7 Expression von CCR9 auf unkultivierten Tumorzellen

Um zu überprüfen, ob der Chemokinrezeptor CCR9 auf Tumorzellen in vivo exprimiert wird, wurde die CCR9-Expression auf einer unkultivierten Einzelzellsuspension (Patient 17) direkt nach Entnahme der Melanommetastase aus dem Dünndarm gemessen. Hierzu wurden die Zellen mit dem Melanomzell-Marker S100 und mit CCR9 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die S100-positiven Melanomzellen exprimierten alle den Rezeptor CCR9 (siehe Abb. 8). Die Expressionshöhe war vergleichbar mit der Expression von CCR9 auf den CCR9-positiven Melanomzelllinien.

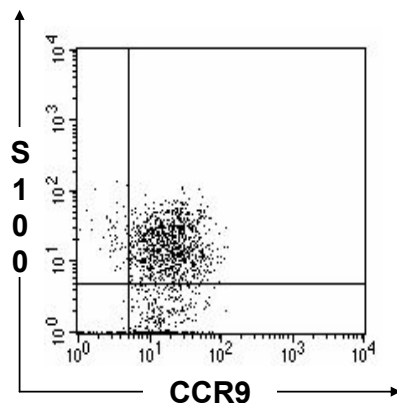


Abb. 8: CCR9-Expression auf frisch gewonnenen Zellen aus einer Dünndarmmetastase (nach Letsch A, et al. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol* 2004;122(3):685-690.)

3.8 Funktionelle Analyse von CCR9 - Rezeptor-Internalisation und Aktinpolymerisation

Um zu testen, ob der Chemokinrezeptor CCR9 auf Melanomzelllinien funktionell aktiv ist, wurde die Reaktion auf dessen Liganden TECK in zwei Versuchsanordnungen untersucht: Internalisation des Rezeptors und Aktinpolymerisation. Wie in der Abbildung 9 A und B jeweils in den ersten beiden Zeilen gezeigt, kommt es durch Inkubation mit dem CCR9-Liganden TECK zu einer Herunterregulierung der Rezeptordichte auf den drei Melanomzelllinien aus Dünndarmmetastasen (UKBF-Mel 12, MA-Mel 16, UKRV-Mel 18B) und auf der CCR9 positiven Zelllinie aus einer Hautmetastase (UKBF-Mel 19). Bei den vier CCR9-positiven Melanomzelllinien aus Lymphknotenmetastasen (UKRV-Mel 17, UKRV-Mel 18A, MKR, SB-Mel) konnte keine Veränderung in der Rezeptordichte gefunden werden. Die Melanomzelllinie UKRV-Mel 18A stammt von dem Patienten, aus dessen Dünndarmmetastase sieben Monate nach Resektion der Lymphknotenmetastase die CCR9-positive und TECK-reaktive Zelllinie UKRV-Mel 18B angezüchtet werden konnte.

Die Aktinpolymerisation ist ein frühes Ereignis in der durch Chemokinstimulation hervorgerufenen Zellantwort, welche schließlich zu einer gerichteten Bewegung der jeweiligen Zelle führt. Untersucht wurde sie durch Färbung von intrazellulärem filamentösem Aktin durch FITC Phalloidin. Jeweils in der untersten Zeile von Abb. 9 A und B sind die Auswertungen zu sehen. Nach Stimulation mit dem CCR9-Liganden TECK konnte bei den drei CCR9-positiven Melanomzelllinien aus Dünndarmmetastasen (UKBF-Mel 12, MA-Mel 16, UKRV-Mel 18B) eine Erhöhung des intrazellulären filamentösen Aktins um das 1,2- bis 1,6-fache festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war bei den fünf CCR9-positiven Zelllinien, welche von anderen Metastasenlokalisationen stammten (UKRV-Mel 18A, UKRV-Mel 17, SB-Mel, MKR, UKBF-Mel 19) keine Aktinveränderung als Reaktion auf die TECK-Stimulation messbar. Als Referenzwert und Negativkontrolle diente in dieser Versuchsanordnung je eine unstimulierte Probe. Der Ligand für den Rezeptor CCR7, das Chemokin CCL21, wurde zusätzlich mitgeführt. Die Expression von CCR7 wurde zuvor ausgetestet. UKRV-Mel17 und MKR erwiesen sich als CCR7-positive Zelllinien. Die unstimulierte Probe wurde als 100% Aktin Gehalt festgesetzt und Veränderungen im Gehalt an filamentösem Aktin jeweils in Relation hierzu angegeben. CCL21 rief bei den drei CCR9-positiven und CCR7-negativen Zelllinien aus Dünndarmmetastasen keine Aktinveränderung hervor. Bei den zwei CCR7-positiven Zelllinien aus Lymphknotenmetastasen (UKRV-Mel 17 und

MKR) konnte jedoch eine Aktinerhöhung um das mehr als 2-fache bzw. um das 1,2-fache gemessen werden. Alle Zelllinien zeigten eine Antwort auf Stimulation mit PMA, welches als Positivkontrolle mitgeführt wurde.

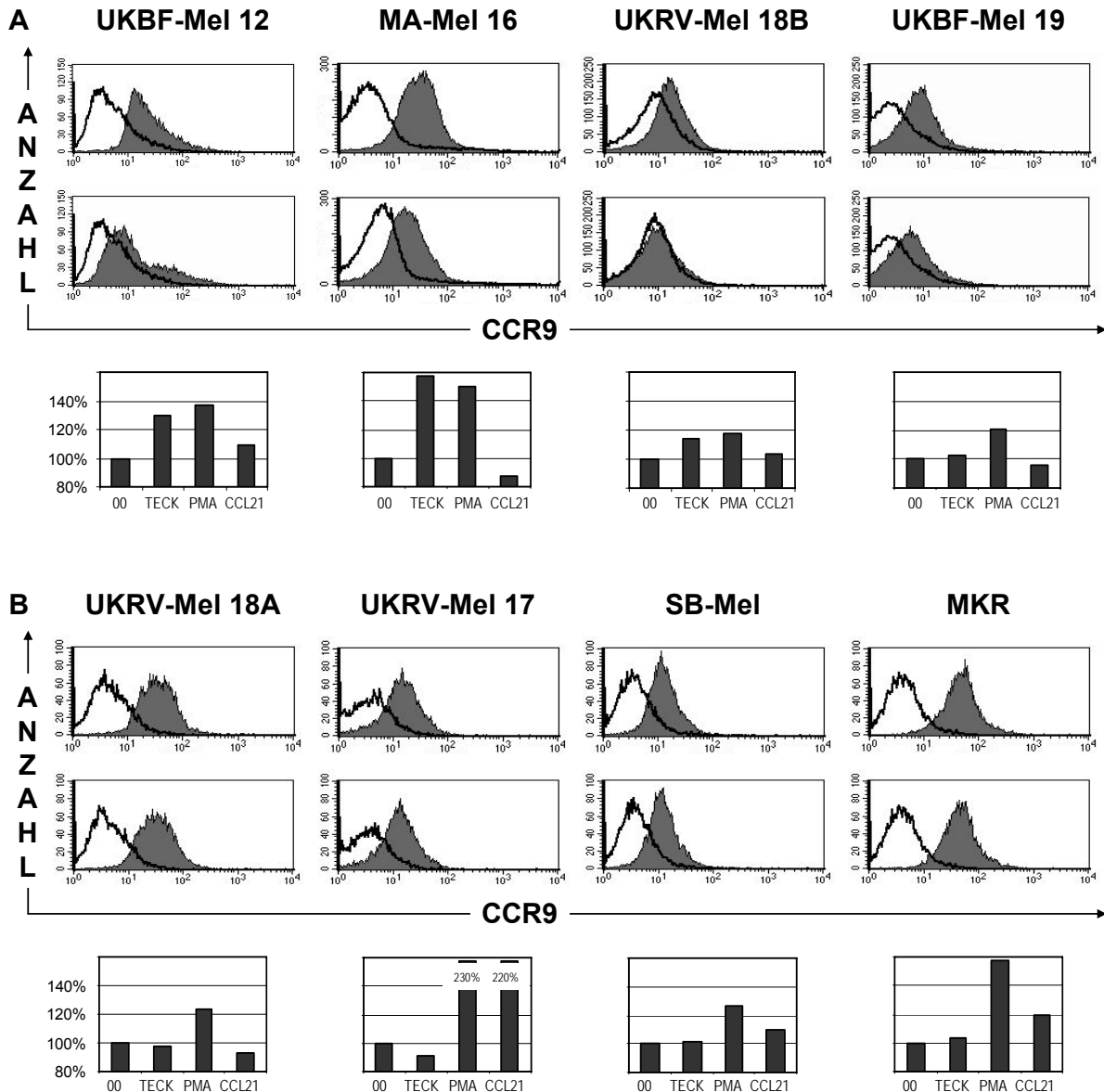


Abb. 9: A) und B) Funktionalität von CCR9 (Die erste Zeile zeigt jeweils die unstimulierte Probe (schattiert) mit der dazugehörigen Isotypenkontrolle (schwarze Linie), die zweite Zeile zeigt die Probe nach Stimulation (schattiert) des Rezeptors mit dem Liganden TECK (Rezeptor-Internalisation). Die dritte Zeile zeigt den prozentualen Gehalt an F-Aktin ohne Stimulation der Zellen (100%) und nach Stimulation mit TECK, mit der Positivkontrolle PMA und mit dem CCR7-Liganden CCL21.) (nach Letsch A, et al. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol* 2004;122(3):685-690.)

Auch in der unkultivierten Einzelzellsuspension aus frisch isolierten Melanomzellen einer Dünndarmmetastase konnte ein funktionell aktiver Chemokinrezeptor festgestellt werden. Dies wurde sowohl durch Rezeptor-Internalisation (siehe Abb. 10 A) als auch durch Anstieg des F-Aktin-Gehaltes der Zellen (siehe Abb. 10 B) nachgewiesen.

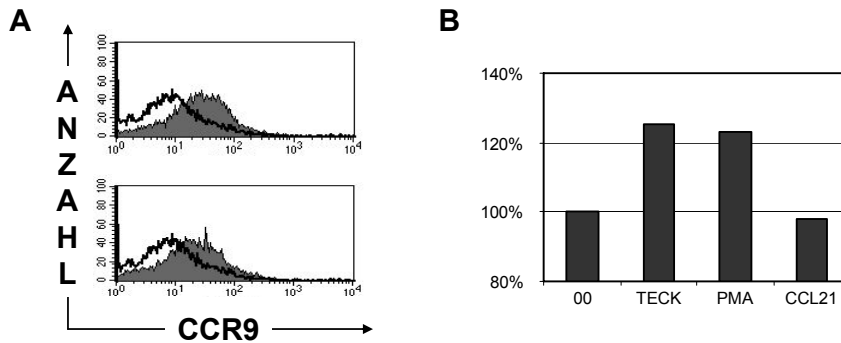


Abb. 10: Funktionalität von CCR9 in der frisch gewonnenen Einzelzellsuspension
 A) Fluoreszenzintensität von CCR9, in der ersten Zeile unstimuliert und in der zweiten Zeile nach Stimulation der Zellen mit TECK
 B) Prozentualer F-Aktin-Gehalt ohne Stimulation und nach Zugabe von TECK bzw. der Positivkontrolle PMA sowie des CCR7-Liganden CCL21
 (nach Letsch A, et al. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol* 2004;122(3):685-690.)

3.9 Funktionelle Analyse von CXCR4 - Kalziummobilisation

Da die Expression eines Rezeptors nicht zwangsläufig auch dessen Funktionalität impliziert, untersuchten wir anhand der reaktiven Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration in Antwort auf den CXCR4-Liganden SDF-1 α , ob sich CXCR4 auf den Tumorzelllinien in einem funktionell aktiven Zustand befindet. Dazu wurden vier CXCR4-positive Zelllinien (UKBF-Mel 12, UKRV-Mel 18A, UKBF-Mel 11, UKBF-Mel 14B) mit dem Kalzium-Indikator Fluo-3 AM angefärbt. Nach Zugabe von SDF-1 α bei 400 s konnte ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bei drei (UKBF-Mel 12, UKRV-Mel 18A, UKBF-Mel 11) von vier getesteten CXCR4-positiven Tumorzelllinien festgestellt werden. Als Beispiel wird in Abb. 11 der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Zugabe von SDF-1 α bei Patient 1 gezeigt.

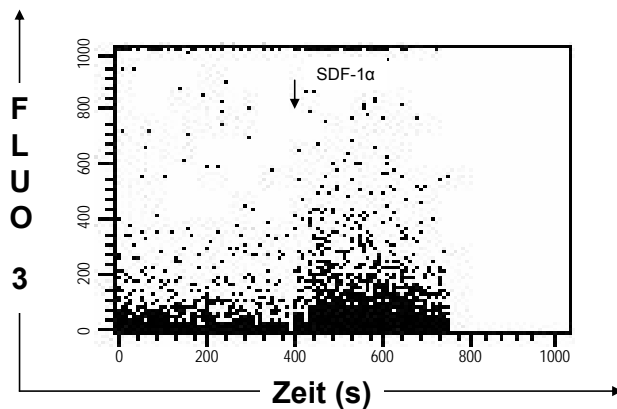


Abb. 11: Funktionalität von CXCR4 bei Patient 1 (UKBF-Mel 12)

Tab. 5: Zusammenfassung der Expression und Funktionalität von CCR9 und CXCR4 auf Tumorzelllinien

(Internalisation des Rezeptors nach Stimulation durch TECK (Intern. TECK), Aktinpolymerisation nach Stimulation mit TECK (Aktinpol. TECK), Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Stimulation mit SDF-1 α (Ca SDF-1 α))

(nach Letsch A, et al. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. J Invest Dermatol 2004;122(3):685-690.)

Pat.	Zelllinie	Metastasen-lokalisierung	CCR9-Expres-sion	Intern. TECK	Aktin-pol. TECK	CXCR4-Expres-sion	Ca SDF-1 α
1	UKBF-Mel 12	Dünndarm	positiv	Ja	Ja	positiv	Ja
2	MA-Mel 16	Dünndarm	positiv	Ja	Ja	positiv	n. d.
3	UKRV-Mel 18B	Dünndarm	positiv	Ja	Ja	positiv	n. d.
	UKRV-Mel 18A	Lymphknoten	positiv	Nein	Nein	positiv	Ja
4	UKBF-Mel 19	Haut	positiv	Ja	Nein	positiv	n. d.
5	UKRV-Mel 17	Lymphknoten	positiv	Nein	Nein	positiv	n. d.
6	SB-Mel	Lymphknoten	positiv	Nein	Nein	positiv	n. d.
7	MKR	Lymphknoten	positiv	Nein	Nein	positiv	n. d.
	ZKR	ZNS	negativ	n. d.	n. d.	positiv	n. d.
8	UKBF-Mel 13A	Haut	negativ	n. d.	n. d.	negativ	n. d.
	UKBF-Mel 13C	Haut	negativ	n. d.	n. d.	negativ	n. d.
9	UKBF-Mel 11	Weichteilgewebe	negativ	n. d.	n. d.	positiv	Ja
10	UKBF-Mel 14A	Haut	negativ	n. d.	n. d.	negativ	n. d.
	UKBF-Mel 14B	Haut	negativ	n. d.	n. d.	positiv	Nein
11	UKBF-Mel 16	Lymphknoten	negativ	n. d.	n. d.	negativ	n. d.
12	UKBF-Mel 17	Haut	negativ	n. d.	n. d.	positiv	n. d.
13	UKBF-Mel 18	Haut	negativ	n. d.	n. d.	negativ	n. d.
14	UKBF-Mel 20	Haut	negativ	n. d.	n. d.	positiv	n. d.
15	UKRV-Mel 15A	Lymphknoten	negativ	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
16	UKRV-Mel 38	Haut	negativ	n. d.	n. d.	positiv	n. d.
Gesamt			8/20	4/8	3/8	14/19	3/4
			40% positiv			74% positiv	

3.10 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zu untersuchen waren folgende Fragestellungen:

3.10.1 Sind signifikante Unterschiede in der Expression von CCR9 und CXCR4 auf CD3+/CD8+ T-Lymphozyten zwischen gesunden Spendern und Melanompatienten vorhanden?

Zunächst wurde ein Test auf Normalverteilung der CCR9- bzw. CXCR4-Expression auf unstimulierten CD3+/CD8+ T-Lymphozyten bei den gesunden Spendern und bei den Melanompatienten durchgeführt. Beim Kolmogorov-Smirnov-Test ist die Nullhypothese eine Normalverteilung, d. h. die Ablehnung der Nullhypothese bedeutet, dass keine Normalverteilung angenommen werden kann. Durch den Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung erhält man sowohl für die Expression von CCR9 als auch für CXCR4 auf unstimulierten CD3+/CD8+ T-Lymphozyten der Melanompatienten p-Werte, die zu einer Ablehnung der Nullhypothese führen.

Eine Mittelwertberechnung wird in der Regel für Daten vorgenommen, die einer Normalverteilung entsprechen; aus diesem Grunde erfolgt hier die Angabe von Mittelwert und Median. Auffällig ist, dass nur für die Beobachtungen der Patienten der Mittelwert vom Median abweicht, was ein weiterer Hinweis auf die fehlende Normalverteilung der Rezeptorexpression von CCR9 und CXCR4 auf den Lymphozyten der Patienten ist.

Obwohl bei den gesunden Spendern sowohl für CCR9 als auch für CXCR4 eine Normalverteilung angenommen werden kann, wird auf Grund der Verteilung der Chemokinrezeptoren auf den Lymphozyten der Melanompatienten zur Eruiierung der Signifikanz der Unterschiede zwischen Spendern und Patienten der Wilcoxon-Rangsummentest verwendet. Die Nullhypothese beim Wilcoxon-Rangsummentest ist das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes. Die p-Werte von 0,67 für CCR9 und von 0,13 für CXCR4 führen zur Ablehnung der Nullhypothese. Es kann daher, wie in Tabelle 6 ersichtlich, von signifikanten Unterschieden in der Chemokinrezeptorexpression zwischen Spendern und Patienten sowohl für CCR9 (A) als auch für CXCR4 (B) ausgegangen werden.

Tab. 6: Vergleich der CCR9- (A) bzw. CXCR4- (B) Expression auf unstimulierten T-Lymphozyten von gesunden Spendern und Melanompatienten (Spender 1-6 sowie Patienten 1, 8, 9, 10, 11 und 13)

A	CCR9-Expression Spender [%]	CCR9-Expression Patienten [%]
	1	1
	1	1
	3	4
	2	1
	4	1
	4	7
Mittelwert	2,50	2,50
Median	2,50	1,00
Standardabweichung	1,38	2,51
Kolmogorov-Smirnov-Test p-Werte	0,50	0,00
Wilcoxon Rangsummen Test p-Wert	0,67	

B	CXCR4-Expression Spender [%]	CXCR4-Expression Patienten [%]
	93	80
	97	94
	99	92
	96	97
	95	96
	99	94
Mittelwert	96,50	92,17
Median	96,50	94,00
Standardabweichung	2,35	6,21
Kolmogorov-Smirnov-Test p-Werte	0,50	0,05
Wilcoxon Rangsummen Test p-Wert	0,13	

3.10.2 Sind signifikante Unterschiede der CCR9- und CXCR4-Expression auf der Gesamtpopulation der CD3+/CD8+ T-Lymphozyten im Vergleich zu tumorreaktiven CD3+/CD8+ T-Lymphozyten nachweisbar?

Um die Signifikanz der Unterschiede der Expression von CCR9 bzw. CXCR4 zwischen durch Tumorzellen stimulierten (IFN- γ produzierenden) und unstimulierten Lymphozyten der Melanompatienten zu untersuchen, wurde ebenfalls ein Wilcoxon-Rangsummentest angewendet, da wie unter 3.10.1 beschrieben, keine Normalverteilung für die Rezeptorexpression bei unstimulierten Lymphozyten der Patienten angenommen werden kann. Bei p-Werten für CCR9 von 0,41 (siehe Tab. 7A) und von 0,13 für CXCR4 (siehe Tab. 7B) kann die Nullhypothese abgelehnt werden. Es können daher signifikante Unterschiede angenommen werden.

Tab. 7: Vergleich der Expression von CCR9 (A) und CXCR4 (B) auf unstimulierten und melanomreaktiven CD3+/CD8+ T-Lymphozyten von Melanompatienten (Patienten 1, 8, 9, 10, 11 und 13)

A	CCR9-Expression unstimuliert [%]	CCR9-Expression stimuliert [%]
	1	18
	1	10
	4	7
	1	8
	1	0
	7	0
Mittelwert	2,50	7,17
Median	1,00	7,50
Standardabweichung	2,51	6,77
Kolmogorov-Smirnov-Test p-Werte	0,00	0,50
Wilcoxon Rangsummen Test p-Wert	0,41	

B	CXCR4-Expression unstimuliert [%]	CXCR4-Expression stimuliert [%]
	80	75
	94	73
	92	82
	97	68
	96	94
	94	95
Mittelwert	92,17	81,17
Median	94,00	78,50
Standardabweichung	6,21	11,27
Kolmogorov-Smirnov-Test p-Werte	0,05	0,50
Wilcoxon Rangsummen Test p-Wert	0,13	

3.10.3 Besteht ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Metastasen und der (funktionellen) Expression von CCR9 bzw. CXCR4 auf Melanomzelllinien?

Hierbei wurde der Zusammenhang zwischen vorhandener und nicht vorhandener CCR9- bzw. CXCR4-Expression sowie zwischen funktionell aktiven Rezeptoren (getestet durch Aktinpolymerisation und Rezeptorinternalisation durch TECK für CCR9 und Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch SDF-1 α für CXCR4) und den verschiedenen Metastasenlokalisationen untersucht. Die Zusammenhänge zwischen der Lokalisation der Metastasen und der Rezeptorexpression wurden mit dem exakten Test nach Fisher überprüft.

Beim exakten Test nach Fisher ist die Nullhypothese das Fehlen eines Zusammenhanges, d. h. die Unabhängigkeit zweier Variablen. Bei der CCR9-Expression auf Melanomzelllinien aller Lokalisationen im Allgemeinen kann bei einem p-Wert von 0,01 die Nullhypothese verworfen werden und von signifikanten Zusammenhängen zwischen der Metastasenlokalisation und der CCR9-Expression ausgegangen werden (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Zusammenhang zwischen der CCR9-Expression auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisation
(Angegeben wird jeweils die Anzahl CCR9-positiver bzw. -negativer Zelllinien.)

Metastasenlokalisation	CCR9-Expression		Summe
	positiv	negativ	
Dünndarm	3	0	3
Lymphknoten	4	2	6
Haut	1	8	9
ZNS	0	1	1
Weichteilgewebe	0	1	1
Summe	8	12	20
Zellen mit erwarteter Häufigkeit < 5%	90%		
exakter Test nach Fisher p-Wert	0,01		

Auch bei der funktionellen CCR9-Expression ist auf Grund eines p-Wertes von 0,03 bei der Rezeptor-Internalisation in Reaktion auf TECK (siehe Tab. 9A) und einem p-Wert von 0,02 bei der Aktinpolymerisation in Reaktion auf TECK (siehe Tab. 9B) von einem signifikanten Zusammenhang mit der Lokalisation der Metastasen auszugehen.

Tab. 9: Zusammenhang zwischen der funktionellen Expression von CCR9 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisation
 A) Internalisation von CCR9 in Reaktion auf TECK (Intern. TECK)
 B) Aktinpolymerisation in Reaktion auf TECK (Aktinpol. TECK)
 (Angegeben wird jeweils die Anzahl der Zelllinien mit bzw. ohne Reaktion.)

A	Metastasenlokalisation	Intern. TECK		Summe
		ja	nein	
	Dünndarm	3	0	3
	Lymphknoten	0	4	4
	Haut	1	0	1
	Summe	4	4	8
	Zellen mit erwarteter Häufigkeit < 5%	100%		
	exakter Test nach Fisher p-Wert	0,03		

B	Metastasenlokalisation	Aktinpol. TECK		Summe
		ja	nein	
	Dünndarm	3	0	3
	Lymphknoten	0	4	4
	Haut	0	1	1
	Summe	3	5	8
	Zellen mit erwarteter Häufigkeit < 5%	100%		
	exakter Test nach Fisher p-Wert	0,02		

Bei der CXCR4-Expression kann beim exakten Test nach Fisher die Nullhypothese der Unabhängigkeit mit einem p-Wert von 0,73 nicht verworfen werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass, wie in Tab. 10 ersichtlich, keine statistischen Zusammenhänge zwischen der jeweiligen Metastasenlokalisierung und der Expression von CXCR4 auf den Melanomzelllinien vorliegen.

Tab. 10: Zusammenhang zwischen der Expression von CXCR4 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisierung

Metastasenlokalisierung	CXCR4-Expression		Summe
	positiv	negativ	
Dünndarm	3	0	3
Lymphknoten	4	1	5
Haut	5	4	9
Weichteilgewebe	1	0	1
ZNS	1	0	1
Summe	14	5	19
Zellen mit erwarteter Häufigkeit < 5%	90%		
exakter Test nach Fisher p-Wert	0,73		

Für die funktionelle CXCR4-Expression (intrazelluläre Kalziumerhöhung in Reaktion auf SDF-1 α) wurde bei nur vier getesteten Zelllinien wegen mangelnder Aussagekraft auf die Berechnung eines Zusammenhanges verzichtet (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Zusammenhang zwischen der funktionellen Expression von CXCR4 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisierung (Intrazelluläre Kalziummobilisation in Reaktion auf SDF-1 α (Ca SDF-1 α))

Metastasenlokalisierung	Ca SDF-1 α		Summe
	ja	nein	
Dünndarm	1	0	1
Lymphknoten	1	0	1
Haut	0	1	1
Weichteilgewebe	1	0	1
Summe	3	1	4

Insgesamt kann ein statistischer Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Metastasen und der CCR9-Expression angenommen werden, wohingegen kein statistischer Zusammenhang für die CXCR4-Expression und die Metastasenlokalisierung festgestellt werden konnte.

Um einen statistischen Zusammenhang speziell zwischen der CCR9 Expression und der Lokalisation Dünndarm untersuchen zu können, wurde die Tabelle 8 dichotomisiert (siehe Tab. 12). Nach einem p-Wert von 0,05 des exakten Tests nach Fisher kann man annehmen, dass ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Metastasen im Dünndarm und der CCR9 Expression auf den jeweiligen Melanomzelllinien besteht.

Tab. 12: Zusammenhang zwischen der Expression von CCR9 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisierung Dünndarm

Metastasenlokalisierung	CCR9-Expression		Summe
	positiv	negativ	
Dünndarm	3	0	3
andere	5	12	17
Summe	8	12	20
Zellen mit erwarteter Häufigkeit < 5%	50%		
exakter Test nach Fisher p-Wert	0,05		

Zusätzlich wurde speziell der Zusammenhang zwischen der funktionellen CCR9-Expression und der Metastasenlokalisierung Dünndarm überprüft, wobei von einem Signifikanzniveau von 15% ausgegangen werden müsste, um bei einem p-Wert von 0,14 bei der Rezeptor-Internalisation in Reaktion auf TECK von einem statistischen Zusammenhang ausgehen zu können (siehe Tab. 13A). Bei der Aktinpolymerisation in Reaktion auf TECK kann wiederum bei einem Signifikanzniveau von 5% von einem signifikanten Zusammenhang mit der Lokalisation der Metastasen ausgegangen werden (siehe Tab. 13B).

Tab. 13: Zusammenhang zwischen der funktionellen Expression von CCR9 auf Melanomzelllinien und der Metastasenlokalisierung Dünndarm
 A) Rezeptor-Internalisation nach Stimulation mit TECK (Intern. TECK)
 B) Aktinpolymerisation nach Stimulation mit TECK (Aktinpol. TECK)

A

Metastasenlokalisierung	Intern. TECK		Summe
	ja	nein	
Dünndarm	3	0	3
andere	1	4	5
Summe	4	4	8
Zellen mit erwarteter Häufigkeit < 5%	100%		
exakter Test nach Fisher p-Wert	0,14		

B

Metastasenlokalisierung	Aktinpol. TECK		Summe
	ja	nein	
Dünndarm	3	0	3
andere	0	5	5
Summe	3	5	8
Zellen mit erwarteter Häufigkeit < 5%	100%		
exakter Test nach Fisher p-Wert	0,02		

3.10.4. Besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien?

Der Zusammenhang zwischen der Expression von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien wurde, wie in Tab. 14 ersichtlich, mit dem exakten Test nach Fisher überprüft, wobei die Nullhypothese die Unabhängigkeit ist. Da die Nullhypothese abgelehnt wird (p -Wert= 0,05), kann davon ausgegangen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Expression von CCR9 und CXCR4 gibt.

Tab. 14: Zusammenhang zwischen der Expression von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien

		CCR9-Expression		Summe
		positiv	negativ	
CXCR4-Expression	positiv	8	6	14
	negativ	0	5	5
Summe		8	11	19
Zellen mit erwarteter Häufigkeit < 5%		50%		
exakter Test nach Fisher p-Wert		0,05		

4 Diskussion

4.1 Expression von CCR9 und CXCR4 auf CD3+/CD8+ T-Zellen

Eine effektive Immunantwort gegen Tumoren setzt voraus, dass tumorspezifische T-Zellen in die gleichen Regionen wie Tumorzellen migrieren. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass für die Gewebespezifität sowohl von Leukozyten als auch von Tumorzellen Chemokine und ihre Rezeptoren eine maßgebliche Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Migrationspotential von T-Zellen in die Kompartimente Knochenmark und Dünndarm untersucht. Das Knochenmark ist von besonderem Interesse, da es neben Lunge und Leber Hauptlokalisierung von Metastasen ist und bei verschiedenen Tumoren persistierende residuelle Tumorzellen dort auch Jahre nach einer Therapie gefunden werden (ALLGAYER, SCHMIDT-KITTLER). Beim chemokinvermittelten Homing ins Knochenmark scheinen CXCR4 und sein Ligand SDF-1 α eine wichtige Rolle zu spielen (MÜLLER, GEMINDER). Im Dünndarm hingegen werden häufig Melanommetastasen gefunden (BLECKER) und er ist eines der wenigen Organe, in denen das Chemokin TECK, der Ligand für den Chemokinrezeptor CCR9, hoch exprimiert wird. Der Dünndarm könnte deshalb ein gutes Beispiel für chemokin-vermittelte organspezifische Metastasierung und ggf. auch für das organspezifische Homing von T-Zellen sein.

In dieser Arbeit wurde die Expression von CCR9 und CXCR4 auf CD3+/CD8+ T-Lymphozyten untersucht. Hierbei wurde verglichen zwischen gesunden Spendern und Melanopatienten sowie zwischen unstimulierten und durch Tumorzellen stimulierten Lymphozyten von Patienten mit metastasiertem Melanom. Bislang wurde eine Expression von CCR9 auf reifen und unreifen Thymozyten, welche CD4- und/oder CD8-positiv waren, beschrieben (YOUN 1999). Hierbei wurde postuliert, dass CCR9 einen spezifischen Rezeptor für das thymusspezifische „Homing“ der T-Zellen darstellt. Des Weiteren wurde für CD4+ T-Zellen, welche in die Lamina propria des Dünndarmes einwandern, beschrieben, dass für eine maximale Anreicherung der Zellen in der Lamina propria eine CCR9-Expression notwendig ist (STENSTAD). CCR9 konnte auf unstimulierten CD3+/CD8+ T-Zellen sowohl der gesunden Spender als auch der Melanopatienten mit durchschnittlich 2,5% in nur geringen Prozentsätzen nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit einer Arbeit von ZABEL et al., die auf T-Lymphozyten eine CCR9-Expression von wenigen Prozent fanden. Das wurde dadurch begründet, dass die T-Lymphozyten, welche während aller

Stadien ihrer Entwicklung CCR9 exprimieren, diesen Rezeptor beim Verlassen des Thymus herunterregulieren. Die kleine Untergruppe von CD3+/CD8+ T-Zellen, auf der ZABEL et al. eine CCR9-Expression fanden, zeigte gleichzeitig den Darm-Homing-Rezeptor $\alpha 4\beta 7$. Das im Dünndarm in höheren Mengen nachweisbare Chemokin TECK könnte dazu dienen, zirkulierende Lymphozyten in den Darm zu rekrutieren, da die CCR9 exprimierende Subgruppe einen funktionell aktiven Rezeptor im Sinne von Chemotaxis in Richtung des TECK-Gradienten aufwies (ZABEL). Die Resultate von ZABEL et al. beziehen sich jedoch auf CD8+ Memory-T-Zellen (CD45RA low/-), während in unseren Untersuchungen die unstimulierten Zellen nicht weiter charakterisiert wurden. Trotz gleichem Mittelwert (2,5%) der prozentualen CCR9-Expression zeigte sich bei unterschiedlichem Median (2,5% bei den Spendern und 1% bei den Melanompatienten) ein signifikanter Unterschied zwischen Spendern und Melanompatienten in der Rezeptorexpression. Hierbei ist jedoch, wie auch bei den weiteren Analysen, damit zu rechnen, dass die Tests auf Grund der niedrigen Fallzahl eine geringe Power haben. Die statistischen Analysen dienen hier dazu, mögliche Tendenzen aufzuzeigen. Bei den durch Tumorzellen stimulierten Lymphozyten kann durch die IFN- γ -Produktion von einem Effektor-Phänotyp ausgegangen werden. Auf diesen Zellen lag die CCR9-Expression mit 7,17% (Median 7,5%) signifikant höher als auf den unstimulierten Kontrollen. Es scheint hier demnach eine Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Zelle zu bestehen. Möglicherweise wird der nach Austritt aus dem Thymus deaktivierte CCR9-Rezeptor nach Aktivierung der T-Zelle durch Tumorantigene teilweise wieder an die Oberfläche gebracht. Bei Patienten mit entzündlichen Dünndarmerkrankungen wurden hohe Frequenzen CCR9-positiver T-Zellen im peripheren Blut gefunden (PAPADAKIS). Hier ging man jedoch von einer Umverteilung aus, da die Anzahl CCR9-positiver Zellen im Dünndarm reduziert war. Bei Patient 1 mit bekannter Dünndarmmetastasierung wurde mit 18% die höchste Anzahl CCR9-positiver melanomspezifischer T-Zellen gefunden, was eher gegen die primäre Annahme spricht, dass es ein Dünndarm-spezifisches Kompartiment gibt, in das tumorspezifische T-Zellen nicht einwandern können. Bei den anderen fünf Patienten ohne klinisch evidente Dünndarmmetastasen, von denen Blut zur Verfügung stand, zeigten sich mit 0-10% deutlich geringere Frequenzen melanomspezifischer CCR9-positiver T-Zellen. Ob sich CCR9 auf den zytotoxischen T-Lymphozyten in einem funktionell aktiven Zustand befindet und die Zellen dadurch zu einer aktiven Wanderung in den Dünndarm befähigt werden, bleibt in Zukunft noch zu untersu-

chen, damit klarere Aussagen über das Verhalten und die eventuelle Tumorbekämpfung durch diese Zellen getroffen werden können. Möglicherweise ist CCR9 bei Patienten mit Dünndarm-Metastasen auf den tumorspezifischen T-Zellen exprimiert, aber funktionell nicht aktiv.

Bei CXCR4 hingegen zeigte sich im Vergleich zu CCR9 ein umgekehrtes Verhalten der Rezeptorexpression auf den Lymphozyten. Während der Rezeptor bei unstimulierten CD3+/CD8+ T-Lymphozyten gesunder Spender und Melanompatienten zu im Mittel 96,50% bzw. 92,17% (Median 96,50% bzw. 94,00%) exprimiert wurde, sank die Expression von CXCR4 bei den mit Tumorzellen stimulierten CD3+/CD8+ T-Zellen der Patienten signifikant auf durchschnittlich 81,17% (Median 78,50%). In der Arbeit von JOURDAN et al. wird ebenfalls eine Herunterregulierung der CXCR4-Expression auf T-Zellen im peripheren Blut nach Antigen-Stimulation beschrieben. Hier wurden jedoch nicht CD8+ T-Zellen, sondern CD4+ T-Zellen untersucht und es wurde eruiert, wie empfänglich diese Zellen für den Eintritt des HI-Virus in die Zelle sind. Für CD3+/CD8+ T-Lymphozyten wurde bisher nicht beschrieben, ob es eine Veränderung in der Rezeptordichte nach Antigenstimulation gibt.

Der Chemokinrezeptor CXCR4 wurde zusätzlich zu seiner Expression auf CD3+/CD8+ T-Lymphozyten auch auf seine Funktionalität untersucht, um zu eruieren, inwieweit es diesen Zellen möglich ist, chemokinvermittelt ins Knochenmark einzuwandern. Bei unstimulierten Lymphozyten von sechs gesunden Spendern sowie bei sechs Melanompatienten konnte keine Antwort im Sinne einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration auf den CXCR4-Liganden SDF-1 α beobachtet werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Rezeptor sich in einem funktionell inaktiven Zustand auf diesen Zellen befindet. Die CD3+/CD8+ T-Lymphozyten von Patient 1 (UKBF-Mel 12), welche durch autologe Tumorzellen stimuliert wurden, zeigten die höchste Frequenz melanomreaktiver Zellen, so dass bei diesen Zellen eine IFN- γ -Sekretionsanalyse in Kombination mit intrazellulärer Kalziummessung durchgeführt werden konnte. Eine deutliche Kalziumantwort wurde in Reaktion auf den CXCR4-Liganden SDF-1 α beobachtet. Bei den melanomreaktiven Zellen dieses Patienten liegt demnach ein funktionell aktiver Chemokinrezeptor vor, welcher möglicherweise durch die Interaktion mit dem Antigen Tumorzelle in diesen Zustand versetzt wurde, da in unstimuliertem Zustand die Lymphozyten dieses Patienten keine Kalziumantwort zeigten. Der Nachweis von funktionellem CXCR4 zeigt das Potential dieser Zellen, chemokinvermittelt ins Knochenmark oder in andere Kompartimente

mit hoher Expression von SDF-1 α zu migrieren. Im Knochenmark wurden bis zu siebenfach höhere Mengen melanomreaktiver T-Zellen im Vergleich zu peripherem Blut gefunden (LETSCH). Hier könnten die IFN- γ -positiven und damit als Effektorzellen einzustufenden Lymphozyten metastatische Tumorzellen im Sinne von Knochenmark-Mikrometastasen vernichten. ZHANG et al. konnten in einem dreidimensionalen mehrlagigen Melanom-Zellkultur-System eine CXCL12/CXCR4-abhängige Wanderung der zytotoxischen T-Lymphozyten durch die Trennschicht zu den Tumorzellen und eine durch sie induzierte Apoptose der Melanomzellen zeigen. Da auch Melanomzellen selbst CXCL12 sezernieren (ZHANG 2005 und 2006), könnte es den zytotoxischen Zellen auch möglich sein, zu Metastasen in anderen Organen, welche kein CXCL12 produzieren, zu migrieren.

4.2 Expression und Funktionszustand von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien

Die Organselektivität bei der Metastasierung von Tumorzellen wird zu einem großen Teil von Faktoren bestimmt, welche in den entsprechenden Organen exprimiert werden und dort die Adhäsion an Blutgefäße, den Austritt in die Zielorgane sowie die Migration innerhalb der Gewebe fördern. Von den verschiedenen Komponenten, welche die Organselektivität beeinflussen, wird den Chemokinen und ihren Rezeptoren eine wichtige Rolle beigemessen (BEN-BARUCH).

Der Chemokinrezeptor CCR9 konnte zuvor noch nicht auf Melanomzelllinien nachgewiesen werden. MÜLLER et al. testeten zwölf Melanomzelllinien und fanden keine Expression von CCR9. In dieser Untersuchung konnte CCR9 erstmalig auf 8 von 20 Melanomzelllinien, die aus verschiedenen Metastasenlokalisationen stammten, nachgewiesen werden. Alle drei Zelllinien aus Dünndarmmetastasen exprimierten CCR9. Von 17 weiteren Zelllinien aus verschiedenen Metastasenlokalisationen zeigten fünf eine Expression von CCR9. Hiervon wurden eine aus einer Hautmetastase und vier Zelllinien aus Lymphknotenmetastasen generiert. Bei Patient 7 zeigte die Zelllinie MKR aus einer Lymphknotenmetastase eine CCR9-Expression, während bei der Zelllinie ZKR aus einer ZNS-Metastase desselben Patienten keine Expression von CCR9 nachgewiesen werden konnte. Hier wurde möglicherweise die Rezeptorexpression im Verlauf herunterreguliert. Eine der CCR9-positiven Zelllinien aus einer Lymphknotenmetastase (UKRV-Mel 18A) stammt von einem Patienten, welcher einige Zeit später eine klinisch evidente Dünndarmmetastase entwickelte. Bei den ande-

ren Patienten wurden keine Dünndarmmetastasen diagnostiziert. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Lokalisation der Metastasen allgemein und der Expression von CCR9 auf den Melanomzelllinien konnte festgestellt werden. Speziell wurde die Lokalisation Dünndarm untersucht, wobei ein signifikanter Zusammenhang zwischen Dünndarmmetastasierung und CCR9-Expression ermittelt werden konnte. Später wurde durch AMERSI et al. ebenfalls eine CCR9-Expression auf Melanomzelllinien aus Dünndarmmetastasen nachgewiesen. Durchflusszytometrisch wurden zwei Zelllinien sowie vier Einzelzellsuspensionen aus kryokonservierten Präparaten aus Dünndarmmetastasen untersucht, welche in Analogie zu unseren Untersuchungen alle CCR9 exprimierten. Per RT-PCR wurden 23 Zelllinien getestet, wobei acht Zelllinien aus Dünndarmmetastasen stammten. Diese acht Zelllinien zeigten alle eine CCR9-Expression, die restlichen Zelllinien aus anderen Metastasenlokalisationen zeigten diese nicht. Ebenso fanden AMERSI et al. per RT-PCR in Paraffinblöcken von Dünndarmmetastasen in 88 von 102 Fällen CCR9 mRNA, während die Präparate aus anderen Metastasenlokalisationen nicht CCR9-positiv waren. Zusätzlich wurden 23 primäre Melanome nach Exzision auf CCR9 untersucht. Hier wurde bei elf Tumoren eine CCR9-Expression gefunden, wovon wiederum sieben Patienten (64%) im Verlauf Dünndarmmetastasen entwickelten.

Die Funktion des Chemokinrezeptors CCR9 und seines Liganden TECK könnte analog zu der von CCR10 und CCL27 in Bezug auf die Tumorprogression in der Haut (MURAKAMI) sein, indem möglicherweise die Tumorzellen im Bereich des Dünndarms zurückgehalten werden und an dieser Stelle überleben können, da sie hier entsprechende Wachstumsbedingungen vorfinden (HWANG). Bei Prostatakarzinom-Zelllinien fanden SINGH et al. eine CCR9-Expression und postulierten, dass TECK, welches in Lymphknoten exprimiert wird, nicht nur ein Homing metastatischer Zellen bewirkt, sondern auch einen antiapoptotischen Effekt besitzt und somit das Überleben der Zellen begünstigt. Dem Rezeptor CCR9 schrieben sie eine wichtige Rolle bei der Migration und Invasion von Tumorzellen zu (SINGH).

Eine Expression von CXCR4 wurde bereits auf Zelllinien vom Mammakarzinom (MÜLLER), Kolonkarzinom (ZEELLENBERG), Prostatakarzinom (ENGL), Ovarialkarzinom (SCOTTON), Gliom und Medulloblastom (RUBIN), nicht-kleinzelligen Bronchiolalkarzinom (SU), Lymphom (JUAREZ) und Melanom (MÜLLER, ROBLEDO, SCALA 2005 und 2006) nachgewiesen. In unserer Untersuchung zeigten 14 von 19 Zelllinien (74%) aus verschiedenen Metastasenlokalisationen eine Expression von CXCR4,

wobei die CXCR4-Expression von der Lokalisation der Metastasen unabhängig war. SCALA et. al. wiesen mittels Immunhistochemie auf 33 von 63 Melanommetastasen (52,4%) eine CXCR4-Expression sowie mittels Durchflusszytometrie bei drei von acht Melanomzelllinien eine hohe Positivität (>90% positive Zellen) und bei den restlichen fünf Zelllinien einen Expressionslevel von ca. 5-65% nach (SCALA 2006). MÜLLER et al. zeigten auf allen zwölf untersuchten Melanomzelllinien eine mehr oder weniger hohe CXCR4-Expression in der RT-Polymerasekettenreaktion. KIM et al. beschrieben ebenfalls einen Nachweis des CXCR4-Gens auf allen neun per RT-PCR untersuchten Melanomzelllinien sowie auf 24 von 27 untersuchten Metastasen (KIM 2006). Diese unterschiedlichen Ergebnisse kommen einerseits durch die verschiedenen Nachweismethoden und andererseits durch unterschiedliche Grenzen zustande. Betrachtet man die Bandbreite der CXCR4-Expression von über 50% bis fast 100%, stimmen die Ergebnisse tendenziell mit unseren Untersuchungen überein. Nach der Rezeptorexpression wurde die Funktionalität von CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien getestet. Bei CCR9 dienten zwei verschiedene Versuchsanordnungen zur Überprüfung der Funktionalität des Rezeptors. Die Rezeptor-Internalisation gehört bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu den ersten Reaktionsschritten bei Stimulation mit dem entsprechenden Liganden. Einige Schritte später kommt es zur Polymerisation von Aktinfilamenten in der Zelle, wodurch in der Folge eine Veränderung der Zellmorphologie und eine gerichtete Bewegung resultieren können. Alle drei aus Dünndarmmetastasen stammenden Zelllinien zeigten in beiden Versuchen eine Reaktion auf Stimulation mit dem Liganden, d.h. eine Internalisation des Rezeptors und eine Zunahme der Aktinpolymerisation. Es konnte jedoch nur bei der Aktinpolymerisation in Reaktion auf den CCR9-Liganden TECK ein p-Wert bestimmt werden, der deutlich auf einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation Dünndarm und der funktionellen CCR9-Expression hinweist. Bei der anderen funktionellen Versuchsanordnung, der Internalisation von CCR9 nach Stimulation mit TECK, reagierte auch eine nicht aus dem Dünndarm stammende Zelllinie, so dass bei den vorliegenden kleinen Fallzahlen ein Signifikanzniveau von 15% angenommen werden müsste, um hier von einem signifikanten Zusammenhang ausgehen zu können. Diese Zelllinie, welche aus einer Hautmetastase stammte, zeigte aber nur einen funktionell aktiven Rezeptor im Sinne einer Internalisation. Eine Aktinpolymerisation war nicht nachweisbar. Dies könnte bedeuten, dass die CCR9-TECK-Interaktion intakt ist und somit eine Rezeptor-Internalisation resultiert, jedoch mögli-

cherweise eine Blockade im späteren Reaktionsweg vorliegt, so dass es nicht zur Polymerisation der Aktinfilamente kommt. Die fehlende Reaktion auf TECK in beiden Versuchsanordnungen bei den anderen CCR9-positiven Melanomzelllinien aus Lymphknotenmetastasen könnte einer mangelnden Bindungsfähigkeit des Rezeptors geschuldet sein. Dies ist zum Beispiel möglich bei einem Rezeptor-Polymorphismus oder, wenn eine Mutation im betreffenden Gen stattgefunden hat. Auch wäre ein Defekt bei der Internalisation des Rezeptors denkbar. Dies wurde bei der Zelllinie HepG2 für den Rezeptor CXCR4 beschrieben. Diese Linie stammt aus einem hepatozellulären Karzinom und zeigte keine Internalisation des Rezeptors CXCR4 nach Stimulation mit dem Liganden SDF-1 α . Hier wurde die Hypothese eines blockierenden Moleküls aufgestellt (MITRA). Als weitere Möglichkeit wäre ein mehrschrittiger Prozess in der Metastasierung denkbar. So könnten die Zellen zunächst eine Expression des Rezeptors CCR9 zeigen und erst später diesen Rezeptor funktionell aktivieren. Bei der Patientin, aus deren Lymphknotenmetastase die Zelllinie UKRV-Mel 18A gezüchtet wurde, war CCR9 funktionell nicht aktiv. In der später resezierten Dünndarmmetastase jedoch zeigte sich ein in beiden Versuchsanordnungen funktionell aktiver Rezeptor, was dafür sprechen könnte, dass die Funktionalität erst im Verlauf erlangt wird oder, dass der Rezeptor durch andere Einflüsse aktiviert oder auch deaktiviert wird.

Die Funktionalität des Rezeptors CXCR4 wurde anhand der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration in Reaktion auf die Stimulation mit dem Liganden SDF-1 α getestet. Drei der vier getesteten Melanomzelllinien zeigten einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, also einen funktionell aktiven Rezeptor. Die Zelllinie UKBF-Mel 14B hatte zwar eine deutliche Expression für CXCR4, aber hier war der Rezeptor funktionell nicht aktiv. Es könnte hier ebenfalls eine Blockade im Downstream-Mechanismus vorliegen, ein blockierendes Molekül oder ein noch abgeschalteter bzw. noch nicht aktivierter Rezeptor. Bei nur vier getesteten Zelllinien konnte in unserer Untersuchung keine Assoziation eines funktionellen CXCR4 zu einer bestimmten Metastasenlokalisation gefunden werden.

4.3 Chemokinrezeptoren und deren Funktion in Zusammenhang mit Metastasierung

Bei CCR9 wäre ein Zusammenhang zwischen Expression dieses Rezeptors und organspezifischer Metastasierung in den Dünndarm nach den durchgeführten Untersuchungen denkbar. Diese scheint jedoch die Funktionalität des Rezeptors zur Voraussetzung zu haben. AMERSI et al. fanden in vitro bei CCR9-positiven Melanomzellen eine Migration in Richtung auf den CCR9-Liganden CCL25 sowie eine verstärkte Invasion nach Stimulation mit CCL25, was die Vermutung einer CCR9-getriggerten Metastasierung in den Dünndarm bestätigen könnte. CXCR4 konnte auf allen acht CCR9-positiven Melanomzelllinien nachgewiesen werden, während nur sechs der elf CCR9-negativen Zelllinien CXCR4 exprimierten. Mit dem exakten Test nach Fisher wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von CCR9 und CXCR4 auf den Melanomzelllinien überprüft. Da die Nullhypothese abgelehnt wurde, kann von einem statistischen Zusammenhang ausgegangen werden.

Beim primären Melanom wurde die CXCR4-Expression als Prognosefaktor für ein kürzeres krankheitsfreies Überleben und Gesamt-Überleben der Patienten beschrieben (SCALA 2005). Tumorzellen, die CXCR4 exprimieren, haben ein erhöhtes Potential zu proliferieren und Metastasen zu setzen (MÜLLER, MURAKAMI, ZEELENBERG). Die Koexpression von CXCR4 auf den CCR9-positiven Melanomzelllinien erleichtert es diesen Zellen möglicherweise zu metastasieren. Im nächsten Schritt wäre zu untersuchen, ob es einen molekularen Zusammenhang beim Erwerb der Expression von CXCR4 und CCR9 bei Tumorzellen gibt. Ebenfalls zu klären ist noch die Frage, wodurch und wann die einzelnen Chemokinrezeptoren aktiviert oder deaktiviert werden.

4.4 Klinische Bedeutung

Das Verständnis der molekularen Hintergründe sowohl für das Metastasierungsverhalten von Tumorzellen als auch für die Immunantwort gegen diese Zellen könnte in Zukunft für die Entwicklung neuer Therapiestrategien genutzt werden. Durch einen monoklonalen CXCR4-Antikörper konnten im Tierversuch Lungenmetastasen in ihrer Anzahl und Ausprägung vermindert werden (MÜLLER). Für AMD3100, einen nicht-kompetitiven Antagonisten der CXCL12-Bindung, wurde nach systemischer Gabe im Tiermodell eine Zunahme der Apoptose im Primärtumor beim Glioblastom- und Medulloblastom-Xenograft beschrieben sowie eine Abnahme der Zellproliferation beim Medulloblastom (RUBIN). Makromoleküle, welche auf einen artifiziellen CXCR4-Liganden transduziert und via Makropinozytose durch CXCR4-positive Tumorzellen aufgenommen wurden, konnten eine erhöhte Tumorzellelimination bewirken (SNYDER). Um eine Anwendbarkeit auch beim Menschen zu erreichen, müssen in Zukunft noch viele Fragen geklärt werden, da Chemokine und ihre Rezeptoren auch an vielen physiologischen Vorgängen im Organismus beteiligt sind. Als Beispiel ist die Rolle von CXCR4 bei der Vaskularisation des Gastrointestinaltraktes zu nennen (TACHIBANA). Die hier vorliegenden Untersuchungen zu CCR9 zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der funktionellen Expression eines Chemokinrezeptores und organspezifischer Metastasierung. Zudem können diese Ergebnisse die hohe Inzidenz von Dünndarmmetastasen beim Melanom über die CCR9-TECK-Interaktion erklären. Weiterführende Studien könnten zeigen, ob die Analyse der CCR9-Expression auf resezierten Melanomen Vorhersagewert für die spätere Entwicklung von Dünndarmmetastasen hat und damit auch für deren frühzeitige Entdeckung und Therapie bzw. Prävention (z. B. mittels eines CCR9-Antagonisten) verwendet werden könnte. Die Existenz von nicht-funktionalen CCR9-Rezeptoren auf Melanomzellen aus anderen Metastasenlokalisationen weist auf die Möglichkeit hin, dass die Expression und Erlangung der Funktionalität ein mehrschrittiger Prozess in der organspezifischen Metastasierung sein könnte. Zukünftig könnten diese Erkenntnisse möglicherweise zu einem etwaigen weiteren Angriffspunkt zur Beeinflussung des Metastasierungsverhaltens beim Melanom und anderen Tumoren werden.

5 Zusammenfassung

Chemokinrezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der organspezifischen Metastasierung von Tumorzellen. Tumorreaktive T-Zellen wurden bei Melanompatienten im peripheren Blut gefunden, sie können jedoch oft Tumorwachstum und Metastasierung nicht verhindern. Ziel dieser Arbeit war es, das Migrationspotential von Melanomzellen und tumorspezifischen T-Zellen besser zu verstehen, damit später Strategien entwickelt werden können, dies so zu manipulieren, dass klinisch effiziente T-Zellantworten gegen residuelle Tumorzellen resultieren oder, z. B. unter Verwendung von Chemokinrezeptorantagonisten, das Wachstum von Tumoren sowie die Bildung von Metastasen verhindert werden können.

Mittels funktioneller Durchflusszytometrie wurde die Expression und Funktion der Chemokinrezeptoren CCR9 und CXCR4 auf tumorspezifischen T-Zellen und Melanomzelllinien unterschiedlicher Herkunft untersucht. Für CXCR4 konnte in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden, dass dieser Rezeptor für das Homing-Verhalten von Tumorzellen ins Knochenmark, wo u. a. der CXCR4-Ligand SDF-1 α hoch exprimiert wird, eine bedeutsame Rolle spielt (GEMINDER). Die meisten Lymphozyten im peripheren Blut zeigen zwar eine Expression von CXCR4, funktionell aktiv ist dieser Rezeptor jedoch nur auf einer Subpopulation von T-Zellen (RABIN). In dieser Untersuchung konnte ein funktioneller CXCR4 auf melanomreaktiven T-Zellen eines Patienten nachgewiesen werden, was auf das Potential dieser Zellen, ins Knochenmark und in andere Kompartimente mit hohem Gehalt an SDF-1 α zu migrieren, hinweist. Der Chemokinrezeptor CCR9 ist der Rezeptor für das Chemokin „thymus expressed chemokine“ (TECK), ein Chemokin, welches selektiv im Dünndarm und Thymus exprimiert wird. Es konnte hier erstmals gezeigt werden, dass CCR9 in hohem Maße auf Melanomzelllinien exprimiert wird, welche aus dem Dünndarm stammen, aber auch auf einem Teil von Zelllinien anderen Ursprungs. Eine funktionelle Expression von CCR9 wurde jedoch nur auf Melanomzelllinien aus Dünndarmmetastasen nachgewiesen. Die Funktionalität wurde mittels Durchflusszytometrie über die Rezeptor-Internalisation und die Aktinpolymerisation, welche frühe Ereignisse der Migration sind, bestimmt. Die vorliegende Untersuchung zeigte, dass die aberrante funktionelle Expression eines Chemokinrezeptors mit der Metastasierung in ein bestimmtes Organ verbunden ist. Die Regulation der Rezeptor-Funktion scheint dabei ein kritischer Schritt im Metastasierungsprozess von malignen Tumoren zu sein.

Literaturverzeichnis

Allgayer H, Aguirre-Ghiso JA. The urokinase receptor (u-PAR)- a link between tumor cell dormancy and minimal residual disease in bone marrow? *APMIS* 2008;116(7-8):602-614.

Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, et al. Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12)-dependent migration and homing in multiple myeloma. *Blood* 2007;109(7):2708-2717.

Amara A, Gall SL, Schwartz O, et al. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* 1997;186(1):139-146.

Amersi FF, Terando AM, Goto Y, et al. Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. *Clin Cancer Res* 2008;14(3):638-645.

Andrian von UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343(14):1020-1034.

Arya M, Patel HRH, Williamson M. Chemokines: key players in cancer. *Curr Med Res Opin* 2003;19(6):557-564.

Asemissen A, Nagorsen D, Keilholz U, et al. Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN- γ for the quantification of antigen reactive T-cells. *J Immunol Methods* 2001;251(1-2):101-108.

Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, et al. High dose recombinant interleukin-2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 1999;17(7):2105-2116.

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;392(6676):565-568.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001;19(16):3622–3634.

Balestrieri ML, Balestrieri A, Mancini FP, Napoli C. Understanding the immunoangiostatic CXC chemokine network. *Cardiovasc Res* 2008;78(2):250-256.

Bar-Eli M. Role of Interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* 1999;67(1):12-18.

Bässler R, Dittmann AM, Dittrich M. Mononuclear stromal reactions in mammary carcinoma, with special reference to medullary carcinomas with a lymphoid infiltrate. Analysis of 108 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1981;393(1):75-91.

Ben-Baruch A. Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(4):345-356.

Bender GN, Maglinte DD, McLarney JH, Rex D, Kelvin FM. Malignant melanoma: Pattern of metastasis to the small bowel, reliability of imaging studies, and clinical relevance. *Am L Gastroenterol* 2001;96(8):2392-2400.

Blecker D, Abraham S, Furth EE, Kochman ML. Melanoma in the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol* 1999;94(12):3427-3433.

Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996;184(3):1101-1109.

Burchiel SW, Edwards BS, Kuckuck FW, et al. Analysis of free intracellular calcium by flow cytometry: Multiparameter and pharmacologic applications. *Methods*. 2000;21(3):221-230.

Burger M, Burger JA, Hoch RC, Oades Z, Takamori H, Schraufstatter IU. Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to

Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. J Immunol 1999;163(4):2017-2022.

Burnet FM. The concept of immunological surveillance. Prog Exp Tumor Res 1970;13:1-27.

Burns JM, Summers BC, Wang Y, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. J Exp Med 2006;203(9):2201-2213.

Camp BJ, Dyhrman ST, Memoli VA, Mott LA, Barth RJ Jr. In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. Ann Surg Oncol 1996;3(2):176-184.

Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. Science 1998;279(5349):381-384.

Cardones AR, Murakami T, Hwang ST. CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells *in vitro* and *in vivo* via β 1 integrin. Cancer Res 2003;63(20):6751-6757.

Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. Cancer 1997;79(12):2320-2328

D'Apuzzo M, Rolink A, Loetscher M, et al. The Chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. Eur J Immunol 1997;27(7):1788-1793.

DasGupta TK, Brasfield RD. Metastatic melanoma of the gastrointestinal tract. Arch Surg 1964;88:969-973.

Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. Mol Immunol 2002;39(9):531-536.

Dinter A, Berger EG. Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* 1998;109(5-6):571-590.

Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung, Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie 1909:117-164.

Engl T, Relja B, Marian D, et al. CXCR4 chemokine receptor mediates prostate tumor cell adhesion through $\alpha 5$ and $\beta 3$ integrins. *Neoplasia* 2006;8(4):290-301.

Fischer A, Malissen B. Natural and engineered disorders of lymphocyte development. *Science* 1998;280(5361):237-243.

Fishman D, Irena B, Kellman-Pressman S, Segal S. The role of MHC class 1 glycoproteins in the regulation of induction of cell death in immunocytes by malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(4):1740-1744.

Fodstad O, Faye R, Hoifodt HK, Skovlund E, Aamdal S. Immunobead-based detection and characterization of circulating tumor cells in melanoma patients. *Recent Results Cancer Res* 2001;158:40-50.

Gelmini S, Mangoni M, Castiglione F, et al. The CXCR4/CXCL12 axis in endometrial cancer. *Clin Exp Metastasis* 2009;26(3):261-268.

Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, et al. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *J Immunol* 2001;167(8):4747-4757.

Gill SS, Heuman DM, Mihas AA. Small intestinal neoplasms. *J Clin Gastroenterol* 2001;33(4):267-282.

González HE, Leiva A, Tobar H, et al. Altered chemokine receptor expression in papillary thyroid cancer. *Thyroid* 2009;19(9):957-965.

Hamlin IM. Possible host resistance in carcinoma of the breast: a histological study. *Br J Cancer* 1968;22(3):383-401.

Hernandez G, Arriba L, Jimenez C, et al. Rapid progression from oral leukoplakia to carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient. *Oral Oncol* 2003;39(1):87-90.

Hofmann UB, Westphal JR, Waas ET, Becker JC, Ruiter DJ, van Muijen GN. Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J Invest Dermatol* 2000;115(4):625-632.

Hom SS, Topalian SL, Simonis T, Mancini M, Rosenberg SA. Common Expression of melanoma tumor-associated antigens recognized by human tumor infiltrating lymphocytes: analysis by human lymphocyte antigen restriction. *J Immunother* 1991;10(3):153-164.

Hom SS, Schartzhuber DJ, Rosenberg SA, Topalian SL. Specific release of cytokines by lymphocytes infiltrating human melanomas in response to shared melanoma antigens. *J Immunother* 1993;13(1):18-30.

Honczarenko M, Douglas RS, Mathias C, Lee B, Ratajczak MZ, Silberstein LE. SDF-1 responsiveness does not correlate with CXCR4 expression levels of developing human bone marrow B cells. *Blood* 1999;94(9):2990-2998.

Hori T, Sakaida H, Sato A, et al. Detection and delineation of CXCR4 (fusin) as an entry and fusion cofactor for T-tropic (correction of T cell-tropic) HIV-1 by three different monoclonal antibodies. *J Immunol* 1998;160(1):180-188. (Erratum in *J Immunol* 1999;163(2):1092.)

Hosoe N, Miura S, Watanabe C, et al. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286(3):G458-G466.

Hwang ST. Chemokine receptors in melanoma: CCR9 has a potential role in metastasis to the small bowel. *J Invest Dermatol* 2004;122(3):xiv-xv.

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):521-530.

Ishikawa T, Nakashiro K, Hara S, Klosek SK, Li C, Shintani S, Hamakawa H. CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006;28(1):61-66.

IUIS/WHO subcommittee on chemokine nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Immunol Methods* 2002;262(1-2):1-3.

Jewett A, Head C, Cacalano NA. Emerging mechanisms of immunosuppression in oral cancers. *J Dent Res* 2006;85(12):1061-1073.

Jourdan P, Abbal C, Noraz N, et al. IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T-cells. *J Immunol* 1998;160(9):4153-4157.

Juarez J, Bradstock KF, Gottlieb DJ, Bendall LJ. Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *Leukemia* 2003;17(7):1294-1300.

Keogh PV, Fisher V, Flint SR. Resolution of oral non-Hodgkin's lymphoma by reduction of immunosuppressive therapy in a renal allograft recipient: a case report and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(6):697-701.

Kim CH, Broxmeyer HE. Chemokines: Signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 1999;65(1):6-15.

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):2744-2753.

Kim J, Mori T, Chen SL, et al. Chemokine receptor CXCR4 expression in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Ann Surg* 2006;244(1):113-120.

Kleinhans M, Tun-Kyi A, Gilliet M, et al. Functional expression of the eotaxin receptor CCR3 in CD30+ cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 2003;101(4):1487-1493.

Koch AE, Poverini PJ, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 1992;258(5209):1798-1801.

Kolenko V, Wang Q, Riedy MC, et al. Tumor-induced suppression of T-lymphocyte proliferation coincides with inhibition of Jak 3 expression and IL-2 receptor signaling: role of soluble products from human renal cell carcinomas. *J Immunol* 1997;159(6):3057-3067.

Kunkel EJ, Campbell JJ, Haraldsen G, et al. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med* 2000;192(5):761-768.

Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, et al. High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer* 2000;87(5):659-664.

Levine AM. Lymphoma complicating immunodeficiency disorders. *Ann Oncol* 1994;5 Suppl 2:29-35.

Ludwig G, Jentzsch R, Nuri M. Spontanremissionen von Lungenmetastasen beim Hypernephrom: Fallbeschreibung und Literaturübersicht. *Med Klin* 1977;72(49):2118-2121.

Lusso P. HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J* 2006;25(3):447-456.

Mackensen A, Carcelain G, Viel S, et al. Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma. *J Clin Invest* 1994;93(4):1397-1402.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, et al. L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992;13(7):265-270.

Maréchal R, Demetter P, Nagy N, et al. High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2009;100(9):1444-1451.

Miao Z, Luker KE, Summers BC, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(40):15735-15740.

Mitra P, De A, Ethier MF, et al. Loss of chemokine SDF-1 α -mediated CXCR4 signalling and receptor internalisation in human hepatoma cell line HepG2. *Cell Signal* 2001;13(5):311-319.

Moore JP, Kitchen SG, Pugach P, Zack JA: The CCR5 and CXCR4 coreceptors – central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection, *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;20(1):111-126.

Moore MA. The role of chemoattraction in cancer metastases. *Bioessays* 2001;23(8):674-676.

Mould AP, Askari JA, Craig SE, Garrat AN, Clements J, Humphries MJ. Integrin alpha 4 beta 1-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced IIIICS region of fibronectin. *J Biol Chem* 1994;269(44):27224-27230.

Müller 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;62:7328-7334.

Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* 2001;345(11):833-835.

Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Science USA* 1994;91(6):2305-2309.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382(6592):635-638.

Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002;283(1):R7-R28.

Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889;1:571-573.

Papadakis KA, Prehn J, Moreno ST, et al. CCR9-positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;121(2):246-254.

Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, et al. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004;173(6):3844-3854.

Rabin RL, Park MK, Liao F, Swofford R, Stephany D, Farber JM. Chemokine receptor responses on T-cells are achieved through regulation of both receptor expression and signaling. *J Immunol* 1999;162(7):3840-3850.

Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, Ondrey F. NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect Prev* 2005;29(1):42-45.

Robledo MM, Bartolomé RA, Longo N, et al. Expression of functional chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 on human melanoma cells. *J Biol Chem* 2001;276(48):45098-45105.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-242.

Rubin JB, Kung AL, Klein RS, et al. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(23):13513-13518.

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000;18:593-620.

Saruta M, Yu QT, Avanesyan A, Fleshner PR, Targan SR, Papadakis KA. Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *J Immunol* 2007;178(5):3293-3300.

Sarzotti M. Immunologic tolerance. *Curr Opin Hematol* 1997;4(1):48-52.

Scala S, Ottaiano A, Ascierto PA, et al. Expression of CXCR4 predicts poor prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(5):1835-1841.

Scala S, Giuliano P, Ascierto PA, et al. Human melanoma metastases express functional CXCR4. *Clin Cancer Res* 2006;12(8):2427-2433.

Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol* 1993;151(5):2667-2675.

Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(13):7737-7742.

Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2002;62(20):5930-5938.

Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, et al. Chemokine receptor expression and function in CD4⁺ T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol* 2001;166(2):996-1002.

Sedelmayr R, Rabinowich H, Elder EM, et al. Depressed ability of Patients with melanoma or renal cell carcinoma to generate adherent lymphokine-activated killer cells. *J Immunother* 1991;10(5):336-346.

Singh S, Singh UP, Stiles JK, Grizzle WE, Lillard JW Jr. Expression and functional role of CCR9 in prostate cancer cell migration and invasion. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8743-8750.

Snyder EL, Saenz CC, Denicourt C, et al. Enhanced targeting and killing of tumor cells expressing the CXC chemokine receptor 4 by transducible anticancer peptides. *Cancer Res* 2005;65(23):10646-10650.

Starzl TE, Nalesnik MA, Porter KA, et al. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet* 1984;1(8377):583-587.

Stenstad H, Ericsson A, Johansson-Lindbom B, et al. Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4⁺ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood* 2006;107(9):3447-3454.

Strahm B, Durbin AD, Sexsmith E, Malkin D. The CXCR4-SDF1alpha axis is a critical mediator of rhabdomyosarcoma metastatic signaling induced by bone marrow stroma. *Clin Exp Metastasis* 2008;25(1):1-10.

Su L, Zhang J, Xu H, et al. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005;11(23):8273-8280.

Sun W, Schuchter LM. Metastatic melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 2001;2(3):193-202.

Svensson M, Marsal J, Ericsson A, et al. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alphabeta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest* 2002;110(8):1113-1121.

Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393(6685):591-594.

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):1832-1837.

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.

Uehara S, Hayes SM, Li L, et al. Premature expression of chemokine receptor CCR9 impairs T cell development. *J Immunol* 2006;176(1):75-84.

Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, et al. Circulating tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity, *Cancer Res* 2002;62(6):1743-1750.

Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA, et al. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 1997;7(2):291-301.

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):755-761.

Ward SG, Bacon K, Westwick J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 1998;9(1):1-11.

Wendland M, Czeloth N, Mach N, et al. CCR9 is a homing receptor for plasmacytoid dendritic cells to the small intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(15):6347-6352.

Wiley HE, Gonzalez 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):1638-1643.

Wurbel MA, Philippe JM, Nguyen C, et al. The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur J Immunol* 2000;30(1):262-271.

Yang SC, Hillinger S, Riedl K, et al. Intratumoral administration of dendritic cells overexpressing CCL21 generates systemic antitumor responses and confers tumor immunity. *Clin Cancer Res* 2004;10(8):2891-2901.

Youn B-S, Kim CH, Smith FO, Broxmeyer HE. TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood* 1999;94(7):2533-2536.

Youn B-S, Young JK, Mantel C, Yu K-Y, Broxmeyer HE. Blocking of c-FLIP-independent cycloheximide-induced apoptosis or Fas-mediated apoptosis by the CC chemokine receptor 9/TECK interaction. *Blood* 2001;98(4):925-933.

Yoshimura T, Matsushima K, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolisaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1). *J Immunol* 1987;139(3):788-793.

Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* 1999;190(9):1241-1256.

Zea AH, Curti BD, Longo DL, et al. Alterations in T cell receptor and signal transduction molecules in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1995;11(1):1327-1335.

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):3833-3839.

Zhang T, Somasundaram R, Berencsi K, et al. CXC chemokine ligand 12 (stromal cell-derived factor 1 alpha) and CXCR4-dependent migration of CTLs toward melanoma cells in organotypic culture. *J Immunol* 2005;174(9):5856-5863.

Zhang T, Somasundaram R, Berking C, et al. Preferential involvement of CX chemokine receptor 4 and CX chemokine ligand 12 in T-cell migration toward melanoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(10):1304-1312.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12(2):121-127.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Veröffentlichungen

Letsch A, Keilholz U, Assfalg G, Mailänder V, Thiel E, Scheibenbogen C. Bone marrow contains melanoma-reactive CD8+ effector T cells and, compared with peripheral blood, enriched numbers of melanoma-reactive CD8+ memory T cells. *Cancer Res* 2003;63(17):5582-5586.

Letsch A, Keilholz U, Schadendorf D, Assfalg G, Asemissen AM, Thiel E, Scheibenbogen C. Functional CCR9 expression is associated with small intestinal metastasis. *J Invest Dermatol* 2004;122(3):685-690.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Carmen Scheibenbogen für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die engagierte Betreuung, Unterstützung und Geduld bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Eckhard Thiel als Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie sei für die guten Forschungsbedingungen gedankt, die diese Arbeit ermöglichten.

Für die freundliche und hilfreiche Einarbeitung und Betreuung, die vielen lustigen Tage, Abende und Wochenenden im Labor, die guten Ideen und aufbauenden Worte und Taten danke ich ganz besonders Frau Dr. med. Anne Letsch.

Bei Frau Sandra Bauer möchte ich mich für die praktischen Hinweise und Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente, für die Korrekturen des Material- und Methodenteils, für die Befüllung der Smiley-Dose und für die nette Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken.

Meinen Freunden sei gedankt für ihre Nachsicht und Ermunterung während der Entstehung dieser Arbeit, besonderer Dank gilt hierbei meinem Ehemann Dr. Frank Lerch für den tatkräftigen Beistand zur Fertigstellung dieser Arbeit und Frau Dr. med. Olivia Oswald für die Korrekturen.

An letzter und besonderer Stelle möchte ich meinen Eltern für die liebevolle und unermüdliche Unterstützung danken.

Erklärung

Ich, Geraldine Anna Maria Lerch, geb. Assfalg, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Expression und Funktionalität der Chemokinrezeptoren CCR9 und CXCR4 auf Melanomzelllinien und melanomreaktiven T-Zellen** 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.