

Aus dem
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Abteilung Tumor- und Immungenetik
Direktor: Professor Dr. W. Birchmeier

Habilitationsschrift

**Regulatorische Mechanismen der Lymphozyten-Migration
in der Homöostase und Immunpathologie**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Immunologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Uta Elisabeth Höpken
geboren am 10.03.1964 in Hagen

Eingereicht am: November 2007
Dekan: Professor Dr. med. M. Paul
1. Gutachter: Prof. Dr. B. Seliger/ Halle Saale
2. Gutachter: Prof. Dr. Ch. Weber/ Aachen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Wanderung der Leukozyten.....	4
1.2	Das Chemokin/Chemokinrezeptorsystem.....	6
1.3	Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der homöostatischen Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5.....	10
1.4	Zielsetzung und Fragestellung.....	14
2	Eigene Arbeiten	16
2.1	Die Rolle von CCR7 und CXCR5 in der lymphozytären Homöostase und in der Entwicklung adaptiver Immunantworten.....	16
2.1.1	CCR7-Defizienz verursacht die Ausbildung ektopischer lymphoider Follikel sowie eine gestörte zelluläre Organisation viszeralen Gewebes in der Magenmukosa.....	16
2.1.2	Kooperative und getrennte Funktionen der beiden Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 in der Rekrutierung nicht-klassischer B-1 B Zellen und in der Entwicklung einer frühen Immunantwort gegen bakterielle Pathogene.....	27
2.1.3	Der Chemokinrezeptor CCR7 reguliert die in Lymphknoten-induzierte zytotoxische T-Zell-Immunantwort gegen Alloantigene.....	38
2.1.4	Die CCR7-abhängige Induktion von T-Zellantworten während einer bakteriellen Infektion ist in verschiedenen T-Zellsubpopulationen unterschiedlich ausgeprägt.....	49
2.1.5	Die Rolle von CCR7 in der Migration und funktionellen Aktivität von naiven und Effektor/Memory-ähnlichen regulatorischen T-Zellsubpopulationen.....	61
2.2	Molekulare Mechanismen der Immunmodulation durch den Zytomegalievirus-kodierten Chemokinrezeptor US28.....	71
2.3	Die Bedeutung homöostatischer Chemokinrezeptoren für immunpathologische Prozesse bei chronischen Entzündungen und Tumorerkrankungen.....	79
2.3.1	Die CXCR5-abhängige Entwicklung Antigen-spezifischer lymphoider Neo-Organogenese in einem chronischen Modell der Rheumatoiden Arthritis.....	79
2.3.2	Überexpression des Chemokinrezeptors CCR7 im klassischen Morbus Hodgkin, aber nicht in der Lymphozyten-reichen Form korreliert mit der spezifischen Lokalisation neoplastischer Zellen innerhalb der sekundären lymphatischen Organe.....	93

3	Diskussion.....	102
3.1	CCR7- und CXCR5-abhängige Funktionen in der homöostatischen lymphozytären Rezirkulation und in der Entwicklung adaptiver Immunantworten.....	102
3.2	Herpesvirus-kodierte Chemokinrezeptoren.....	108
3.3	Die immunpathologische Bedeutung homöostatischer Chemokinrezeptoren in chronischen Entzündungen und bei Tumorerkrankungen.....	110
4	Zusammenfassung.....	115
5	Literatur.....	118
6	Abkürzungsverzeichnis.....	125
7	Danksagung.....	127
8	Genehmigungen.....	129

1 Einleitung

Jeden Tag muß sich der menschliche Organismus mit seiner mikrobiellen Umgebung auseinandersetzen und mit ihr einen Gleichgewichtszustand aufrechterhalten, der über Gesundheit und Krankheit entscheidet. Das Immunsystem, ein komplexes Netzwerk aus Organen, Zelltypen und löslichen Proteinen, dient zur Ausschaltung eindringender Krankheitserreger und Fremdstoffen. Ein Teil des Immunsystems ist bereits bei der Geburt voll ausgebildet und stellt die erste Abwehrfront gegen ein weites Spektrum von Mikroorganismen dar, ist also unspezifisch. Die unspezifische Immunität setzt sich hauptsächlich aus Phagozyten, Blutproteinen wie dem Komplementsystem, sowie natürlichen Killerzellen zusammen und wird innerhalb von Stunden in Gang gesetzt. Mikroorganismen, die die unspezifische Immunantwort zu umgehen vermögen, stoßen auf ein zweites Überwachungssystem, das spezifische oder erworbene Immunsystem. Die spezifische Immunabwehr ist in der Lage ihre Reaktion der besonderen Natur der Krankheitserreger anzupassen und diese nach wiederholtem Befall des Körpers wiederzuerkennen. Die erfolgreiche Abwehr und Vernichtung infektiöser Partikel oder entarteter Zellen wird hauptsächlich von den T- und B-Zellen, sowie von den durch B-Lymphozyten produzierten löslichen Antikörpern gewährleistet. Weiterhin verfügen die Zellen der spezifischen Immunabwehr über die Fähigkeit, körpereigene Komponenten von körperfremden oder tumorösem Material zu unterscheiden und verhindern so, dass körpereigene Zellen angegriffen werden. Fehlregulationen führen entweder zu einer spezifischen Nichtreaktivität gegenüber körperfremden Antigenen mit fatalen gesundheitlichen Folgen, oder zum Angriff und Zerstörung körpereigener Strukturen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen (1).

1.1 Wanderung der Leukozyten

Alle Blutleukozyten sind zur chemotaktischen Wanderung fähig und zirkulieren auf der Suche nach eingedrungenen Mikroorganismen oder Tumorzellen kontinuierlich durch fast alle Kompartimente des Körpers. In Abhängigkeit von der Art und der Konzentration der chemotaktisch wirkenden Stoffe unterscheidet sich das Migrationsverhalten unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen (Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten oder Lymphozyten) (2). Neutrophile Granulozyten sind kurzlebige Effektorzellen und ihre Hauptfunktion besteht in der schnellen Abwehr und Eliminierung eingedrungener Mikroorganismen. Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen bewirken die Anheftung der Immunzellen an die Gefäßwand und deren Auswanderung in entzündliches Gewebe.

Monozyten üben ebenfalls eine wichtige Funktion in der unspezifischen Immunabwehr aus, indem sie Mikroorganismen phagozytieren und intrazellulär abtöten. Weiterhin sind sie in der Lage, Fremdartigen in Assoziation mit MHC Klasse-I- und Klasse II-Molekülen den T-Lymphozyten darzubieten, eine wichtige Voraussetzung für die Induktion der spezifischen Immunantwort. Die zentralen und wichtigsten Zellen der spezifischen Immunabwehr werden aber durch die Lymphozyten (T- und B-Zellen) repräsentiert. Ihre einzigartige Bedeutung liegt vor allem in der spezifischen Erkennung von Antigenen und der Auslösung einer gerichteten Immunantwort.

Während die neutrophilen Granulozyten und die Monozyten den Blutstrom durch die von Infektion oder Trauma veränderte Gefäßwand verlassen, durchwandern die Lymphozyten auch normales, nicht-entzündliches Gewebe. Die langlebigen Lymphozyten rezirkulieren täglich ein- bis zweimal aus dem Blut in das sekundäre lymphatische Gewebe und zurück. Dieser Prozess wird durch die Fähigkeit ermöglicht, sich über Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen anzulagern. Interessanterweise lassen sich unterschiedliche und gewebeabhängige Muster der Rezirkulation von B- oder T-Lymphozyten und von naiven oder Memory-/Effektorzellen beobachten (2-4). Naive B- und T-Zellen wandern aus dem Gefäßsystem vorwiegend über postkapilläre Venolen, deren spezialisierte Endothelien als hohe endotheliale Venolen (HEV) bezeichnet werden, in sekundäre lymphatische Organe ein. Memory-Zellen verlassen dagegen den Blutstrom über postkapilläre Venolen, migrieren durch nicht-lymphoides Gewebe und kehren über afferente Lymphgefäße in den Lymphknoten zurück (5).

Die selektive Steuerung dieser Organ- und Differenzierungs-spezifischen Wanderung wird durch spezifische Oberflächenrezeptoren gesteuert. Die Identifizierung unterschiedlicher Proteinfamilien und Charakterisierung ihrer Bedeutung für das Migrationsgeschehen resultierte in dem nachfolgendem **Vier-Stufen-Modell der Lymphozyten-Migration** (6-7):

Im ersten Schritt der Extravasation vermittelt die Familie der Selektine und das α_4 -Integrin aktivierungsunabhängig eine reversible Bindung der vorbeiströmenden Lymphozyten an das Endothel (primäre Adhäsion; Rollen). Der zweite Schritt der Kaskade besteht in der von Chemokinen induzierten Aktivierung von Integrinen. Die Aktivierung der G-Proteingekoppelten-Chemokinrezeptoren durch ihre Chemokin-Liganden führt zu einer Konformations- und Affinitätsänderung der Integrine, welches ein festes Anbinden der Lymphozyten an die Gefäßwand ermöglicht (Schritt 3). Die feste Bindung der Lymphozyten an die Endothelien über deren Liganden (z.B. VCAM-1, ICAM oder Fibronectin) ist die

Voraussetzung für die nachfolgende transendotheliale Migration (Diapedese; Schritt 4), an der neben den Adhäsionsrezeptoren ICAM-1/-2 ebenso α_4 - und β_2 -Integrine beteiligt sind (8). An der Wanderung der Lymphozyten innerhalb der verschiedenen Kompartimente sekundärer lymphatischer Gewebe, wie den periarteriellen lymphatischen Scheiden (PALS), den extrafollikulären Foci und den Primär- und Sekundärfollikeln, ist das Chemokin/Chemokinrezeptorsystem ebenfalls beteiligt (7).

1.2 Das Chemokin/Chemokinrezeptorsystem

Neben den klassischen, chemoattraktiv wirkenden Molekülen, wie N-formylierte Peptide (fMLP) und das Anaphylatoxin C5a, hat man in den letzten 20 Jahren eine Vielzahl von Chemokinen isoliert und ihre Bedeutung als die neuen Botenstoffe der Immunabwehr charakterisiert. Die als Chemokine bezeichneten *chemotaktischen Zytokine* umfassen gegenwärtig eine Gruppe von über 50 humanen Chemokinen mit ihren 20 Rezeptoren. Die durch verschiedenste Zellen freigesetzten Chemokine bestehen aus etwa 70 bis 130 Aminosäuren und aktivieren die Leukozyten durch spezifische Oberflächenrezeptoren, die zur Superfamilie der **G-Protein gekoppelten Rezeptoren** (GPCR) gehören (9, 10).

Diese Rezeptoren binden über intrazelluläre Bereiche an heterotrimere G-Proteine und besitzen alle einen extrazellulären Amino- und einen intrazellulären Carboxyterminus, sowie sieben α -helikale Transmembrandomänen. Die Bindung der Liganden erfolgt ausschließlich über extrazellulär lokalisierte Domänen, und die Aktivierung zellulärer Signalwege wird durch heterotrimere G Proteine vermittelt. Neben der direkten Aktivierung von G-Protein-Effektoren, wie z.B. den G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs), 'second messenger' regulierte Proteinkinasen oder den Arrestinen, können eine große Anzahl indirekt aktivierter Moleküle aus verschiedenen Signalwegen aktiviert werden (11, 12). Diese führen im Allgemeinen zur transkriptionellen Aktivierung von Genen, die entweder die Aktivierung und Proliferation von Zellen oder die Zellmigration regulieren. Die durch Chemokine induzierte Chemotaxis ist die Folge einer Reorganisation des Aktinnetzes, welche über die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) γ , die Rho-Familie kleiner GTPasen und die Fokalen Adhäsionskinasen FAK und Pyk-2 vermittelt wird (13, 14). An der Vermittlung von proliferativen Signalen durch Chemokinrezeptoren sind die PI3K γ , die Phospholipase (PLC)- β und ihre Effektoren, sowie die Proteinkinase B (PKB/Akt) und C (PKC) beteiligt. Letztere aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der an der Regulation der Zellproliferation, Schutz vor Apoptose und der Transkriptionsregulation immunregulatorischer Moleküle entscheidend mitwirkt (15-17). Weitere Signalproteine, die die Zellproliferation induzieren

können, sind die Mitglieder der Mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Familie, extrazellulär regulierte Kinasen (ERK)-1/2, c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und p38 (18). Die Regulation der GPCR-Aktivität wird durch Mechanismen der sogenannten Desensitivierung und Resensitivierung gesteuert. Die Phosphorylierung zytoplasmatischer Serine und Threonine des Carboxyterminus durch 'second messenger'-regulierte Kinasen, GRKs, sowie die Bindung von Arrestinen steuert die Desensitivierung und Internalisierung von Chemokinrezeptoren nach Ligandenbindung (19, 20).

Die Chemokine können auf Grund der Anordnung ihrer ersten beiden Cysteinreste im Aminoterminus strukturell in vier Familien unterteilt werden: CXC-(α), CC-(β), C(γ) und CX₃CL1(δ). In der CC-(β)-Familie liegen die ersten beiden Cysteinreste direkt nebeneinander, bei den CXC-(α -) Chemokinen sind sie durch eine beliebige Aminosäure getrennt und bei CX₃CL1 (δ -Chemokin) durch drei Aminosäuren getrennt. Die XCL-(γ)-Chemokine besitzen nur einen der zwei konservierten Cysteinreste. Alle Chemokinrezeptoren sind spezifisch für Liganden aus einer der vier Chemokin-Familien und werden als CCR1-11, für die CC-Chemokin-bindenden Rezeptoren 1-11, oder entsprechend als CXCR1-6, CX₃CR1 oder XCR1 bezeichnet (21). Die Chemokinliganden werden in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert, darunter Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Fibroblasten, Stromazellen, Epithelzellen, Keratinozyten, Chondrozyten, Mesangialzellen, T-Zellen und glatte Muskelzellen (22-23). Chemokinrezeptoren werden in erster Linie auf hämatopoetischen Zellen, aber auch auf anderen Zelltypen, wie Endothel-, Epithelzellen und Neuronen, exprimiert.

Neben der rein strukturellen Unterscheidung der Chemokine und ihrer Rezeptoren bietet sich auch eine Einteilung nach funktioneller Expression - induzierbar oder konstitutiv- an. Auf der einen Seite stehen die sogenannten inflammatorischen Chemokine, wie z. B. IL-8, die durch entzündliche Stimuli induziert werden und die für die Rekrutierung von Zellen bei akuten Entzündungsreaktionen verantwortlich sind (25). Auf der anderen Seite existieren die sogenannten homöostatischen Chemokine, wie z. B. SDF-1 α (CXCL12), BLC (CXCL13), ELC (CCL19) und SLC (CCL21), die im Knochenmark, Thymus und den sekundären lymphatischen Organen gebildet werden und die für die Entwicklung und funktionelle Organisation der sekundären lymphatischen Organe verantwortlich sind. Damit steuern diese Chemokine das Zusammentreffen von Lymphozyten und dendritischen Zellen in den entsprechenden Geweben (23, 26, 27) (Abbildung 1; modifiziert nach Luster, 2002; (23); Seite 8).

Entscheidende regulatorische Funktionen übt dabei neben dem Chemokin-System auch das Lymphotoxin/TNF-System aus. In jüngster Zeit beginnt man zu verstehen, dass offensichtlich die gleichen Moleküle auch eine ektopische lymphoide Neogenese steuern, wie sie für viele chronisch entzündliche oder Autoimmunerkrankungen charakteristisch ist. Eine wesentliche Rolle könnte dabei die induzierte Expression inflammatorischer und homöostatischer Chemokine in Stroma- oder Endothelzellen spielen, weil sie das Einwandern von Lymphozyten und Effektorzellen steuern. Chemokine und Chemokinrezeptoren könnten deshalb die molekularen Schalter darstellen, die den Übergang von akuten zu chronisch inflammatorischen Erkrankungen regulieren. Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Expression einzelner oder mehrerer Chemokinrezeptoren geeignete Oberflächenmarker darstellen, um unterschiedliche Subpopulationen von Immunzellen zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Dies gilt insbesondere für die bisher nur eingeschränkt mögliche Unterscheidung von CD4⁺- und CD8⁺-positiven Gedächtnis-, Effektor- und Helfer-T-Zellen (28-30).

Besonderes Interesse erlangten die Chemokine und ihre Rezeptoren bei viralen Erkrankungen. Einige Chemokinrezeptoren, wie z.B. CCR5 und CXCR4, sind neben CD4 notwendige Ko-Rezeptoren für eine Infektion von Monozyten und CD4⁺ T-Zellen mit dem 'human immunodeficiency virus' (HIV). Chemokine, die an diese Rezeptoren binden, können die Infektion der Zellen mit diesem Virus inhibieren. Darüber hinaus sind Viren bekannt, die Gene für Chemokin- oder Chemokinrezeptor-Homologe oder für Inhibitoren von Chemokin-vermittelter Signaltransduktion kodieren. Viral-kodierte Chemokin-Homologe können als Agonisten oder Antagonisten für endogene Chemokinrezeptoren des Wirtes wirken und, wie z.B. das MCK-1 Molekül des murinen Zytomegalievirus (CMV) und das vCXC-1 des humanen Zytomegalievirus (HCMV), die Virusausbreitung unterstützen (31-32). Poxviren kodieren für verschiedene Proteine, die wie z.B. das Protein 'viral chemokine inhibitor' (vCCI), welches mit hoher Affinität viele Chemokine bindet, auch *in vivo* die Wirkung von Chemokinen inhibieren können (33). Herpesviren kodieren für eine Reihe von Chemokinrezeptor-Homologen, die die Chemokine ihrer Wirte binden und die Chemotaxis und Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden vermitteln. Der vom HCMV-kodierte US28-Rezeptor kann, ähnlich wie die endogenen Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4, als Ko-Rezeptor für HIV dienen und somit vermutlich den Verlauf einer AIDS-Erkrankung beeinflussen. Ferner verstärkt US28 die Zellfusion und ist in der Lage, inflammatorische Chemokine aus der Umgebung infizierter Zellen zu entfernen. Durch die Beseitigung der

inflammatorischen Chemokine verhindert US28 die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort einer viralen Infektion, eine für viral-kodierte GPCRs einzigartige Eigenschaft, die menschliche Immunantwort zu manipulieren (34, 35).

Die herausragende Bedeutung von Chemokinen und ihren Rezeptoren in zahlreichen Erkrankungen haben sie zu vielversprechenden pharmakologischen Zielmolekülen für therapeutische Interventionen gemacht. Erste Rezeptorantagonisten für die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 sind z.B. bereits als Arzneimittel bei der Behandlung von HIV-Patienten im klinischen Einsatz (36). Aber auch über die Implikation für die AIDS-Krankheit hinaus besteht berechtigte Hoffnung, Chemokin-Rezeptorinhibitoren für häufige Erkrankungen therapeutisch einsetzen zu können.

1.3 Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der homöostatischen Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5

Durch die Analyse transgener Tiermodelle konnten erstmals direkte Nachweise erbracht werden, dass das Chemokin/Chemokinrezeptorsystem eine wichtige Funktion für die Verteilung und Wanderung von Lymphozyten durch den Organismus hat, und zwar nicht nur unter entzündlichen, sondern auch unter homöostatischen Bedingungen. Die homöostatischen Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 und ihre Chemokin-Liganden steuern die Einwanderung und Positionierung von naiven und Memory-T-Zellen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen und sind damit an der Morphogenese und Funktionalität lymphatischer Organe entscheidend beteiligt. Das Zusammentreffen naiver Lymphozyten und Antigen-präsentierender Zellen in der T-Zellzone sekundärer lymphatischer Organe ist weiterhin eine wichtige Voraussetzung für die Induktion einer adaptiven Immunantwort.

In CXCR5-defizienten Mäusen ist die Entwicklung einiger Lymphknoten, z.B. der inguinalen und axillären Lymphknoten, gestört, während die mesenterialen Lymphknoten normal entwickelt sind. Weiterhin zeigen diese Mäuse keine oder eine schwerwiegend gestörte Ausbildung der Peyerschen Platten (PP) sowie eine veränderte Entwicklung von primären und sekundären Lymphfollikeln in der Milz. Der Defekt in den lymphatischen Organen konnte auf eine gestörte Lymphozyten-Migration zurückgeführt werden (37, 38).

In CCR7-defizienten Mäusen ist die Anzahl der T-Zellen und dendritischen Zellen (DC) in allen sekundären lymphatischen Organen stark reduziert. Mittels Transferexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Einwanderung CCR7-defizienter T- und B-Lymphozyten in die

Lymphknoten, PP und in die PALS der Milz gestört ist. Nach Immunisierung entwickelten CCR7-defiziente Tiere eine verzögerte Antikörperantwort und zeigten keine *delayed type hypersensitivity* (DTH)-Antwort. Indem der Chemokinrezeptor CCR7 das Einwandern von T- und B-Lymphozyten sowie dendritischen Zellen in die sekundären lymphatischen Organe steuert, ist er essentiell an dem Aufbau der sogenannten T-Zellzone beteiligt und für die Induktion einer primären T- und B-Zell-Immunantwort verantwortlich (39).

Darüber hinaus sind die homöostatischen Chemokine und ihre Rezeptoren im Zusammenspiel mit dem Lymphotoxin/Tumor-Nekrose Faktor (TNF)-System maßgeblich an der Entwicklung und funktionellen Organisation sekundärer lymphatischer Organe beteiligt (Abbildung 2; modifiziert nach Müller und Lipp, 2003; (40); Seite 11).

Die initiale Phase der lymphoiden Organogenese von Lymphknoten und PP ist durch die Aggregation von hämatopoetischen Vorläuferzellen, den *lymphoid tissue inducer* (LTi) Zellen (CD3⁻CD4⁺IL7R α ⁺CXCR5⁺), und mesenchymalen Zellen, den *lymphoid tissue organizer* (LTo) Zellen (VCAM-1⁺ICAM-1⁺MAdCAM-1⁺LT β R⁺), charakterisiert. Initial wird auf den LTis durch IL-7 und TRANCE die Expression von Lymphotoxin (LT) α 4 β 1-Integrinen induziert. Die Stimulation des LT β R auf mesenchymalen *organizer* Zellen durch LT α 4 β 1 induziert sowohl die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und ICAM-1, als auch die Expression der Chemokine CXCL13, CCL19 und CCL21. Die homöostatischen Chemokine tragen zur Verstärkung der Interaktionen von LTi und LTo Zellen bei, wodurch eine kontinuierliche Signalgebung über LT β R und eine daraus resultierende fortlaufende Produktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen induziert wird (40, 41). Zudem führt die Freisetzung von CXCL13 zu einem vermehrten Einwandern weiterer CD3⁻CD4⁺CXCR5⁺-Vorläufer-Zellen. Später wird durch die LT β R-vermittelte Induktion der CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 das Einwandern von reifen T- und B-Zellen induziert. Erreichen die zellulären Aggregate eine kritische Größe, beginnt die Ausbildung von spezialisierten hohen endothelialen Venolen (HEV), die die Immigration von Lymphozyten erlauben und die anschließende Ausbildung der typischen Mikroarchitektur sekundärer lymphatischer Organe unterstützen (42). Die systematische phänotypische Analyse der homöostatischen Chemokin/Chemokinrezeptor-defizienten Mäuse hat entscheidend zum heutigen Verständnis der lymphoiden Organogenese beigetragen und unterstreicht die essentielle Bedeutung dieser Moleküle für die Entwicklung lymphoider Strukturen.

In jüngster Zeit beginnt man zu verstehen, dass offensichtlich die gleichen Moleküle auch die ektopische lymphoide Neogenese, wie sie für viele chronische Entzündungen charakteristisch ist, steuern. So konnte die Expression von homöostatischen Chemokinen und dem LT β mit der Ausbildung ektopischer Follikel in chronisch-entzündlichen Geweben von Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom oder *Helicobacter pylori*-induziertem Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe (MALT) korreliert werden (43-46). In experimentellen Studien in Mäusen induzierte die ektopische Expression von CXCL13, CCL19 und CCL21 in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse, sowie die transgene Expression von CCL21 in der Schilddrüse die Neogenese eines organisierten lymphatischen Gewebes mit getrennten T- und B- Zell-Bereichen (47-49). Sowohl CXCL13 als auch CCL21 werden außerdem in experimentell induziertem Bronchien-assoziierten lymphoiden Gewebe (BALT) der Lunge exprimiert (50).

Insgesamt verdeutlichen die bisherigen Untersuchungen, dass homöostatische Chemokine und ihre Chemokinrezeptoren entscheidende physiologische Funktionen in der adaptiven Immunantwort sowie in der Entwicklung und funktionellen Organisation sekundärer lymphatischer Organe steuern.

In den letzten Jahren wird zunehmend eine Rolle homöostatischer Chemokine/Chemokinrezeptoren in der Tumordissemination und Tumorlokalisierung diskutiert. Die Expression von CXCR5 ist bislang hauptsächlich auf malignen B-Zellen in *non*-Hodgkin-Lymphomen und Leukämien detektierbar, während CCR7 auf verschiedenen soliden Tumoren, Lymphomen und leukämischen Zellen exprimiert wird und für die Metastasierung von Tumorzellen wichtig zu sein scheint (51). Durch die Beteiligung dieser Rezeptoren an der Pathogenese von Tumorerkrankungen erlangen CXCR5 und CCR7 eine wichtige diagnostische und potentiell therapeutische Bedeutung.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Die Rezirkulation von Lymphozyten und der Prozess des zielgerichteten Einwanderns in spezialisierte Kompartimente innerhalb der sekundären lymphatischen Organe ist eine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung einer effektiven adaptiven Immunantwort nach einer Infektion oder Entzündung. Die hier beschriebenen Studien hatten zum Ziel, die Funktion homöostatischer und viral-kodierter Chemokine und deren Rezeptoren unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen *in vitro* und in präklinischen Tiermodellen näher zu charakterisieren.

Eine regulierte lymphozytäre Rezirkulation durch lymphoide Strukturen und durch peripheres Gewebe ist nicht nur für die Entwicklung einer effektiven Immunantwort, sondern auch unter homöostatischen Bedingungen erforderlich. Letzterer Prozess spielt eine besondere Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von peripherer Toleranz und ist im Hinblick auf eine Beteiligung des Chemokin/Chemokinrezeptorsystems weit weniger gut untersucht. Es sollte daher untersucht werden, ob die Expression homöostatischer Chemokinrezeptoren für die lymphozytäre Rezirkulation durch peripheres Gewebe unter homöostatischen Bedingungen eine Rolle spielt. Hierzu standen mir CXCR5- und CCR7-defiziente Mausmodelle zur Verfügung, die bereits wichtige Erkenntnisse zur Lymphozytenwanderung und Lokalisation in sekundären lymphatischen Organen geliefert haben.

Die bisherigen *in vivo* Untersuchungen zur Entwicklung einer adaptiven Immunantwort in den CXCR5^{-/-} und CCR7^{-/-} Mäusen deuteten bereits auf einen entscheidenden Einfluss beider Chemokinrezeptoren für die Induktion T- und B-Zell-regulierter Immunantworten hin. Mittels bakterieller Infektionsmodelle und einem allogenen Transplantationsmodell sollte der direkte Effekt homöostatischer Chemokine auf Antigen-spezifische B-Zell- und T-Zellantworten untersucht werden.

Viral-kodierte Chemokinrezeptoren sind eine der vielfältigen und faszinierenden Strategien, die von Herpesviren entwickelt wurden, um die Immunantwort des Wirts zu unterwandern. Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen der Immunmodulation durch den humanen Zytomegalievirus-kodierten Chemokinrezeptor US28. Unter Verwendung von selbst hergestellten monoklonalen Antikörpern gegen US28 sollte die zelluläre Lokalisation und molekulare Funktionalität von US28 in Überexpressionssystemen in Zelllinien und in HCMV-infizierten nativen Zellen näher untersucht werden. Die vorliegenden Untersuchungen ermöglichten die

Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen des viral-kodierten Rezeptors und tragen somit zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der Immunmodulation durch US28 bei.

Im dritten Abschnitt dieser Habilitationsschrift wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die homöostatischen Chemokinrezeptoren immunpathologische Prozesse bei chronischen Entzündungen und Tumorerkrankungen unterstützen:

- Sind CXCR5 und CCR7 an der lymphoiden Neogenese in chronischen Entzündungsmodellen beteiligt?
- Liegen der Dissemination und Lokalisation von Tumorzellen ähnliche Mechanismen zu Grunde wie der Migration lymphoider Immunzellen während einer Immunantwort?

Mittels *in vivo* Untersuchungen in einem experimentellen Modell einer antigen-induzierten Arthritis konnte die Funktion von CXCR5 für die lymphoide Neogenese in einem chronischen Entzündungsmodell näher charakterisiert werden. Die Erkenntnisse hieraus deuten auf neue Möglichkeiten der therapeutischen Immunmodulation hin. Die *in situ* Untersuchungen an verschiedenen Subtypen des Hodgkin-Lymphoms zum Nachweis eines Chemokinrezeptor-Profiles lassen auf eine wichtige Rolle des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR7 für die Lokalisation Subtypen-spezifischer Tumorzellen in spezifischen Kompartimenten lymphoider Organe schließen. Diese Daten führen somit zu einem besseren Verständnis für grundlegende Mechanismen der Dissemination von hämatopoetischen Tumorzellen.

2 Eigene Arbeiten

Im Folgenden sind die eigenen Arbeiten entsprechend der verschiedenen Teilaspekte in drei Kapitel unterteilt.

2.1 Die Rolle von CCR7 und CXCR5 in der lymphozytären Homöostase und in der Entwicklung adaptiver Immunantworten

2.1.1 CCR7-Defizienz verursacht die Ausbildung ektopischer lymphoider Follikel sowie eine gestörte zelluläre Organisation viszeralen Gewebes in der Magenmukosa

(Höpken, U.E., Wengner, A.M., Loddenkemper, C., Stein, H., Heimesaat, M.M., Rehm, A., Lipp, M. (2007) CCR7 deficiency causes ectopic lymphoid neogenesis and disturbed mucosal tissue integrity. *Blood* 109: 886-95. (Seiten 17-26)

Befunde der letzten zwei Jahre haben gezeigt, dass die Expression des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR7 auf Lymphozyten nicht nur deren koordinierte Migration in lymphatische Organe steuert, sondern auch notwendig ist für ihre Extravasation aus nicht-lymphatischem Gewebe.

Durch Analyse der CCR7^{-/-} Mäuse konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass die lymphozytäre Expression des Chemokinrezeptors CCR7 eine notwendige Voraussetzung für die effiziente homöostatische Rezirkulation von Lymphozyten durch nicht-lymphatische Gewebe ist. Fehlende CCR7 Expression in Mäusen führte zu einer massiven Ansammlung von Lymphozyten in mukosalem Gewebe des Gastrointestinaltraktes und der Lunge, die sich in erwachsenen Tieren zu lymphoiden, Follikel-ähnlichen Strukturen entwickelte. Da es sich bei den follikulären T-Zellen hauptsächlich um Effektor-Gedächtnis T-Helfer Zellen handelt und Proliferation innerhalb dieser Follikel beobachtet wurde, können wir nicht ausschließen, dass die CCR7^{-/-} Maus Autoimmunität in Verbindung mit einer gestörten zellulären Homöostase entwickelt. Die Ausbildung ektopischer lymphoider Follikel wurde mit zunehmendem Alter der CCR7^{-/-} Mäuse von histomorphologischen Veränderungen der Magenmukosa begleitet. Es entwickelte sich eine Schleimhauthypertrophie im Magenkorpus mit zystischen Dilatationen und einer erhöhten Proliferationsrate der Drüsenzellen.

Zusammenfassend lassen diese Daten den Schluß zu, dass CCR7 eine entscheidende Rolle in der Regulation homöostatischer lymphozytärer Rezirkulation durch mukosales Gewebe und dessen zellulärer Organisation spielt.

2.1.2 Kooperative und getrennte Funktionen der beiden Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 in der Rekrutierung nicht-klassischer B-1 B Zellen und in der Entwicklung einer frühen Immunantwort gegen bakterielle Pathogene

Höpken, U.E., Achtman, A.H., Krüger, K., Lipp, M. (2004) Distinct and overlapping roles of CXCR5 and CCR7 in B-1 cell homing and early immunity against bacterial pathogens.

J. Leukoc. Biol. 76:709-718. (Seiten 28-37)

Im letzten Jahrzehnt wurde die kritische Bedeutung der beiden homöostatischen Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5 für das kontrollierte *homing* und die korrekte Positionierung von Lymphozyten innerhalb spezieller Kompartimente sekundärer lymphoider Organe hinreichend charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit konnte ich klare Beweise für eine dominante Rolle von CXCR5 in der Rekrutierung nicht-klassischer B-1 sowie konventioneller B-2 B Zellen in den Peritonealraum und in der Aufrechterhaltung der Immunität von Körperhöhlen herausarbeiten. CXCR5-defiziente Mäuse weisen eine dramatische Reduktion von B-1 und B-2 B-Zellen auf Grund einer gestörter Einwanderung dieser Zellen in Körperhöhlen auf. Nach intraperitonealer Immunisierung mit einem Thymus-unabhängigem Streptokokken-Antigen zeigten die CXCR5^{-/-} Mäuse eine signifikant reduzierte, antigen-induzierte Phosphorylcholin-spezifische IgM Antwort im Vergleich zu Wt Kontrolltieren. CCR7-defiziente Mäuse dagegen wiesen nur eine partielle Reduktion peritonealer B-1 B Zellen auf, die ebenfalls zu einer reduzierten humoralen Immunantwort führte. Allerdings zeigten diese Tiere überraschenderweise eine signifikant erhöhte peritoneale B-2 B-Zellzahl. Interessanterweise wiesen die CXCR5^{-/-}CCR7^{-/-} Doppelknockout-Mäuse eine starke Reduktion in der Anzahl sowohl peritonealer B-1 B Zellen als auch in der humoralen Immunantwort, ähnlich wie in der CXCR5^{-/-} Maus, auf. Dieses Ergebnis unterstreicht noch einmal die dominante Funktion von CXCR5 für das B-1 B Zell-*homing* und für die Entwicklung einer frühen Immunantwort gegen bakterielle Antigene. Auf der anderen Seite wiesen die Doppelknockout-Tiere einen intermediären Phänotyp bezüglich der Anzahl peritonealer B-2 B-Zellen auf. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse sowohl auf duale als auch auf kooperative Funktionen beider Rezeptoren hin, wobei CXCR5 eine dominante Rolle im B-1 B-Zell-*homing* und bei der Aufrechterhaltung der Immunität in Körperhöhlen zu spielen scheint. Dagegen wird das *homing* und die Rezirkulation von B-2 B-Zellen durch die kooperative Wirkung beider Chemokinrezeptoren aufrecht erhalten.

2.1.3 Der Chemokinrezeptor CCR7 reguliert die in Lymphknoten-induzierte zytotoxische T-Zell-Immunantwort gegen Alloantigene

Höpken, U.E., Droese, J., Li, J.P., Joergensen, J., Breitfeld, D., Zerwes, H.-G., Lipp, M. (2004) The chemokine receptor CCR7 controls lymph node-dependent cytotoxic T cell priming in alloimmune responses. *Eur. J. Immunol.* 34: 461-470. (Seiten 39-48)

Indem der Chemokinrezeptor CCR7 das Einwandern von T- und B-Lymphozyten sowie dendritischen Zellen in die sekundären lymphatischen Organe steuert, ist er essentiell an der Induktion einer adaptiven T- und B-Zell-Immunantwort beteiligt. Ziel dieser Arbeit war die Bedeutung von CCR7-gesteuerter Migration von Lymphozyten und DCs für die Transplantatabstoßung und Toleranzinduktion funktionell zu charakterisieren. Hierzu entwickelte ich ein Modell einer akuten Transplantatabstoßung mittels eines allogenen subkutanen Tumors in CCR7-defizienten Mäusen. Interessanterweise beobachteten wir in den CCR7-defizienten Mäusen ein ungehindertes Tumorwachstum einer allogenen MHC Klasse I-inkompatiblen Fibrosarkom-Zelllinie, während in Wt Kontrollen der allogene Tumor erwartungsgemäß vollständig abgestoßen wurde. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die zytotoxische T-Zellantwort in den CCR7-defizienten Tieren stark reduziert ist, während eine vergleichbare Alloantikörper-Antwort sowohl in Wildtyp-Tieren als auch in CCR7-defizienten Tieren messbar ist. Ein adoptiver Transfer Allogen-stimulierter Splenozyten, die aus immunisierten Wt Tieren gewonnen wurden, führte zu einer vollständigen Abstoßung eines subkutanen allogenen Tumors in CCR7-defizienten Mäusen.

Mit Hilfe verschiedener Tumortransplantations-Modelle war es mir möglich, zwischen einer indirekten ('crosspriming'), im Lymphknoten induzierten alloantigenen T-Zellantwort, und einer direkten, also außerhalb lymphatischer Organe (z.B. im Transplantat selbst) induzierten Immunantwort, zu unterscheiden. So konnte ich die Induktion einer allogenen T-Zellantwort einem CCR7-abhängigen und -unabhängigen Mechanismus zuordnen. Wird ein solides vaskularisiertes Organ, wie z.B. ein Herz, ektopisch transplantiert, überwiegen die CCR7-unabhängigen Mechanismen und man kann die Transplantatabstoßung nur für einige Tage in CCR7-defizienten Mäusen verzögern.

2.1.4 Die CCR7-abhängige Induktion von T-Zellantworten während einer bakteriellen Infektion ist in verschiedenen T-Zellsubpopulationen unterschiedlich ausgeprägt.

Kursar, M., Höpken, U.E., Köhler, A., Lipp, M., Kaufmann, S.H.E., Mittrücker, H.W. (2005) Differential requirements for the chemokine receptor CCR7 in T cell activation during bacterial infection. *J.Exp. Med.* 201: 1447-1457. (Seiten 50-60)

Die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort nach einer Infektion erfordert eine koordinierte Steuerung der Zirkulation von Immunzellen durch peripheres Gewebe und durch sekundäre lymphatische Organe. In der folgenden Untersuchung haben wir die Funktion von CCR7 für die Induktion und Regulation der T-Zellantwort gegen *Listeria monocytogenes* analysiert. Es zeigte sich, dass in CCR7-defizienten Mäusen die Induktion von Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in allen untersuchten Geweben drastisch reduziert war. Dagegen hatte die CCR7-Defizienz nur einen partiell-reduzierenden Einfluss auf die Generation von CD4⁺ T-Zellen. Ebenfalls konnten wir zeigen, dass CCR7-defiziente Tiere in der Lage waren, normale CD8⁺ T-Zellantworten gegen fmet-Peptide aus *L. monocytogenes*, die im Kontext des MHC Klasse I-Moleküls H2-M3 erkannt werden, sowie eine *L. monocytogenes*-spezifische CD8⁺ Memory-T-Zellantwort zu entwickeln. Letzteres führte nach erneuter Infektion zu einer fulminanten Sekundärantwort.

In weiteren Versuchen konnten wir zeigen, dass für eine normale Entwicklung einer primären CD8⁺ T-Zellantwort CCR7 sowohl auf den naiven T-Zellen als auch auf den Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert sein muß. Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass CCR7-Defizienz in unserem *L. monocytogenes* Infektionsmodell vor allem die Aktivierung von MHC Klasse Ia-restringierten naiven CD8⁺ T-Zellen verhindert, während die Aktivierung anderer T-Zellsubpopulationen weitgehend CCR7-unabhängig verläuft.

Mein Anteil an dieser Arbeit umfasste zum einen die Generierung CCR7-defizienter Mäuse in zwei verschiedenen genetischen Hintergründen. Zum anderen war ich beteiligt an der Planung und Interpretation der Experimente. Darüber hinaus habe ich Teile des veröffentlichten Manuskripts verfasst bzw. editiert.

2.1.5 Die Rolle von CCR7 in der Migration und funktionellen Aktivität von naiven- und Effektor/Memory-ähnlichen regulatorischen T-Zellsubpopulationen

Menning, A., Höpken, U.E., Siegmund, K., Lipp, M., Hamann, A., Huehn, J. (2007) Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive and effector/memory-like regulatory T cell subsets. Eur. J. Immunol. 37: 1575-1583. (Seiten 62-70)

Damit eine effektive Immunantwort nicht überschießt oder sich in eine autoaggressive Immunantwort entwickelt, müssen die Effektor T-Zell-Funktionen reguliert werden. In den letzten Jahren wurde eine Subpopulation der CD4⁺-T-Zellen mit regulatorischen Funktionen identifiziert. Diese sogenannten 'Regulatorischen T-Zellen' (Treg) werden zur Zeit intensiv erforscht und es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass Tregs entscheidend für die Immunhomöostase sind, indem sie überschießende Immunreaktionen verhindern.

Da man vermuten konnte, dass regulatorische T-Zellen ähnlichen Mechanismen der gerichteten Migration und Rezirkulation unterliegen wie Effektor-T-Zellen, untersuchten wir die Funktion homöostatischer Chemokinrezeptoren für die Rekrutierung/Rezirkulation und funktionelle Aktivität von Treg Zellen. Unsere Daten zeigen, dass sowohl naive als auch eine Subpopulation von Effektor/Memory-Treg-Zellen den Chemokinrezeptor CCR7 exprimieren. Weiterhin konnten wir demonstrieren, dass CCR7 Expression eine entscheidende Voraussetzung für die Migration und Rezirkulation von adoptiv-transferierten CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen durch lymphatisches Gewebe, aber auch durch mukosales Gewebe des Darms, ist. In einem *delayed type hypersensitivity* DTH-Modell konnte gezeigt werden, dass das nodale 'priming' regulatorischer T-Zellen und somit die regulatorische/suppressive Funktion von Treg-Subpopulationen entscheidend durch CCR7 Expression reguliert wurde. Im Vergleich zu Wt Tregs (OVA-TCR⁺ Tregs) war die Migration von CCR7^{-/-} Tregs in Lymphknoten sowie ihre suppressive Wirkung auf die OVA-spezifische T-Zell-Proliferation reduziert. Aufgrund dieser Daten postulieren wir, dass CCR7 eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung regulatorischer T-Zellantworten in chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen spielt.

Mein Anteil an der praktischen Arbeit umfasste die Generierung einer CCR7-defizienten-OVA-TCR-transgenen Mauslinie sowie immunhistochemische Analysen von Mausgeweben. Zum anderen war ich beteiligt an der Planung und Interpretation der Experimente. Darüber hinaus habe ich Teile des veröffentlichten Manuskripts verfasst bzw. editiert.

2.2 Molekulare Mechanismen der Immunmodulation durch den Zytomegalievirus-kodierten Chemokinrezeptors US28

Mokros, T., Rehm, A., Droese, J., Oppermann, M., Lipp, M., **Höpken, U.E.** (2002) Surface expression of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 is regulated by agonist-independent constitutive phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277: 45122-28.

(Seiten 72-78)

Befunde der letzten Jahre haben gezeigt, dass Zytomegaloviren (CMV) immunsubversive Strategien entwickelt haben, u.a. die Expression von Chemokin-Rezeptor Homologen, Chemokinen oder auch Inhibitoren für Chemokin-vermittelte Immunantworten. Die biologische Funktion viral-kodierter Chemokine und Chemokinrezeptor-Homologe im komplexen Geschehen einer Chemokin/Chemokinrezeptor-vermittelten Immunantwort ist jedoch kaum untersucht. Um die molekularen Mechanismen der Immunmodulation durch den HCMV-kodierten Chemokinrezeptor US28 aufzuklären, haben wir zunächst die auch heute noch einzigartigen US28-spezifischen monoklonalen Antikörper hergestellt. Mit Hilfe dieser monoklonalen Antikörper konnten wir US28 als *late* Protein, welches in der späten Phase der Virusreplikation 24-48 Stunden nach einer Infektion primärer humaner Fibroblasten mit HCMV exprimiert wird, charakterisieren. Weiterhin konnte eine starke Liganden-unabhängige Phosphorylierung des US28 Rezeptors nachgewiesen werden. Überexpressions-experimente in transient transfizierten HEK293A Zellen zeigten, dass US28 ein Substrat der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase (GRK) 2 ist und dass die Proteinkinase C und die Caseinkinase 2 an der Regulation der konstitutiven US28-Phosphorylierung beteiligt sind. Durch Untersuchungen von Rezeptorvarianten identifizierten wir bestimmte Aminosäurenreste an definierten Positionen im C-Terminus des Rezeptors als Akzeptorstellen dieser Phosphorylierung. Basierend auf der einzigartigen konstitutiven Phosphorylierung von US28 konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese konstitutive Rezeptor-Phosphorylierung sowohl die Zelloberflächenexpression als auch die Endozytose des US28-Moleküls reguliert. Mit diesen Ergebnissen konnten wir erstmals die molekularen Mechanismen der konstitutiven Endozytose/Rezirkulation und der daraus resultierenden geringen Oberflächenexpression von US28 schlüssig erklären. Diese Ergebnisse stellen eine wichtige Grundlage für zukünftige Arbeiten dar und untermauern die Hypothese, dass das Wegfangen inflammatorischer Chemokine aus der Umgebung virusinfizierter Zellen durch US28 durch dessen konstitutive Phosphorylierung und Rezeptorinternalisierung reguliert wird. Somit konnten wir einen grundlegenden molekularen Wirkmechanismus, wie Herpesviren die Immunantwort unterwandern können, aufdecken.

2.3 Die Bedeutung homöostatischer Chemokinrezeptoren für immunpathologische Prozesse bei chronischen Entzündungen und Tumorerkrankungen

2.3.1 Die CXCR5-abhängige Entwicklung Antigen-spezifischer lymphoider Neo-Organogenese in einem chronischen Modell der Rheumatoiden Arthritis

Wengner, A.M., Höpken, U.E., Petrow, P.K., Hartmann, S., Schurigt, U., Bräuer, R., Lipp, M. (2007) CXCR5-dependent antigen-specific lymphoid neo-organogenesis in a chronic model of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 56:3271-3283. (Seiten 80-92)

Bisherige Studien legen nahe, dass die CXCR5-vermittelte Aktivierung von Integrinen auf lymphoiden Vorläuferzellen vermutlich die ektopische lymphoide Neogenese während chronischer Entzündungen steuert. In der vorliegenden Untersuchung haben wir den Einfluß von CXCR5 und CCR7 in der akuten und chronischen Phase der rheumatoiden Arthritis (RA) in einem chronischen Entzündungsmodell einer Antigen-induzierten Arthritis (AIA) untersucht. Wir entwickelten ein modifiziertes AIA-Modell, welches akute und chronische Entzündungsparameter der RA widerspiegelt, sowie die Entwicklung organisierter ektopischer Follikel im chronisch entzündeten Synovialgewebe induziert. Sowohl CXCR5- als auch CCR7-defiziente Mäuse wiesen im Vergleich zu Wt Tieren eine signifikant verringerte Kniegelenkschwellung sowie eine Reduktion akuter Entzündungsparameter auf. Die CXCR5-defizienten Mäuse zeigten weiterhin einen deutlichen Rückgang der Gelenkdestruktion in der frühen chronischen Phase der AIA. Eine verringerte Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen sowie die Reduktion der humoralen Immunantwort konnte sowohl in CXCR5^{-/-} als auch in CCR7^{-/-} Mäusen beobachtet werden. Unsere Ergebnisse in der späten chronischen Phase zeigten, dass Wt Mäuse in diesem modifizierten Modell einer AIA hoch organisierte ektopische lymphoide Strukturen im chronisch entzündlichen Synovialgewebe entwickelten. Diese waren charakterisiert durch segregierte T- und B-Zellzonen, Ausbildung von HEVs sowie die Entwicklung von Keimzentren-ähnlichen Strukturen. Die Entwicklung als auch die Organisation tertiärer lymphoider Follikel war sowohl in CXCR5^{-/-}, als auch in CCR7^{-/-} Mäusen gestört. Zusammengefasst verdeutlichen diese Daten eine maßgebliche Beteiligung beider Chemokinrezeptoren an der lymphoiden Neo-Organogenese in chronischen Autoimmunmodellen.

Mein Anteil an der Arbeit war die initiale Etablierung des AIA Modells zusammen mit der damaligen Doktorandin Antje Wengner. Mir oblag die Betreuung der Doktorandin bei der Planung, Durchführung und Analyse der *in vivo* Experimente. Darüber hinaus habe ich zur Interpretation der Daten beigetragen und das Manuskript zur Publikation sowie die Doktorarbeit editiert.

2.3.2 Überexpression des Chemokinezeptors CCR7 im klassischen Morbus Hodgkin, aber nicht in der Lymphozyten-reichen Form korreliert mit der spezifischen Lokalisation neoplastischer Zellen innerhalb der sekundären lymphatischen Organe.

Höpken, U.E., Foss, H.-D., Meyer, D., Hinz, M., Leder, K., Stein, H., Lipp, M. (2002) Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs. *Blood* 99: 1109-1116. (Seiten 94-101)

Es wird zunehmend diskutiert, dass der Dissemination von Tumorzellen ähnliche Mechanismen zu Grunde liegen wie der Migration und dem *homing* lymphoider Immunzellen während einer Immunantwort. In der nachfolgenden Arbeit habe ich die Rolle von Chemokinen/Chemokinrezeptoren für die Tumordissemination und Tumorlokalisierung am Beispiel des Hodgkin-Lymphoms herausarbeiten können. Mein besonderer Fokus lag dabei auf dem Einfluß der homöostatischen Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR5 und CXCR4 auf die Dissemination der spezifischen Tumorzellen im klassischen Morbus Hodgkin (cHD) und im Lymphozyten-reichen Subtyp (NLPHL). Während neoplastische L&H Zellen der NLPHL Form überwiegend innerhalb follikulärer Strukturen lokalisiert sind, findet man die Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen (HRS) des klassischen Hodgkin Subtypen vorwiegend in der interfollikulären oder in der follikulären Mantelzone des Lymphomgewebes. Unsere Ergebnisse zeigten, dass L&H Zellen den Chemokinrezeptor CXCR4 exprimieren, jedoch nicht CCR7. Umgekehrt zeigten HRS Zellen hohe Expressionsspiegel des Rezeptors CCR7. Die differentielle CCR7 Expression korrespondiert exakt mit der Verteilung CCR7-spezifischer Liganden im Lymphomgewebe. Diese distinkten Expressionsprofile konnten mit der konstitutiven Aktivität von NF- κ B als transkriptionellem Induktor korreliert werden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann man für hämatopoetische Neoplasien, insbesondere jedoch für den Morbus Hodgkin, eine Rolle der homöostatischen Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 in Hinblick auf Tumordissemination und anatomische Organisation des befallenen Lymphknotengewebes postulieren.

3 Diskussion

Die Entdeckung des ersten Chemokins, dem Interleukin-8, im Jahre 1987 durch Baggiolini und Kollegen (52) eröffnete ein neues faszinierendes Gebiet in der Immunologie. Die Zahl der gegenwärtig bekannten Chemokine ist auf über 50 angewachsen, und nicht weniger als 20 verschiedene Rezeptoren wurden biochemisch und funktionell charakterisiert. Die Bedeutung der Chemokine als neue Botenstoffe der Immunabwehr ist heute allgemein akzeptiert. Dank der Analyse ihrer selektiven Bindungseigenschaft an Oberflächenrezeptoren auf Leukozyten verstehen wir nun die grundlegenden Prinzipien, welche die Wanderung der Leukozyten aus der Blutbahn in pathologisch verändertes Gewebe sowie innerhalb sekundärer lymphatischer Organe regulieren. Dieses sogenannte *homing* ist eine absolute Voraussetzung für die Entwicklung einer effizienten Immunabwehr. Damit sichert das Chemokin/Chemokinrezeptorsystem durch seine Komplexität die Rekrutierung der richtigen Zelle zum richtigen Ort und zur richtigen Zeit. Die Erkenntnisse zur biologischen Funktion von Chemokinen hat entscheidend dazu beigetragen, die Entstehung von Entzündungs- und Infektionskrankheiten besser zu verstehen. Dazu wurden in den letzten Jahren eine Reihe transgener und/oder Knockout-Maus-Stämme generiert, die eine Untersuchung der *in vivo* Funktionen von Chemokinen und ihren Rezeptoren erlauben. Das anhaltende Interesse resultiert auch nicht zuletzt aus der immensen klinischen Relevanz von Chemokinen/Chemokinrezeptoren, insbesondere für Entzündungsreaktionen, Autoimmunerkrankungen und Tumorprogreß. So soll hier ein Überblick über offene Fragen des Chemokin/Chemokinrezeptorsystems und ein Ausblick über meine zukünftigen Forschungsschwerpunkte auf diesem sich weiterhin rasant entwickelnden Gebiet gegeben werden.

3.1 CCR7- und CXCR5-abhängige Funktionen in der homöostatischen lymphozytären Rezirkulation und in der Entwicklung adaptiver Immunantworten

Die Rolle der homöostatischen Chemokine/Chemokinrezeptoren in der Migration und Positionierung von Lymphozyten und dendritischen Zellen in sekundären lymphatischen Organen als wichtige Voraussetzung für die Induktion einer adaptiven Immunantwort ist von uns und anderen Arbeitsgruppen intensiv untersucht worden (30, 53, 23). Über die molekularen Mechanismen, welche aber die homöostatische Wanderung von Lymphozyten

durch nicht-lymphatisches Gewebe steuern, ist dagegen kaum etwas bekannt. Ich habe mir deshalb die Frage gestellt, ob dieselben Mechanismen, die die homöostatische Wanderung von Lymphozyten in die und innerhalb der sekundären lymphatischen Organen steuern, auch für die homöostatische Rezirkulation von Lymphozyten durch peripheres Gewebe verantwortlich sein könnten. Die physiologische Bedeutung einer kontinuierlichen homöostatischen Rezirkulation von Lymphozyten durch nicht-lymphatisches Gewebe liegt in der Aufrechterhaltung einer permanenten Immunüberwachung und in der Etablierung peripherer Toleranz. Es ist bekannt, dass insbesondere Memory-T-Zellen kontinuierlich vom Blutkreislauf in nicht-lymphatisches Gewebe einwandern und von dort in die lokalen sekundären Lymphknoten über afferente Lymphbahnen zurückkehren. Die Rezirkulation von Memory-T-Zellen durch peripheres nicht-lymphatisches Gewebe ermöglicht eine kontinuierliche Immunüberwachung sowohl unter homöostatischen, wie auch unter entzündlichen Bedingungen (4). Alferink und Kollegen konnten 1998 zeigen, dass die Wanderung von naiven T-Lymphozyten durch peripheres Gewebe eine notwendige Voraussetzung für die Induktion neonataler Toleranz gegen gewebständige Antigene darstellt (54).

Mittels Analyse der CXCR5^{-/-} und CCR7^{-/-} Mäuse konnte ich zum ersten Mal zeigen, dass die Expression dieser Chemokinrezeptoren auf Lymphozyten eine notwendige Voraussetzung für deren effiziente homöostatische Migration und Rezirkulation nicht nur in lymphoide Organe, sondern auch in und durch extralymphoide Organsysteme ist. So konnte CXCR5 als ein essentieller *homing* Faktor für peritoneale B-1 und B-2 B-Zellen charakterisiert werden. Da peritoneale B-1 B-Zellen die Quelle natürlicher Antikörper vom Immunglobulintyp M im Serum sind, kommt dem Rezeptor CXCR5 besondere Bedeutung bei der natürlichen Abwehr bakterieller Infektionen in Körperhöhlen zu (55, 56). CCR7-defiziente Mäuse zeigten nur eine partielle Reduktion peritonealer B-1 B-Zellen, die aber ebenfalls eine verminderte antibakterielle Immunantwort zur Folge hatte.

Zu unserer Überraschung führte jedoch die fehlende CCR7-Expression zu einer massiven Akkumulation von klassischen B-2 B- und T-Lymphozyten in den zwei großen Körperhöhlen, dem Peritoneum und der Pleurahöhle in CCR7^{-/-} Mäusen. Zum Teil kann dieser interessante Phänotyp mit einer gestörten Auswanderung der CCR7-negativen Lymphozyten über die afferenten Lymphgefäße erklärt werden. Debes und Butcher fanden etwa zeitgleich zu unserer Arbeit, dass CCR7 wichtig ist für die Auswanderung von T-Lymphozyten aus der Haut über die afferenten lymphatischen Gefäße in die drainierenden Lymphknoten (57, 58). Andererseits könnte aber auch ein gestörtes Gleichgewicht zwischen den CXCL13/CXCR5-

vermittelten Signalen, welche für die Rekrutierung von Lymphozyten in Körperhöhlen verantwortlich sind (55, 56), und den CCL19/CCL21/CCR7 Chemokin/Chemokinrezeptorpaar vermittelten Signalen, welche für das lymphozytäre Auswandern aus Geweben wichtig zu sein scheinen, in den CCR7^{-/-} Mäusen vorhanden sein. Überbordende CXCL13/CXCR5- vermittelte Signale könnten dann zum Zurückhalten der eingewanderten Lymphozyten führen.

Einen besonders bemerkenswerten Befund zeigt die CCR7-Defizienz bei der homöostatischen Rezirkulation von Lymphozyten durch mukosales Gewebe. Massive Ansammlungen von Lymphozyten im mukosalen Gewebe des Dickdarms, der Lunge und des Magens CCR7-defizienter Mäuse entwickeln sich in erwachsenen Tieren zu lymphoiden Follikel-ähnlichen Strukturen, die B- und T-Zellen, follikuläre-dendritische Zellen (FDC) und funktionelle Endothelvenolen (HEV) enthalten, während Wt und CXCR5-defiziente Mäuse keine zellulären Abnormalitäten zeigen (59). Da es sich bei den follikulären T-Zellen hauptsächlich um Effektor-Gedächtnis T-Helfer Zellen handelt und Proliferation innerhalb dieser Follikel beobachtet wurde, können wir nicht ausschließen, dass die CCR7^{-/-} Maus Autoimmunität in Verbindung mit einer gestörten zellulären Homöostase entwickelt. Dafür sprechen auch kürzlich veröffentlichte Daten, die zeigen, dass CCR7-defiziente Thymozyten in immundefizienten RAG^{-/-} Mäusen Autoimmunreaktionen in den Tränen- und Speicheldrüsen verursachen (60).

Die Ausbildung ektopischer lymphoider Follikel in der Mukosa, Submukosa und Lamina Propria des Magens wurde mit zunehmendem Alter der CCR7^{-/-} Mäuse von histomorphologischen Veränderungen der Magenmukosa begleitet. Es entwickelte sich eine Schleimhauthypertrophie im Magenkorpus mit zystischen Dilatationen und einer erhöhten Proliferationsrate der Drüsenzellen, die in vielen Aspekten dem Ménétrier-Syndrom im Menschen ähnelte.

Unsere Resultate beschreiben eine völlig neue Funktion des Chemokinrezeptors CCR7 in der zellulären Organisation viszeralen Gewebes und in der Rezirkulation von Lymphozyten durch nicht-lymphatisches Gewebe unter homöostatischen Bedingungen. Die Blockade von CCR7 durch den Einsatz von Antagonisten ist zur Zeit Ziel zahlreicher Untersuchungen von pharmazeutischen Firmen, die sich durch deren Einsatz ein neues therapeutisches Prinzip in akuten und chronischen Entzündungserkrankungen erhoffen. Der kurzzeitige Einsatz solcher Inhibitoren mag hilfreich sein, dagegen könnte eine längerfristige Blockade von CCR7 auf Grund der hier beschriebenen Daten unerwünschte Effekte hervorrufen.

Die Feinregulierung des zellulären Wanderungsverhaltens durch das Chemokin/Chemokinrezeptorsystem ist für das gesamte lymphatische System charakteristisch. So werden z.B. unreife dendritische Zellen durch Chemokine, welche am Ort einer Entzündung von Endothelien oder Entzündungszellen freigesetzt werden, zum Ort einer Infektion gelockt. Diese entzündlichen Chemokine wirken chemotaktisch über Bindung an die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR5 und CCR6 auf unreifen dendritischen Zellen. Unter Antigenaufnahme und Prozessierung reifen die DCs heran und es kommt zu einem radikalen Wechsel ihres Chemokinrezeptor-Profiles. Die inflammatorischen Chemokinrezeptoren werden durch den homöostatischen Chemokinrezeptor CCR7 ersetzt. Dadurch werden die DCs nicht mehr im entzündlichen Gewebe zurückgehalten, sondern angezogen durch die CCR7-spezifischen Chemokine, CCL19 und CCL21, in die drainierenden Lymphknoten rekrutiert, um in Kontakt mit T-Zellen eine adaptive Immunantwort zu induzieren (23, 26, 61; Abbildung 1).

In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. F. Sallusto und Prof. Dr. A. Lanzavecchia (Bellinzona) konnten wir zeigen, dass die CCR7-Expression auf reifen antigen-beladenen DCs für deren Migration in die drainierenden Lymphknoten und das nodale T-Zell-*priming* von entscheidender Bedeutung ist (62). Eine effiziente antigen-spezifische T-Zellantwort kann weiterhin durch eine lokale Vorbehandlung (Gewebe-*priming*) mit entzündlichen Zytokinen verstärkt werden, welches wiederum die CCR7-gesteuerte Einwanderung von DCs in die drainierenden Lymphknoten verstärkt. Ohl und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass CCR7 Expression nicht nur essentiell ist für die Rekrutierung von DCs aus der Haut unter entzündlichen, sondern auch unter homöostatischen Bedingungen (63).

Um die Rolle CCR7-abhängiger Migration von Lymphozyten und DCs in der Immunmodulation bei Transplantationen und Toleranzinduktion näher zu untersuchen, entwickelte ich ein Modell einer akuten Transplantatabstoßung mittels Induktion eines allogenen subkutanen Tumors. CCR7-defiziente Mäuse zeigten ungehindertes Tumorwachstums einer allogenen, MHC Klasse I-inkompatiblen Fibrosarkom-Zelllinie, während in Wt Kontrollen der allogene Tumor erwartungsgemäß vollständig abgestossen wurde. In weiteren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die Induktion einer zytotoxischen CD8⁺ T-Zellantwort in den CCR7-defizienten Tieren stark gestört ist. Ein adoptiver Transfer allogen-stimulierter Splenozyten, die aus immunisierten Wildtyp-Tieren gewonnen wurden, führte zu einer vollständigen Abstoßung eines subkutanen allogenen Tumors in CCR7-defizienten Mäusen (64).

In komplexeren Transplantationsstudien solider allogener Tumore konnte ich zwischen der CCR7-abhängigen Induktion von allo-antigenen T-Zellantworten innerhalb von Lymphknoten und der CCR7-unabhängigen T-Zellaktivierung außerhalb sekundärer lymphatischer Organe unterscheiden. Die lokale Beschränkung der CCR7-abhängigen allo-spezifischen T-Zellantwort auf sekundäre lymphatische Organe hatte zur Folge, dass die Transplantatabstoßung ektopisch transplanteder Herzen in CCR7^{-/-} Mäuse zwar signifikant um einige Tage verzögert werden konnte, aber letztendlich nicht zum Überleben des Transplantats führte (64). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Beckmann und Kollegen (2005; 65), die ebenfalls in einem Modell einer ektopischen Herztransplantation einen moderaten Einfluß des Chemokinrezeptors CCR7 auf den Zeitverlauf der Transplantatabstoßung feststellten. Somit konnte in beiden Studien gezeigt werden, dass die Inhibition einer allogenen T-Zellantwort in den sekundären lymphatischen Organen, welche CCR7-abhängig induziert wird, nicht ausreichend ist für ein langfristiges Überleben von vaskularisierten Organtransplantaten. Die Induktion von T-Zellantworten außerhalb lymphatischer Organe scheint bei soliden Organtransplantationen eine mindestens ebenso wichtige Funktion einzunehmen und läuft CCR7-unabhängig ab.

CCR7-abhängige CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellantworten wurden von uns zusätzlich in einem *Listeria*-Infektionsmodell in Kooperation mit Dr. M. Kursar und Prof. Dr. H.-W. Mittrücker vom MPI für Infektionsbiologie in Berlin (Direktor Prof. Dr. S.H.E. Kaufmann) untersucht. Wir konnten zeigen, dass das effiziente *priming* von naiven Klasse Ia-restringierten CD8⁺ T-Zellen absolut CCR7-abhängig ist. Dabei ist die CCR7-abhängige CD8⁺ T-Zellantwort nicht auf die Milz beschränkt, sondern kann nach oraler Infektion auch in der Leber, in der Lamina Propria und dem Epithel des Dünndarms beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ist die nicht-klassische, MHC Klasse Ib-restringierte f-met-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort kaum reduziert und die Klasse-II restringierte CD4⁺-T-Zellantwort nur teilweise CCR7-abhängig. Interessanterweise ist auch die Memory-T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* vergleichbar in CCR7^{-/-} und Wt Mäusen, obwohl die primäre CD8⁺-T-Zellantwort in den CCR7-defizienten Mäusen nicht vorhanden war (66). Somit scheint die Aktivierung bestimmter T-Zell-Subtypen und bestimmter Reifungsstadien von T-Zellen streng durch CCR7 reguliert zu werden, während die Aktivierung anderer T-Zell-Subpopulationen durch alternative Mechanismen induziert wird.

In einem viralen Infektionsmodell konnten Junt und Kollegen zeigen, dass die zytotoxische T-Zellantwort in ihrer Stärke und Anzahl Virus-spezifischer CTLs gegen das lymphozytäre Choriomeningitisvirus (LCMV) in CCR7 defizienten Mäusen sowohl in lymphatischen Organen

als auch in nicht-lymphoiden Organen reduziert war (67). Die einzelne CCR7-defiziente zytotoxische T-Zelle ist aber voll funktionstüchtig, so dass sich eine anti-virale Immunantwort vollständig, aber verzögert, entwickeln kann. Auch eine funktionierende anti-virale Memory-T-Zellantwort konnte in den CCR7-defizienten Tieren beobachtet werden, wenn gleich deren Verteilung auf lymphoide und nicht-lymphoide Organe durch CCR7-Abwesenheit verändert wurde. Daraus lässt sich schließen, dass CCR7-Expression für eine maximale anti-virale CTL-Antwort und für die homöostatische Rezirkulation von Memory-Zellen notwendig ist. Diese Expression ist aber keine notwendige Voraussetzung für die 'viral clearance' und die Induktion von anti-viralen Memory-T-Zellen (67).

In den letzten Jahren ist eine Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen, die sogenannten regulatorischen T-Zellen (Tregs), intensiv erforscht worden. Heute wird allgemein anerkannt, dass Tregs für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und zur Regulation überschüssiger Immunreaktionen absolut notwendig sind (68). Daraus ergibt sich ein hohes therapeutisches Potential für den Einsatz von Tregs zur Supprimierung unerwünschter Immunreaktionen in der Transplantation, bei Autoimmunerkrankungen oder chronischen Entzündungen. Für die optimale Wirksamkeit regulatorischer T-Zellen *in vivo* müssen Tregs ähnlich wie Effektor-T-Zellen über die Fähigkeit zum *priming* und *homing* verfügen (69).

In einer gemeinsamen Untersuchung mit Prof. Dr. J. Huehn und Prof. Dr. A. Hamann vom Deutschen Rheumaforschungszentrum (Berlin) haben wir die Funktion homöostatischer Chemokinrezeptoren für die gerichtete Rekrutierung/Rezirkulation und für die funktionelle Aktivität von Treg Zellen untersucht. Huehn und Kollegen konnten schon 2004 zeigen, dass ein naiv-ähnlicher Subtyp regulatorischer T-Zellen, die $\alpha_E^-CD25^+$ T-Zellen, CCR7 und L-Selektin (CD62L) exprimieren (70). Unsere jüngsten Daten zeigen, dass sowohl naive als auch eine Subpopulation von Effektor/Memory-Treg-Zellen den Chemokinrezeptor CCR7 exprimieren. Diese Chemokinrezeptor-Expression ist offensichtlich eine Voraussetzung für die Migration und Rezirkulation von adoptiv transferierten CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen durch lymphatisches Gewebe, aber auch durch mukosales Gewebe des Darms. In einem *delayed type hypersensitivity* DTH-Modell konnten wir zeigen, dass das nodale *priming* regulatorischer T-Zellen und somit die regulatorische/suppressive Funktion von Treg-Subpopulationen entscheidend durch CCR7 reguliert wurde. Im Gegensatz dazu führt CCR7-Verlust auf Effektor/Memory-ähnlichen Treg zur Akumulation dieser Zellen am Ort der Entzündung und in Folge zu einer lokal verstärkten Suppression der Entzündung (71). Letzteres lässt vermuten, dass Tregs zum Verlassen von entzündlichem Gewebe ebenfalls CCR7 benötigen, wie es kürzlich für konventionelle Effektor/Memory-T-Zellen in einer

entzündlichen Situation in der Lunge beschrieben wurde (58). Aufgrund dieser Daten postulieren wir, dass CCR7 unterschiedliche Effekte bei der funktionellen Ausbildung regulatorischer T-Zellantworten in naive- oder in Effektor/Memory-ähnliche Subpopulationen ausübt.

3.2 Herpesvirus-kodierte Chemokinrezeptoren

Eines der faszinierendsten Gebiete der Immunologie beschäftigt sich mit den von Viren entwickelten molekularen Strategien zur eigenen Ausbreitung und zur Abwehr der menschlichen Immunantwort. Besonderes Interesse erlangten z.B. die beiden inflammatorischen Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 aufgrund ihrer Funktion als Korezeptoren für das ‘human immunodeficiency virus’ (HIV). Für den Eintritt des HI-Virus in die Zelle bindet das Virus mit seinem Oberflächenprotein gp120 zuerst an CD4, benötigt aber, um in die Zelle einzudringen, zusätzlich einen Chemokinrezeptor, CCR5 oder CXCR4, als zweite Verankerung. Die Wahl des Rezeptors hängt von der Struktur der variablen Region V3 von gp120 ab. Man unterscheidet zwischen den T-tropen (T-Zelllinien-infizierende HI-Viren) und den M-tropen (Monozyten/Makrophagen infizierende HI-Viren) Virusstämmen, die CXCR4 bzw. CCR5 als Korezeptor verwenden. Die essentielle Bedeutung von CCR5 als HIV-Korezeptor wird durch ein natürlich auftretendes, defektes CCR5 Allel deutlich, das seinen Trägern Resistenz gegen M-trope HI-Viren verleiht (72).

Die komplette Sequenzierung der Genome vieler Herpesviren und Poxviren führte zur Entdeckung zahlreicher viraler Genprodukte, die für Proteine kodieren, die die Aktivität von Chemokinrezeptoren und Chemokinen hemmen oder sie für die eigene Replikation und Ausbreitung nutzen (73-75). Es können drei Hauptgruppen von Proteinen zur Abwehr der Wirts-Immunantwort unterschieden werden: (1) viral-kodierte Chemokin-Homologe (vCks), welche als Agonisten oder Antagonisten auf endogene Chemokinrezeptoren des Wirtes wirken; (2) viral-kodierte sezernierte Chemokin-bindende Proteine (vCkBPs), welche Chemokine binden und diese dadurch in ihrer chemotaktischen Funktion hemmen; (3) viral-kodierte Chemokin-Rezeptor-Homologe (vCkRs), welche die Chemokine ihrer Wirte binden und dadurch möglicherweise für die Entfernung von inflammatorischen Chemokinen aus der Umgebung infizierter Zellen sorgen oder die Proliferation und Chemotaxis infizierter Zellen induzieren (76-77).

Für den HCMV-kodierten US28-Rezeptor konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ein viral-kodierter Chemokinrezeptor für die Entfernung von inflammatorischen Chemokinen aus der Umgebung infizierter Zellen verantwortlich ist (78, 35), welches vermutlich die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der viralen Infektion verhindert. Die molekularen Mechanismen, die dieser interessanten biologischen Funktion des US28-Rezeptors zugrunde liegen, waren jedoch nicht bekannt. Um die biochemischen und zellbiologischen Eigenschaften dieses Rezeptors funktionell näher untersuchen zu können, haben wir monoklonale Antikörper hergestellt, die spezifisch das native US28 Protein erkennen und bis heute einzigartig sind (79). Mittels dieser Antikörper konnten wir die Expressionskinetik des nativen US28-Proteins in HCMV-infizierten Fibroblasten ermitteln und in transienten Überexpressionssystemen eine vorwiegend intrazelluläre Lokalisation des Rezeptors nachweisen. Für die geringe Zelloberflächenexpression des US28-Moleküls war eine hohe Liganden-unabhängige Phosphorylierung des Rezeptors verantwortlich, welche eine effektive Rezeptorinternalisierung ermöglichte. Gleichzeitig konnten wir die Ansammlung des Rezeptors in intrazellulären Vesikeln nachweisen. Der Austausch der Phosphorylierungsstellen im C-Terminus des Rezeptors führte zu einer verstärkten Lokalisation des Rezeptors an der Plasmamembran und war zudem für eine stark verlangsamte und reduzierte Endozytose des US28-Rezeptors verantwortlich.

Nach einem allgemeinen Modell der GPCR-Aktivierung induziert die Ligandenbindung neben der Signalleitung auch die Rezeptorphosphorylierung durch GRKs, welche die β -Arrestin abhängige Internalisierung über den zentralen zellulären Endozytoseweg in Clathrin-umhüllten Vesikeln ermöglicht (20, 80, 81). Die endozytierten GPCRs werden in den Endosomen von spezifischen Phosphatasen dephosphoryliert, dann über Recycling-Endosomen zurück an die Oberfläche transportiert, oder lysosomal abgebaut. Rezeptorphosphorylierungen sind weiterhin auch an der Regulation der Signalleitung durch GPCRs beteiligt. Die Bindung von GRKs und β -Arrestin an intrazelluläre Bereiche des Rezeptors hindert die signalleitenden G Proteine sterisch an der Rezeptorbindung und unterbindet dadurch die Stimulierbarkeit des GPCRs (Desensitivierung; 19). Wir wollten daher untersuchen, ob die US28-vermittelte Aktivierung von intrazellulären Signalwegen durch dessen Rezeptorphosphorylierung reguliert wird. Weder die konstitutive Aktivierung von NF- κ B, noch die RANTES (CCL5)-induzierte Aktivierung der MAPK waren von der Rezeptorphosphorylierung abhängig. Dagegen war die MAPK-Aktivierung bei dem US28 Wt-Rezeptor durch Pertussistoxin hemmbar, bei der nicht phosphorylierten Rezeptorvariante jedoch unempfindlich gegenüber Pertussistoxin. Letzteres Ergebnis läßt auf die

Notwendigkeit der US28-Phosphorylierung für die Kopplung an Proteine der $G\alpha_i$ -Familie schließen.

Zusammenfassend konnten wir einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der molekularen Mechanismen US28-vermittelter Funktionen leisten. Wir haben gezeigt, dass die konstitutive Rezeptorendozytose die mechanistische Grundlage der schnellen Ligandeninternalisierung ist. Die Phosphorylierung des US28-Rezeptors stellt eine wichtige strukturelle Voraussetzung für die Beseitigung inflammatorischer Chemokine aus der Umgebung virusinfizierter Zellen dar. Alle bislang untersuchten Funktionen des US28-Rezeptors basieren momentan auf *in vitro* Versuchen, da die Zytomegalieviren der Maus und Ratte für keinen US28-homologen Chemokinrezeptor kodieren. Um die *in vivo* Relevanz des US28 Rezeptors zu untersuchen, wäre es vorstellbar, eine US28-transgene Maus zu generieren. Es ist bekannt, dass murine und humane Chemokine Spezies-kreuzreaktiv wirken, d.h., dass murine Chemokine auch an den humanen US28-Rezeptor binden und Signalwege aktivieren können.

3.3 Die immunpathologische Bedeutung homöostatischer Chemokinrezeptoren in chronischen Entzündungen und bei Tumorerkrankungen

Die homöostatischen Chemokine und ihre Rezeptoren steuern die Einwanderung und Positionierung von Lymphozyten und dendritischen Zellen in sekundäre lymphatische Organe. Zusammen mit dem Lymphotoxin/TNF System sind sie maßgeblich an der Organogenese von Lymphknoten und Peyerschen Platten während der Embryogenese und an der funktionellen Organisation sekundärer lymphatischer Organe im adulten Organismus beteiligt (siehe Abbildung 2).

Offensichtlich steuern die gleichen Moleküle auch eine ektopische lymphoide Neogenese, wie sie für viele chronisch entzündliche oder Autoimmunerkrankungen charakteristisch ist. Die Expression von homöostatischen Chemokinen und dem Lymphotoxin β konnte mit der Ausbildung ektopischer Follikel in chronisch-entzündlichen Geweben von Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Sjögren-Syndrom oder *Helicobacter pylori*-induziertem Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe (MALT) korreliert werden (43-46). In experimentellen Studien in Mäusen induziert die ektopische Expression von CXCL13, CCL19 und CCL21 in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse sowie die transgene Expression von CCL21 in der Schilddrüse die Neogenese eines organisierten lymphatischen Gewebes mit getrennten T-

und B-Zell-Bereichen (47-49). Es wird vermutet, dass die ektopen lymphoiden Follikel durch verstärkte Effizienz der Autoantigen-Präsentation am Ort der Entzündung die Entstehung autoreaktiver Lymphozyten sowie die Produktion von Autoantikörpern unterstützen und damit unmittelbar zur Pathogenese beitragen.

In einem Antigen-induzierten Arthritis (AIA) Modell haben wir die Rolle von CXCR5 und CCR7 für die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis (RA) charakterisiert. Unter Verwendung CXCR5- und CCR7-defizienter Mäuse konnte der Einfluss beider Rezeptoren auf die akute und chronische Entzündungsphase sowie die Entwicklung organisierter tertiärer lymphoider Strukturen herausgearbeitet werden. Die in der AIA auftretenden histopathologischen Veränderungen ähneln stark der chronischen Entzündung und Gelenkschädigung, wie sie in einer RA im Menschen beobachtet wird. Das in der Literatur beschriebene AIA Modell (82-84) basiert auf einer Immunisierung der Versuchstiere durch subkutane Injektion eines Gemisches aus Proteinantigen (z.B. methyliertes BSA) und immunstimulierendem Adjuvans. Die Arthritis wird durch eine anschließende intraartikuläre Injektion desselben Antigens in das Kniegelenk zu einem definierten Zeitpunkt induziert. Es entwickelt sich eine akute Entzündung, die durch Exsudation mit Fibrin und der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten charakterisiert ist. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer massiven Infiltration mit mononukleären Zellen und einsetzender Hyperplasie des Mesothels, welche in der chronischen Phase in eine progressive Gelenkdestruktion übergeht. Wir modifizierten das AIA Modell, indem wir eine zweite intraartikuläre Gabe des spezifischen Antigens einen Monat nach der Arthritis-Induktion verabreichten. Mittels dieser Modifikation konnten wir die verlässliche Entwicklung hoch organisierter ektopischer lymphoider Strukturen in der späten chronischen Phase in Wt Mäusen gewährleisten. Neben segregierten T- und B-Zell-Zonen und Expression der Chemokine CXCL13 und CCL21 in spezifischen Kompartimenten des Follikels konnte weiterhin die Ausbildung von HEVs sowie die Entwicklung von Keimzentren-ähnlichen Strukturen beobachtet werden (85).

Im Vergleich zu den Wt Mäusen wiesen CXCR5- und CCR7-defiziente Mäuse eine verringerte Kniegelenkschwellung, reduzierte akute Entzündungsparameter und eine verringerte humorale Immunantwort auf. In der späten chronischen Phase zeigten die CXCR5-defizienten Mäuse eine signifikant reduzierte Anzahl ektopischer Strukturen, deren funktionelle Organisation zudem schwer gestört war. Die gestörte Entwicklung und Organisation tertiärer lymphoider Strukturen konnten wir auch in den CCR7-defizienten Mäusen zeigen, wobei dort überraschenderweise eine deutliche Erhöhung diffuser Lymphozyteninfiltrate im Synovialgewebe beobachtet wurde. Als Grund für die verstärkten

diffusen Infiltrate in den CCR7^{-/-} Mäusen postulieren wir die kürzlich beschriebene Funktion von CCR7 für die regulierte Auswanderung und Rezirkulation von Lymphozyten aus und durch peripheres Gewebe (57-59).

Insgesamt verdeutlichen unsere Ergebnisse, dass beide Rezeptoren, CXCR5 und CCR7, entscheidend an der Ausbildung tertiären lymphatischen Gewebes und an der funktionellen Organisation ektopischer lymphoider Strukturen beteiligt sind (85).

Aufgrund der Ergebnisse aus zahlreichen präklinischen Tiermodellen und Patientenstudien kann heute mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass die tertiären lymphatischen Mikrostrukturen chronischer Autoimmunerkrankungen die Sensitivität der Antigenerkennung erhöhen, das Zusammenwirken von immunregulatorischen und Effektorzellen optimieren und die Interaktion zwischen peripherem Gewebe und aberranten Immunreaktionen unterstützen. Inwieweit homöostatische Chemokinrezeptoren über ihre Rolle in der Induktion eines funktionellen ektopischen lymphoiden Gewebes die Immunität körpereigener Antigene und die Aufrechterhaltung autoreaktiver Prozesse in chronischen Entzündungen beeinflussen, ist zur Zeit Gegenstand weiterer Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe. In einem Kollagen-induzierten Arthritismodell konnte durch Depletion von CXCL13 bereits ein Einfluss des CXCL13/CXCR5 Ligand/Rezeptorpaars für die Pathogenese der RA aufgezeigt werden. Die Neutralisation von CXCL13 inhibierte die Entwicklung synovialer lymphoider Strukturen, führte zur Auflösung von Keimzentren in sekundären lymphatischen Organen und hatte die Reduktion klinischer Parameter zur Folge (86).

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von CXCL13 an der lymphoiden Neogenese in Folge einer chronischen Entzündung ist der Befund, dass CXCL13 in den lymphoiden Aggregaten und der Mantelzone sekundärer Follikel von *Helicobacter pylori*-induziertem Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebe (MALT) detektiert wurde (87). Bei einigen Patienten entwickeln sich im Zuge einer chronisch-entzündlichen *Helicobacter*-Infektion aus den ektopischen Follikeln sogenannte MALT-Lymphome. Wir konnten zeigen, dass in MALT-Lymphomen einiger Patienten die homöostatischen Chemokine CXCL13, CXCL12 und CCL19 exprimiert sind (30). In Übereinstimmung mit unseren Daten haben auch andere Arbeitsgruppen eine hohe Expression von CXCL13 in MALT-Lymphomen und anderen gastrischen Lymphomen gefunden (87, 88). Es wird postuliert, dass CXCL13 im Tumorgewebe autokrin wirkt und die Lymphomzellen zusammenhält, was ihre geringe Neigung zur Dissemination erklären könnte.

Die Kommunikation zwischen Lymphomzellen und dem sie umgebenden Tumorstroma stellt einen Schlüsselprozess für die Induktion, die Aufrechterhaltung sowie das Auswachsen hämatopoetischer Malignome dar. Eine solche zelluläre Interaktion beinhaltet mindestens drei Eckpfeiler, zu denen mesenchymale oder Knochenmarks-abhängige Stromazellen, Zellen der adaptiven und der angeborenen Immunabwehr und natürlich die Tumorzellen selbst gehören. Die histomorphologischen sowie immunphänotypischen Kennzeichen von Lymphomen ahmen vielfach Eigenschaften nach, wie sie auch in der Entwicklung von benignen sekundären und tertiären lymphatischen Organen auftreten.

Eine Reihe von Publikationen zeigen, dass in einer Vielzahl von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Tumoren Chemokinrezeptoren erhöht exprimiert werden. Es wird postuliert, dass dadurch die Tumordissemination/Lokalisation und Metastasierung sowohl solider Tumore, aber auch von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen reguliert wird (89, 50). So wird der homöostatische Chemokinrezeptor CCR7 auf verschiedenen Tumorentitäten wie Melanomen (90, 91), Magenkarzinomen (92, 93), Mammakarzinomen (89), Hodgkin-Lymphomen (94), chronisch-lymphatischen- und adulten T-Zell-Leukämien (95, 96), und primären ZNS Lymphomen (97) hoch exprimiert. Dadurch werden Tumorzellen in die Lage versetzt, auf lokal exprimierte Chemokine zu reagieren und in spezifische Organe einzuwandern. Die Chemokine sind dabei an das Endothel der infiltrierten Organe gebunden und können Zellen an diesen Positionen mit hoher Ligandenkonzentration in die Organe dirigieren. Im klassischen Morbus Hodgkin konnte ich eine wichtige Rolle von CCR7 für die Dissemination von neoplastischen Zellen herausarbeiten (94). Die neoplastische Kennzelle des klassischen M. Hodgkin, die Reed-Sternberg-Zelle, wies hohe Expressionsmengen der Rezeptoren CCR7 und CXCR4 auf und war in der interfollikulären Zone lokalisiert, wo gleichzeitig auch die entsprechenden Liganden, CCL19, CCL21 und CXCL12 auf den sogenannten reaktiven Begleitzellen nachweisbar waren. Demgegenüber exprimieren Tumorzellen in der Lymphozyten-reichen Form (Typ 1) viel CXCR4, aber kein CCR7 und befinden sich hauptsächlich in den follikulären Strukturen. Zum einen können die unterschiedlichen Expressionsmuster für die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 auf den jeweiligen Subtypen des Morbus Hodgkin als immunhistologisches Unterscheidungsmerkmal für beide große Gruppen herangezogen werden. Zum anderen weisen unsere Ergebnisse auf eine spezifische Funktion von CCR7 für die interfollikuläre Lokalisation der Tumorzellen des klassischen Morbus Hodgkin hin. Weiterhin konnten wir dieses differenzierte Muster der Chemokinrezeptorexpression mit der Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren (NF- κ b, Oct2,

Bob1) und mit dem Ausreifungsstadium der vermutlich zugrundeliegenden B-Zellpopulation korrelieren (94).

In einem Maustumor-Modell konnten Müller und Kollegen (2001) zeigen, dass die Infiltration von Brustkrebszellen in bestimmte Organe über lokal exprimierte Chemokine, wie z.B. CCL21 und CXCL12, gesteuert wird. Die *in vivo* Blockade des Chemokinrezeptors CXCR4 oder CCR7 auf Brustkrebszellen führte zu einer deutlich verringerten Entwicklung von Lungen- und Lymphknoten-Metastasen (89).

Neben der Rolle des Chemokin/Chemokinrezeptorsystems für die Migration, Lokalisation und Metastasierung von Tumorzellen, können Chemokine auch als Wachstumsfaktoren für verschiedene Tumorentitäten wirken. Die Proliferation metastasierender Tumorzellen in infiltrierten Geweben kann entweder durch autokrine- oder durch gewebespezifische, parakrin-wirkende Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Chemokine ausgelöst werden. CXCL8 (IL-8) und CXCL1 sind Beispiele für Chemokine, die als autokrine Wachstumsfaktoren fungieren und von Melanomzellen (98), Leber- und Pankreas-Tumoren (99), und Kolonkarzinomen (100) produziert werden. Weiterhin wurde beschrieben, dass insbesondere die CXC ELR⁺ Chemokine, z.B. CXCL8, aber auch einige ELR Chemokine, z. B. CXCL10, als angiogene Faktoren die Gefäßbildung von Tumoren regulieren und damit deren Wachstum und Versorgung unterstützen (101). Eine weitere Besonderheit stellt der konstitutiv aktive, HHV-8 kodierte GPCR ORF74 da, welcher sowohl an der Proliferation, als auch an der Transformation von Zellen beteiligt zu sein scheint (102).

Zusammenfassend kann man sagen, dass Chemokine und Chemokinrezeptoren in vielfältiger Weise an der Entwicklung und Ausbreitung von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Neoplasien beteiligt sind. Auf der anderen Seite werden Chemokine aber auch zur Verstärkung einer Immunantwort gegen Tumore eingesetzt, indem man sich ihre chemotaktische Funktion zur Rekrutierung immunkompetenter Zellen in das Tumorgewebe zu Nutze macht. So konnte in einigen Mausmodellen durch Applikation der rekombinanten homöostatischen Chemokine CCL19 und CCL21 oder von CCL20 in einen subkutan gewachsenen syngenen Tumor die zelluläre, anti-tumorale Immunantwort verstärkt und das Tumorstadium inhibiert werden (103-106).

4) Zusammenfassung und Ausblick

Die Ausbildung einer effektiven adaptiven Immunantwort nach einer Infektion oder während einer Entzündung erfordert eine koordinierte Zirkulation von Immunzellen durch fast alle Bereiche des Körpers. Die Reifung von T- und B-Lymphozyten und die Aufrechterhaltung der Funktionsbereitschaft im Immunsystem ist von der Wanderung der Lymphozyten innerhalb der lymphatischen Gewebe und von einem lymphatischen Organ zum anderen abhängig. Im Gegensatz zu Granulozyten, die mit einer begrenzten Auswahl von Chemokinrezeptoren auskommen, beanspruchen die T-Lymphozyten nahezu alle bekannten Rezeptoren. Das distinkte Expressionsmuster passt sich dem funktionellen Zustand der Lymphozyten an, und kann als spezifischer Marker für ihre Reife, Differenzierung und Aktivierung angesehen werden.

Die in der vorliegenden Habilitationsschrift vorgestellten Arbeiten verdeutlichen die funktionelle Relevanz der konstitutiven Chemokine und ihrer Rezeptoren für die Aufrechterhaltung lymphozytärer Homöostase sowie für die Induktion adaptiver Immunantworten. Der überraschende Befund, dass CCR7 nicht nur lymphozytäre homöostatische Rezirkulation durch lymphatische Organe, sondern auch durch peripheres Gewebe steuert, hat entscheidend zur Charakterisierung einer weiteren biologischen Funktion von CCR7 geführt.

Zusammen mit neueren Daten aus der Literatur ergibt sich folgendes Bild:

wenn Lymphozyten den *homing* Rezeptor CCR7 nicht exprimieren, können diese periphere Gewebe, wie z.B. die Haut, Körperhöhlen oder auch mukosales Gewebe nicht mehr verlassen und akkumulieren dort. Entwickeln sich solche lymphoiden Aggregate weiter zu funktionellen ektopischen Follikeln, wie in der Magenschleimhaut von CCR7-defizienten Mäusen, können mit zunehmendem Alter der Versuchstiere pathomorphologische Veränderungen in benachbartem, viszeralem Gewebe beobachtet werden. Momentan untersuche ich, ob letzteres direkt durch die Entwicklung der ektopen lymphoiden Follikel induziert wird und welche molekularen Mechanismen dem zu Grunde liegen. Interessanterweise kommt es auch zur Akkumulation von Effektor/Memory T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen am Ort von Entzündungen in CCR7-defizienten Mäusen, oder aber nach Transfer von CCR7-defizienten T-Zell-Subpopulationen. In beiden Fällen verstärken sich lokal die Effektorfunktionen der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen.

Zusammengenommen scheint CCR7 ein entscheidender Regulator für die lymphozytäre Rezirkulation in der Homöostase und unter entzündlichen Bedingungen zu sein.

CCR7 steuert weiterhin die koordinierte Migration von DCs und T-Zellen und deren Zusammentreffen in der T-Zellzone sekundärer lymphatischer Organe. Somit ist CCR7 auch ein wichtiger Induktor primärer Immunantworten während einer bakteriellen oder viralen Infektion. Wie aus unseren Arbeiten hervorgeht, ist der Einfluß von CCR7 aber beschränkt auf die Aktivierung bestimmter T-Zell-Subtypen und bestimmte Reifungsstadien von T-Zellen, während die Aktivierung anderer T-Zell-Subpopulationen durch alternative Mechanismen induziert wird.

Um der Immunabwehr am Ort einer Infektion zu entgehen, kodieren z.B. Herpesviren für immunmodulatorische Mediatoren wie Chemokin- und Chemokinrezeptor-Homologe. Ein Beispiel ist der HCMV-kodierte Rezeptor US28, der durch die Bindung von Chemokinen, wie CCL5 (RANTES), entzündliche Mediatoren aus der Umgebung einer viralen Infektion wegfängt und dadurch eine effektive anti-virale Immunantwort verhindert. Wir haben die molekularen Mechanismen dieser Immunmodulation mittels einer Kombination von Mutagenesestudien und biochemischen sowie zellbiologischen Methoden aufgeklärt. Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass eine bisher einzigartige konstitutive Phosphorylierung von US28 sowohl dessen Zelloberflächenexpression, als auch die Endozytose des Rezeptors reguliert. Letzteres bildet die mechanistische Grundlage für die Ligandeninternalisierung, welche wiederum eine wichtige Voraussetzung für die Beseitigung inflammatorischer Chemokine am Ort einer Infektion darstellt. Bislang existiert leider kein geeignetes Mausmodell, um die hier postulierte immunmodulatorische Funktion von US28 *in vivo* zu überprüfen.

Im letzten Kapitel dieser Habilitationsschrift habe ich die immunpathologische Bedeutung von CXCR5 und CCR7 in einem Antigen-induzierten Arthritis Modell und für Tumorerkrankungen herausgearbeitet.

Es konnte klar gezeigt werden, dass CXCR5 eine essentielle Rolle in der Entwicklung und Organisation tertiären lymphatischen Gewebes in der späten chronischen Phase einer AIA spielt. Zur Zeit untersuche ich die Entwicklung und Organisation tertiären lymphatischen Gewebes in chronisch-entzündeter Magenschleimhaut nach Infektion mit *Helicobacter pylori*. Auch in diesem zweiten Modell einer chronischen Entzündung weisen die CXCR5-defizienten Mäuse eine reduzierte Entwicklung ektopischer Strukturen auf.

Zusammengenommen stellt der Chemokinrezeptor CXCR5 ein viel versprechendes Zielmolekül zur pharmakologischen Intervention bei chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen dar.

Zahlreiche Beispiele belegen die Rolle des Chemokin-/Chemokinrezeptor-Systems bei der malignen lymphatischen Organogenese und der Tumormetastasierung. Wir konnten den Einfluß des homöostatischen Chemokinrezeptors CCR7 auf die Dissemination der spezifischen Tumorzellen im Morbus Hodgkin nachweisen. Während lymphozytäre und histiozytäre (L&H)-Zellen der lymphozytenreichen Form überwiegend innerhalb follikulärer Strukturen lokalisiert sind, positionieren sich die Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen (HRS) der klassischen Hodgkin-Variante vorwiegend in der interfollikulären oder in der follikulären Mantelzone des Lymphomgewebes. Es zeigte sich, dass L&H-Zellen den Chemokinrezeptor CCR7 nicht exprimieren, während umgekehrt die HRS-Zellen hohe Expressionsspiegel des Rezeptors CCR7 aufwiesen. Somit korrespondiert die CCR7-Rezeptorexpression exakt mit der Verteilung ihrer Liganden im Lymphomgewebe. Wir postulieren, dass CCR7 Expression eine Voraussetzung für die spezifische Lokalisation von Tumorzellen des klassischen Hodgkin-Subtyps ist.

Zur Zeit untersuche ich das Expressionsprofil und die funktionelle Signifikanz von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei Primär-mediastinalen B-Zell Lymphomen (PMBL). Mittels Untersuchungen zur Interaktion von Lymphomzellen mit einem Lymphknoten-spezifischen Zellmilieu in einem Maus-Lymphommodell möchte ich die Bedingungen für "Immune Escape" und Krankheitsprogress von Lymphomen näher charakterisieren.

Zusammengefasst dienen meine zukünftigen experimentellen Ansätze der Dissektion der zellulären Bedingungen für eine maligne lymphatische Organogenese. Ich erwarte, dass sich aus der Charakterisierung der zellulären Komponenten sowie deren Kommunikationswege Ansätze für das Verständnis der Lymphompathogenese ergeben werden. Die neu identifizierten interzellulären Interaktionen versprechen die Möglichkeit einer pharmakologischen oder immunologischen Intervention, so dass unser gegenwärtiges therapeutisches Repertoire entscheidend verbessert werden könnte.

Ohne Zweifel wird es zukünftig von herausragendem Interesse sein, wie sich die pharmakologische Intervention in das Chemokin/Chemokinrezeptorsystem als erfolgreiche Strategie zur Behandlung von Krebs oder Autoimmunerkrankungen etablieren läßt.

5 Literatur

1. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M, Shlomchik, M.J. 2005. Immunobiology, 6th Edition, Garland Science, New York, USA.
2. Picker, L.J., and Butcher, E.C. 1992. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 561-591.
3. Mackay, C.R., Marston, W.L., Dudler, L. 1990. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J. Exp. Med.* 171: 801-817
4. Butcher, E.C., and Picker 1996. Lymphocyte homing and hmoeostasis . *Science* 272: 60- 66.
5. Butcher, E.C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L., Briskin, M. 1999. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv. Immunol.* 72: 209-253.
6. Butcher, E.C.1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67: 1033-1036.
7. Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314.
8. Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346: 425-434.
9. Rollins, B. J. Chemokines. 1997. *Blood* 90: 909-928.
10. Zlotnik, A., and Yoshie, O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127.
11. Thelen M. 2001. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2: 129-134.
12. Wong, M.M., and Fish, E.N. 2003. Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Nat Immunol* 2: 129-134.
13. Schmitz, A.A., Govek, E.E., Bottner, B., Van Aelst, L. 2000. *Exp. Cell. Res.* 261: 1-12.
14. Wang, J.F., Park, I.W., Groopman, J.E. 2000. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 95: 2505-2513.
15. Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V., Wu, D. 2000. Roles of PLC-beta2 and beta-3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287: 1046-1049.
16. Downward, J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:262-267.
17. May, M.L., and Gosh, S. 1998. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 19: 80-88.
18. Gutkind, J.S. 2000. Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE* 2000:RE1.
19. Lefkowitz, R.J. 1998. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitisation. *J. Biol. Chem.* 273: 18677-18680.
20. Ferguson, S.S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53: 1-24.
21. Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A. 2001. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52:145-176.
22. Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. 1997. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 675-705.

23. Luster, A.D. 2002. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 129-135.
24. Campbell, J.J., and Butcher, E.C. 2000. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 336-341.
25. Rollins, B. J. Chemokines. 1997. *Blood* 90: 909-928.
26. Cyster, J.G. 1999. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286:2098-2102.
27. Lipp, M., Burgstahler, R., Müller, G., Pevzner, V., Kremmer, E., Wolf, E., Förster, R. 2000. Functional organization of secondary lymphoid organs by the chemokine system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 251:173-179.
28. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. 1999. Two subsets of memory T cells with distinct homing potential and effector function. *Nature* 401:708-712.
29. Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., Förster, R. J. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles and support immunoglobulin production. *J. Exp. Med.* 192:1545-1552.
30. Müller, G., Höpken, U.E., Stein, H., Lipp, M. 2002. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors. *J. Leuc. Biol.* 72:1-8.
31. Fleming, P., Davis-Poynter, N., Degli-Esposti, M., Densley, E., Papadimitriou, J., Shellam, G., Farrell, H. 1999. The murine cytomegalovirus chemokine homolog, m131/129, is a determinant of viral pathogenicity. *J. Virol.* 73:6800-6809.
32. Penfold, M.E., Dairaghi, D.J., Duke, G.M., Saederup, N., Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Schall, T.J. 1999. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9839-9844.
33. Ploegh, 1998. Viral strategies of immune evasion. *Science* 280:248-253.
34. Bodaghi, B., Jones, T.R., Zipeto, D., Vita, C., Sun, L., Laurent, L., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Michelson, S. 1998. Chemokine sequestration by viral chemokine receptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J. Exp. Med.* 188:855-866.
35. Randolph-Habecker, J., Rahill, B., Torok-Storb, B., Vieira, J., Kolattukudy, P., Rovin, B., Sedmak, D. 2002. The expression of the cytomegalovirus chemokine receptor homolog US28 sequesters biologically active CC chemokines and alters IL-8 production. *Cytokine* 19:37-45.
36. Wells, T.N., Power, C.A., Shaw, J.P., Proudfoot, A.E. 2006. Chemokine blockers-therapeutics in the making. *Trends Pharmacol Sci.* 27:41-7.
37. Förster, R., Mattis, A. E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., Lipp, M. 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* 87:1037-1047.
38. Ansel, M., V. N. Ngo, P. L. Hyman, S. A. Luther, R. Förster, J. D. Sedgwick, J. L. Browning, M. Lipp, and J. G. Cyster. 2000. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406:309-314.
39. Förster, R., Schubel A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., Lipp, M. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.
40. Müller, G., and Lipp, M. 2003. Concerted action of the chemokine and lymphotoxin system in secondary lymphoid-organ development. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 217-224.

41. Müller, G., Höpken, U.E., Lipp, M. 2003. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol. Rev.* 195: 117-135.
42. Nishikawa, S., Honda, K., Vieira, P., Yoshida, H. 2003. Organogenesis of peripheral lymphoid organs. *Immunol. Rev.* 195: 72-80.
43. Shi, K., Hayashida, K., Kaneko, M., Hashimoto, J., Tomita, T., Lipsky, P.E., Yoshikawa, H., Ochi, T. 2001. Lymphoid chemokine B cell-attracting chemokine-1 (CXCL13) is expressed in germinal center of ectopic lymphoid follicles within the synovium of chronic arthritis patients. *J. Immunol.* 166: 650-655.
44. Amft, N., Curnow, S.J., Scheel-Toellner, D., Devadas, A., Oates, J., Crocker, J., Hamburger, J., Ainsworth, J., Mathews, J., Salmon, M., Bowman, S.J., Buckley, C.D. 2001. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 44: 2633-2641.
45. Mazzuchelli, L., Blaser, A., Kappeler, A., Scharli, P., Laissue, J.A., Baggolini, M., Ugucioni, M. 1999. BCA-1 is highly expressed in Helicobacter pylori-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J. Clin. Invest.* 104:R49-54.
46. Shomer, N.H., Fox, J.G., Juedes, A.E., Ruddle, N.H.. 2003. Helicobacter-induced chronic active lymphoid aggregates have characteristics of tertiary lymphoid tissue. *Infec. Immun.* 71: 3572-3577.
47. Luther, S.A., Lopez, T., Bai, W., Hanahan, D., Cyster, J.G. 2000. BLC expression in pancreatic islets causes B cell recruitment and lymphotoxin-dependent lymphoid neogenesis. *Immunity* 12: 471-481.
48. Fan L, Reilly CR, Luo Y, Dorf ME, Lo D. 2000. Cutting edge: ectopic expression of the chemokine TCA4/SLC is sufficient to trigger lymphoid neogenesis. *J. Immunol.* 164: 3955-3959.
49. Martin, A.P., Coronel, E.C., Sano, G., Chen, S.C., Vassileva, G., Canasto-Chibuque, C., Sedgwick, J.D., Frenette, P.S., Lipp, M., Furtado, G.C., Lira, S.A. 2004. A novel model for lymphocytic infiltration of the thyroid gland generated by transgenic expression of the CC chemokine CCL21. *J. Immunol.* 173: 4791-4798.
50. Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno, J., Kusser, K., Hartson, L., Sprague, F., Goodrich, S., Woodland, D.L., Lund, F.E., Randall, T.D. 2004. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat. Med.* 9: 927-934.
51. Zlotnik, A. 2006. Chemokines and Cancer. *Int. J. Cancer.* 119:2026-2029.
52. Baggolini, M., Dewald, B., Moser, B. 1997. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15:675-705.
53. Rossi, D., and Zlotnik, A. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18:217-242.
54. Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallman, R., Hämmerling, G.J., Arnold, B. 1998. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science.* 282:1338-1341.
55. Ansel, K.M., Harris, R.B., Cyster, J.G. 2002. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity.* 16:67-76.
56. Höpken, U.E., Achtman, A.H., Krüger, K., and M. Lipp. 2004. Distinct and overlapping roles of CXCR5 and CCR7 in B-1 cell homing and early immunity against bacterial pathogens. *J. Leuc. Biol.* 76:709-71.

57. Debes, G.F., Arnold, C.N., Young, A.J. Krautwald, S., Lipp, M., Hay, J.B., Butcher, E.C. 2005. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nature Immunol.* 6:889-894.
58. Bromley SK, Thomas SY, Luster AD. 2005. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nature Immunol.* 6:895-901.
59. Höpken, U.E., Wengner, A.M., Loddenkemper, C., Stein, H., Heimesaat, M.M., Rehm, A., Lipp, M. 2007. CCR7 Deficiency causes ectopic lymphoid neogenesis and disturbed mucosal tissue integrity. *Blood* 109: 886-95.
60. Kurobe, H., Liu, C., Ueno, T., Saito, F., Ohigashi, I., Seach, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Kitagawa, T., Lipp, M., Boyd, R.L., and Y. Takahama. 2006. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* 24: 165-177.
61. Cyster, J.G. 1999. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J. Exp. Med.* 189:47-450.
62. Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S., Höpken, U.E., Ugucioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. 2003. Dendritic cell recruitment into lymphatics: regulation and impact on lymph node shut down and T cell priming. *J. Exp. Med.* 198: 615-621.
63. Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., Förster, R. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21:279-288.
64. Höpken, U.E., Droese, J., Li, J.P., Joergensen, J., Breitfeld, D., Zerwes, H.-G., Lipp, M. 2004. The chemokine receptor CCR7 controls lymph node-dependent cytotoxic T cell priming in alloimmune responses. *Eur. J. Immunol.* 34: 461-470.
65. Beckmann, J.H., Yan, S., Lührs, H., Heid, B., Skubich, S., Förster, R., Hoffmann, M.W. 2004. Prolongation of allograft survival in *ccr7*-deficient mice. *Transplantation* 77:1809-1814.
66. Kursar, M., Höpken, U.E., Köhler, A., Lipp, M., Kaufmann, S.H.E., Mittrücker, H.W. 2005. Differential requirements for the chemokine receptor CCR7 in T cell activation during bacterial infection. *J. Exp. Med.* 201: 1447-1457.
67. Junt, T., Scandella, E., Förster, R., Krebs, P., Krautwald, S., Lipp, M., Hengartner, H., Ludewig, B. 2004. Impact of CCR7 on priming and distribution of antiviral effector and memory CTL. *J. Immunol.* 173:6684-6693.
68. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6:345-352.
69. Huehn, J., and A. Hamann. 2005. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol* 26:632-636.
70. Huehn, J., Siegmund, K., Lehmann, J.C., Siewert, C., Haubold, U., Feuerer, M., Debes, G.F., Lauber, J., Frey, O., Przybylski, G.K., et al. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 199:303-313.
71. Menning, A., Höpken, U.E., Siegmund, K., Lipp, M., Hamann, A., Huehn, J. 2007. Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naïve- and effector/memory-like regulatory T cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 37: 1575-1583
72. Samson, M., Libert, F., Doranz, B.J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Sargosti, S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muylldermans, G., Verhofstede, C.,

- Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R.J., Collman, R.G., Doms, R.W., Vassart, G., Parmentier, M. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 382: 722-725.
73. Alcamí, A., Koszinowski, and U.H. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today*. 21:447-455.
 74. Murphy, P.M. 2001. Viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nat. Immunol*. 2:116-122.
 75. Lalani, A.S., Barrett, J.W., McFadden, G. 2000. Modulating chemokines: more lessons from viruses. *Immunol Today*. 21:100-106.
 76. Holst, P.J. Luttichau, H.R., Schwartz, T.W., Rosenkilde, M.M. 2003. Virally encoded chemokines and chemokine receptors in the role of viral infections. *Contrib. Microbiol*. 10:232-252.
 77. Beisser, P.S., Goh, C.S., Cohen, F.E., Michelson, S., 2002. Viral chemokine receptors and chemokines in human cytomegalovirus trafficking and interaction with the immune system .CMV chemokine receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 269:203-234.
 78. Billstrom, M.A., Lehman, L.A., Scott Worthen, G. 1999. Depletion of extracellular RANTES during human cytomegalovirus infection of endothelial cells. *Am. Respir. Cell. Mol. Biol*. 21:163-167.
 79. Mokros, T., Rehm, A., Droese, J., Oppermann, M., Lipp, M., Höpken, U.E. 2002. Surface expression of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 is regulated by agonist-independent constitutive phosphorylation. *J. Biol. Chem*. 277: 45122-45128.
 80. Perry, S.J., Lefkowitz, R.J. 2002. Arresting developments in heptathelial receptor signaling and regulation. *Trends Cell Biol*. 12:130-138.
 81. Tsao, P., von Zastrow, M. 2001. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci*. 22:91-96.
 82. Brackertz, D., Mitchell, G.F., Mackay, I.R. 1977a. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*. 20, 842-850.
 83. Brackertz, D., Mitchell, G.F., Vadas, M.A., Mackay, I.R., Miller, J.F. 1977b. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *J. Immunol*. 118, 1639-1644.
 84. Brackertz, D., Mitchell, G.F., Vadas, M.A., Mackay, I.R. 1977c. Studies on antigen-induced arthritis in mice. III. Cell and serum transfer experiments. *J. Immunol*. 118, 11645-1648.
 85. Wengner, A.M., Höpken, U.E., Petrow, P.K., Hartmann, S., Schurigt, U., Bräuer, R., Lipp, M. 2007. CXCR5-dependent antigen-specific lymphoid neo-organogenesis in a chronic model of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheum*. 56:3271-3283.
 86. Zheng, B., Ozen, Z., Zhang, X., de Silva, A., Marinova, E., Guo, L., Wansley, D., Huston, D.P., West, M.R., Han, S. 2005. CXCL13 neutralization reduces the severity of Collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2:620-626.
 87. Mazzuchelli, L., Blaser, A., Kappeler, A., Scharli, P., Laissue, J.A., Baggolini, M., and M. Ugucioni. 1999. BCA-1 is highly expressed in Helicobacter pylori-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *J. Clin. Invest*. 104:R49-54.
 88. Carlson, H.S., Baekkevold, E.S., Johansen, F.E., Haraldsen, G., and P. Brandtzaeg. 2002. B cell attracting chemokine 1 (CXCL13) and its receptor CXCR5 are expressed in normal and aberrant gut associated lymphoid tissue. *Gut* 51: 364-371.

89. Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56.
90. Murakami, T. Cardones, A.R., Hwang, S.T. 2004. Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J. Dermatol. Sci.* 36:71-78.
91. Takeuchi, H., Fujimoto, A., Tanaka, M., Yamano, T., Hsueh, E., Hoon, D.S. 2004. CC121 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin. Cancer Res.* 10:2351-2358.
92. Mashino, K., Sadanaga, N., Yamaguchi, H., Tanaka, F., Ohta, M., Shibuta, K., Inoue, H., Mori, M. 2002. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 62:2937-2941.
93. Schmaußer, B., Endrich, S., Brändlein, S., Schär, J., Beier, D., Müller-Hermelink, H.-K., and M. Eck. 2005. The chemokine receptor CCR7 is expressed on epithelium of non-inflamed gastric mucosa, Helicobacter pylori gastritis, gastric carcinoma and its precursor lesions and up-regulated by H. pylori. *Clinical and Experimental Immunol.* 139: 323-327.
94. Höpken, U.E., Foss, H.-D., Meyer, D., Hinz, M., Leder, K., Stein, H., Lipp, M. 2002. Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs. *Blood* 99: 1109-1116.
95. Till, K. J., Lin, K., Zuzel, M., Cawley, J.C. 2002. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 99:2977-2984.
96. Hasegawa, H. Nomura, T., Kohno, M., Tateishi, N., Suzuki, Y., Maeda, N., Fujisawa, R., Yoshie, O., Fujita, S. 2000. Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells. *Blood* 95:30-38.
97. Jahnke, K., Coupland, S.E., Na, I.-K., et al. 2005. Expression of the chemokine receptors CXCR4, CXCR5, and CCR7 in primary central nervous system lymphoma. *Blood* 106, 384-385.
98. Fujisawa, N., Hayashi, S., Miller, E.J. 1999. A synthetic peptide inhibitor for alpha-chemokines inhibits the tumor growth and pulmonary metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Melanoma Res.* 9:105-114.
99. Miyamoto, M., Shimizu, Y., Okada, K., Kashii, Y., Higuchi, K., Watanabe, A. 1998. Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 47:47-57.
100. Brew, R. Erikson, J.S., West, D.C., Kinsella, A.R., Slavin, J., Christmas, S.E. 2000. Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. *Cytokine.* 12:78-85.
101. Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A., Addison, C.L., Ehlert, J.E., Burdick, M.D., Strieter, R.M. 2000. CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 68:1-8.
102. Bais, C., Santomasso, B., Coso, O., Arvanitakis, L., Raaka, E.G., Gutkind, J.S., Asch, A.S., Cesarman, E., Gershengorn, M.C., Mesri, E.A. 1998. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* 391:86-89.

103. Kirk, C.J., Hartigan-O'Connor, D., Nickoloff, B.J., Chamberlain, J.S., Giedlin, M., Aukermann, L., Mule, J.J. 2001. T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res.* 61:2062-2070.
104. Sharma, S., Stolina, M., Luo, J., Strieter, R.M., Burdick, M., Zhu, L.X., Batra, R.K., Dubinett, S.M. 2000. Secondary lymphoid tissue chemokine mediates T cell-dependent antitumor responses in vivo. *J. Immunol.* 164:4558-4563.
105. Vicari, A.P., Ait-Yahia, S., Chemin, K., Mueller, A., Zlotnik, A., Caux, C. 2000. Antitumor effects of the mouse chemokine 6Ckine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms. *J. Immunol.* 165:1992-2000.
106. Westermann, J., Nguyen-Hoai, T., Baldenhofer, G., Höpken, U.E., Lipp, M., Dörken, B., Pezutto, A. 2007. CCL19 (ELC) as adjuvant for DNA vaccination: induction of a TH1-type T cell response and enhancement of antitumor immunity. *Cancer Gene Therapy* 14(6): 523-532.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AIA	Antigen-induzierte Arthritis
AIDS	Erworbene Immunschwächekrankheit (<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>)
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
BCA-1	<i>B-cell attracting chemokine-1</i>
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
CCL, CCR	CC-Chemokinligand, -rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFA	Komplettes Freund's Adjuvans (<i>complete Freund's adjuvant</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein-succinimidylester
CMV	Zytomegalievirus (<i>Cytomegalovirus</i>)
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
CXCL, CXCR	CXC-Chemokinligand, -rezeptor
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus (HHV-4)
ELC	<i>EBI 1-ligand chemokine</i>
ELISA	Enzymgekoppelter Immuntest (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
E-, L-, P-Selektin	Endothelial-, leukocyte-, platelet-selectin
FACS	Durchflußzytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FDC	Folikuläre Dendritische Zelle (<i>follicular dendritic cell</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (<i>G-protein coupled receptor</i>)
HCMV	human Zytomegalievirus (<i>human cytomegalovirus</i>)
H & E	Hämatoxylin und Eosin
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEV	Hohe endotheliale Venole
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN γ	Interferon γ

IL	Interleukin
LFA-1	<i>Leukocyte function antigen-1</i>
LT	Lymphotoxin
LTi	<i>Lymphoid tissue inducer cells</i>
LTo	<i>Lymphoid tissue organizer cells</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
mAb	monoklonaler Antikörper
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressin cell-adhesion molecule-1</i>
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphoides Gewebe (<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>)
mBSA	Methyliertes Rinderserum Albumin (<i>methylated bovine serum albumin</i>)
MC	Mesenchymale Zelle
MCP-1, -2, -3	<i>Monocyte chemoattractant protein-1, -2, -3</i> (CCL2, -8, -7)
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIP-1 α , - β	Macrophage inflammatory protein-1 α , - β (CCL3, -4)
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
ORF	Leserahmen eines Strukturgens (<i>open reading frame</i>)
OVA	Ovalbumin
PALS	Periarterielle lymphatische Scheide
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
<i>plt</i>	<i>Paucity of lymph node T cells</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PNAd	<i>Peripheral node addressin</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RANTES	<i>Regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i> (CCL5)
Ras	<i>Rat sarcoma</i> assoziierte GTPase
s.c.	subkutan

SCID	<i>Severe <u>c</u>ombined <u>i</u>mmunode<u>f</u>iciency</i>
SLC	<i>Secondary lymphoid tissue <u>c</u>hemokine</i>
STAT	<i>Signal <u>t</u>ransducer and <u>a</u>ctivator of <u>t</u>ranscription</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T _{CM}	Zentrale T- Gedächtniszellen (<i>T <u>c</u>entral <u>m</u>emory</i>)
TCR	T-Zell Rezeptor (<i>T <u>c</u>ell <u>r</u>eceptor</i>)
T _{EM}	T-Effektorzellen (<i>T <u>e</u>ffector <u>m</u>emory</i>)
T _{H1} /T _{H2}	T-Helferzellen Typ1/Typ2
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
US	einmaliger kurzer (<i><u>u</u>nique <u>s</u>hort</i>) Sequenzabschnitt des HCMV- Genoms
VAP-1	Vascular adhesion protein-1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
Wt	Wildtyp

7 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Dr. Dr. habil. Martin Lipp für die ausgezeichneten Forschungsbedingungen und für seine großzügige Unterstützung beim Weg in die wissenschaftliche Unabhängigkeit bedanken.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern, Kollegen und Ko-Autoren, die an den hier beschriebenen Arbeiten beteiligt waren. Besonders erwähnen möchte ich einige ehemalige und heutige Mitglieder der Arbeitsgruppe Tumor- und Immunogenetik, allen voran Dagmar Breitfeld, Daniela Keyner, Kerstin Krüger, Heike Schwede, Thilo Mokros, Jana Droese, Ariel Achtman und Antje Wengner.

Prof. Dr. Andreas Radbruch danke ich ganz herzlich für seine Unterstützung in allen Fragen bezüglich meiner Habilitation und einer weiterführenden akademischen Karriere.

Bei Prof. Dr. Thomas Blankenstein und Dr. Thomas Kammertöns möchte ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung von Lehrveranstaltungen an der Charité bedanken.

Ich danke dem Institut für Pathologie von Prof. Dr. Harald Stein für mehrere erfolgreiche Kooperationen.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Armin Rehm, der mich in meiner wissenschaftlichen Laufbahn über all die Jahre stets tatkräftig und mit viel Enthusiasmus unterstützt hat.

8) Genehmigungen

Für die durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen lag eine Genehmigung des LaGeSo (Genehmigungsnummer G 0245/98 und G 0183/04) vor. Die Versuchstiere wurden entsprechend den gesetzlichen Vorgaben des Tierschutzgesetzes gezüchtet, gehalten und im Versuch betreut.

Für die Labore des Max-Delbrück-Centrum (Gentechnische Anlage Nr. 304/95 und 347/92), in denen Untersuchungen an transgenen Tieren und mit infektiösen Erregern durchgeführt wurden, liegen die Genehmigungen nach GenTSV für den Sicherheitslevel S1 und S2 vor.

ERKLÄRUNG

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

Hiermit erkläre ich, dass

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

Berlin, im November 2007

Unterschrift
(Dr. rer. nat. Uta E. Höpken)