

1 Einleitung

1.1 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die extrazelluläre Signale in das Zellinnere weiterleiten. Die Chemokinrezeptoren werden hauptsächlich auf hämatopoetischen Zellen exprimiert, aber auch auf anderen Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, Epithelzellen und Neuronen (Olson und Ley, 2002; Rossi und Zlotnik, 2000). Neuere Ergebnisse zeigen, daß in einer Vielzahl von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Tumoren Chemokinrezeptoren erhöht exprimiert werden, beispielsweise auf Hodgkin-Zellen, Melanomzellen und Brustkrebszellen (Höpken et al., 2002; Müller et al., 2001).

Die Chemokinrezeptoren werden aufgrund ihrer Liganden in C-, CC-, CXC- und CX₃C-Chemokinrezeptoren eingeteilt. Alle Chemokine binden an Chemokinrezeptoren der korrespondierenden Subfamilie, C-, CC-, CXC- oder CX₃C-Familie, wobei die Rezeptoren affinitätsspezifisch verschiedene Chemokine binden können (Rossi und Zlotnik, 2000). Chemokinrezeptoren erfüllen eine Vielzahl immunregulatorischer Aufgaben, indem sie die Migration immunkompetenter Zellen sowie die Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe steuern. Sie wirken zudem als Wachstumsfaktorrezeptoren und sind an der Regulierung der Tumor-Angiogenese beteiligt (Rossi und Zlotnik, 2000). Darüber hinaus sind die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 neben dem CD4-Molekül notwendige Korezeptoren für eine Infektion von T-Zellen und Makrophagen mit dem *human immunodeficiency virus* HIV (Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996).

Gemeinsam mit den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren haben die Chemokinrezeptoren charakteristische Strukturen, wie die sieben Transmembrandomänen (TMD) mit helikaler Anordnung der Aminosäuren, einen extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus) und einen intrazellulären Carboxyterminus (C-Terminus) (Abb.1). Für Chemokinrezeptoren spezifisch ist die hoch konservierte Disulfidbrücke zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife und ein DRY-Motiv (Asp-Arg-Tyr) auf der zytoplasmatischen Seite der dritten TMD (Murphy, 1994).

Die Bindung von Chemokinen erfolgt in der Regel unter Beteiligung der N-terminalen Domäne (LaRosa et al., 1992; Richardson et al., 1998). Die extrazelluläre Stimulation von Chemokinrezeptoren kann zur C-terminalen Phosphorylierung der Chemokinrezeptoren durch Rezeptor-aktivierte Kinasen führen. Die Phosphorylierung leitet damit die Termination der Rezeptoraktivität ein (Oppermann et al., 1999). Die Desensitivierung über Phosphorylierung kann durch verschiedene GPCR-Kinasen (GRKs) und andere Effektorkinasen wie Proteinkinase C reguliert werden (Haribabu et al., 1997; Oppermann et al., 1999; Orsini et al., 1999; Pitcher et al., 1998; Richardson et al., 1995). Nach der Phosphorylierung des Rezeptors bindet β -Arrestin am Rezeptor und unterbindet direkt die Rezeptoraktivität, indem es mit der

Wechselwirkung von Rezeptor und heterotrimeren G-Proteinen interferiert. β -Arrestin selbst ist in der Lage, nach Rezeptorbindung Effektormoleküle zu aktivieren, indem es z.B. die Src-Kinase rekrutiert, die wiederum die MAPK-Kaskade anschaltet (Luttrell et al., 1999). Die Chemokinrezeptoren koppeln intrazellulär an heterotrimere G-Proteine, die aus jeweils einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammengesetzt sind. Die strukturelle und funktionelle Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine wurde über ihre α -Untereinheiten definiert. Die α -Untereinheiten werden dabei in vier Gruppen, s, i, q und 12, unterschieden (Hepler und Gilman, 1992; Strader et al., 1994; Wilkie et al., 1992). Verschiedene potentielle intrazelluläre Signalweiterleitungen von Chemokinrezeptoren sind in der Abb. 1 skizziert. Die G-Proteine werden wiederum durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) wie die cGMP-Phosphodiesterase und die Phospholipase C- β (PLC- β) in ihrer Aktivität reguliert (Berstein et al., 1992). So vermitteln Chemokinrezeptoren nach der Bindung von Chemokinen intrazelluläre Signale über Effektoren wie Adenylatzyklasen, Phosphodiesterasen, Phospholipasen, Phosphoinositol-3-Kinasen (PI3K). Außerdem spielen G-Proteine eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Modulierung von K^+ -, Ca^{2+} -, Na^+ -, und Cl^- -Ionenkanälen (Clapham und Neer, 1993).

Verschiedene Viren der β - und γ -Herpesvirus-Familie kodieren virale Rezeptoren wie GPCR-ORF74 (Arvanitakis et al., 1997) oder US28 (Neote et al., 1993), die eine hohe Homologie zu den zellulären Chemokinrezeptoren aufweisen. Interessanterweise sind diese viralen Chemokinrezeptoren auch unabhängig von einer externen Stimulation konstitutiv aktiv. Darüber hinaus kann deren Aktivität durch zelluläre Chemokine moduliert werden (Rosenkilde et al., 2001).

1.1.1 Der Chemokinrezeptor CCR7

Der Chemokinrezeptor CCR7 (BLR2, CD197) wird hauptsächlich auf Leukozyten exprimiert. Dabei ist die Expression des Rezeptors auf migratorischen (migDC) und verschiedenen Subpopulationen von B- und T-Zellen abhängig vom Differenzierungsstadium und Aktivierungszustand der Zellen. Die Expression der Rezeptoren CXCR5 und CCR7 kann auch als Marker für die Unterteilung der T-Zellen in *effektor memory/effector* (T_{EM}) und *central memory* (T_{CM} und T_{CM1}) T-Zellen verwendet werden (Birkenbach et al., 1993; Breitfeld et al., 2000; Burgstahler et al., 1995; Debes et al., 2002; Saeki et al., 2000; Sallusto et al., 1999a; Yoshida et al., 1997, Müller et al., 2002). Unter pathologischen Bedingungen wird CCR7 auf verschiedenen Tumorentitäten wie Melanomen (Müller et al., 2001), Magenkarzinomen (Mashino et al., 2002), Brustkrebs (Müller et al., 2001), Hodgkin-Zellen (Höpken et al., 2002), Lymphomen (z.B. auf Tumorzellen der chronischen lymphatischen Leukämie) (Till et al., 2002) und Leukämien (z.B. auf Tumorzellen der adulten T-Zell Leukämie) (Hasegawa et al., 2000) stark hochreguliert. Die Expression von CCR7 kann durch mitogene oder durch polyklonale Aktivierung auf peripheren Blutlymphozyten induziert werden (Sallusto et al., 1999c). Exogene Faktoren wie die CD30L-Stimulation von

Lymphomzellen oder Stimulationen von DCs mit CD40L, TNF, Prostaglandin E2 und LPS können die Expression von CCR7 verstärken (Muta et al., 2000; Ogata et al., 1999; Scandella et al., 2002; Sozzani et al., 1998). Verschiedene Viren wie die humanen Herpesviren HHV-6 oder HHV-7 sind ebenfalls in der Lage die Expression von CCR7 auf CD4-positiven T-Zellen zu erhöhen (Hasegawa et al., 1994).

Interessanterweise wird nach einer Infektion mit Epstein-Barr-Viren (EBV), dessen Genom für keinen Chemokinrezeptor kodiert, die Expression von CCR7 auf B-Zellen über virales EBNA2 induziert (Burgstahler et al., 1995). Der Rezeptor CCR7 könnte damit auch eine wichtige Rolle in der viralen Pathogenese spielen, indem virusinfizierte Zellen mit hoher Expression von CCR7 in lymphatische Organe rekrutiert werden und dort weitgehend vor der Immunantwort geschützt sind.

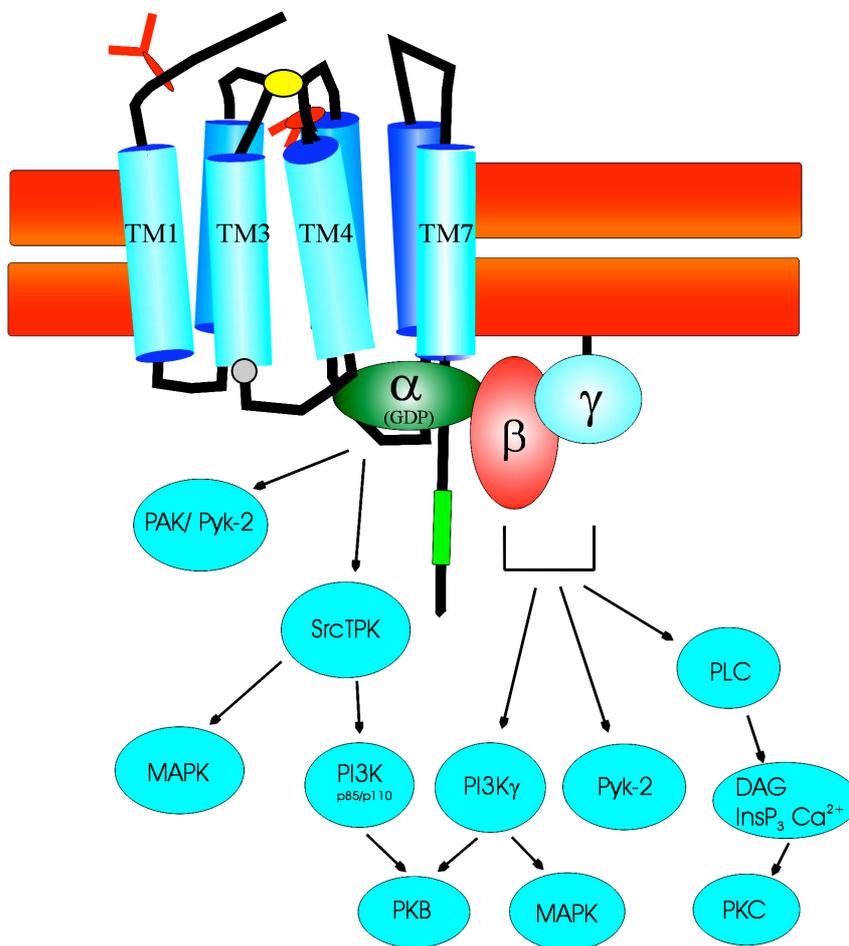


Abb. 1: Schematische Darstellung der Struktur von CCR7 und eine potentielle Signalkaskade. Vereinfachte Darstellung der intrazellulären Aktivierung von Signalmolekülen nach Liganden-abhängiger Aktivierung des GPCRs. Nicht dargestellt sind die unterschiedlichen α -Protein-Untereinheiten und ihre Interaktion mit den aufgezeigten Signalwegen. Dargestellt sind die potentiellen Glykosylierungs- (rotes Y-Zeichen) und Phosphorylierungsstellen (grüner Balken) sowie die Disulfidbrücke (gelber Kreis) und das DRY-Motiv (grauer Kreis) des CCR7 Proteins.

Die Funktion des Rezeptors CCR7 liegt im wesentlichen darin, die gerichtete Migration von hämatopoetischen Zellen in die lymphatischen Organe zu steuern und damit die Entwicklung der adaptiven Immunantwort zu koordinieren. Mit Hilfe des Rezeptors CCR7 wandern verschiedene Leukozyten-Populationen über die Blut- und Lymphbahn in lymphatische Organe ein. Im Lymphgewebe werden T-Zellen und dendritische Zellen weiter über CCR7 in die T-Zellzone (periphere Lymphknoten und Peyer'schen Plaques) oder in die periarterielle lymphatische Scheide (PALS) der Milz positioniert und können dort mit anderen Leukozyten

interagieren (Breitfeld et al., 2000; Förster et al., 1999; Kim und Broxmeyer, 1999; Sallusto et al., 1999a; Sallusto et al., 1999b).

Neuere Befunde zeigen, daß CCR7 über seine Agonisten auch die Proliferation sowohl von CD4- und CD8-positiven Zellen (Ploix et al., 2001) als auch von nicht-hämatopoetischen Zellen z.B. Mesengial-Zellen in der Niere (Banas et al., 2002) regulieren kann.

Der Chemokinrezeptor CCR7 umfaßt 378 Aminosäuren mit einem vergleichsweise kurzen Serin- und Threonin-reichen C-Terminus. Für eine potentielle Rezeptorphosphorylierung finden sich am C-Terminus charakteristische Motive für die Proteinkinase C oder die cAMP-abhängige Kinase (Baird et al., 1999; Bohm et al., 1997). Außerdem besitzt CCR7 zwei potentielle Glykosylierungsstellen (Abb. 1), die für die korrekte Orientierung des Rezeptors in der Membran (Dixon et al., 1990) verantwortlich sein könnten, da GPCRs in der Regel keine N-terminale Signalsequenz für den Transport zur Plasmamembran besitzen.

Der Chemokinrezeptor CCR7 bindet die Chemokine CCL19 oder CCL21 mit gleicher Affinität und kann nach Ligandenbindung die Kinasen FAK, ERK, PKB und JAK2 in verschiedenen Zelllinien aktivieren (Adachi et al., 2001; Stein et al., 2002; Sullivan et al., 1999; Tilton et al., 2000; Yoshida et al., 1998b) (Abb. 1). Nach der Agonisten-abhängigen Stimulation von CCR7 werden neben intrazellulären Effektormolekülen auch Adhäsionsrezeptoren wie die Integrine $\beta 2$ und $\alpha 4\beta 7$ auf Lymphozyten aktiviert, die eine wichtige Rolle bei der festen Anheftung an die Membran des Endothels spielen. Die aktivierten Integrine wiederum binden an die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1/-2 (*intercellular adhesion molecule-1/-2*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), PNA_d (peripheral node addressin) oder MadCAM (*mucosal addressin cell adhesion molecule*) (Constantin et al., 2000; Pachynski et al., 1998).

1.1.2 *In vivo* Funktion der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5

Zum Verständnis der biologischen Funktion homöostatischer Chemokinrezeptoren wie CCR7 und CXCR5 hat im wesentlichen die Analyse von Chemokinrezeptor-defizienten Mäusen beigetragen. Beide Rezeptoren haben eine wichtige Funktion in der Positionierung und dem *homing* von B- und T-Zellen in lymphatischen Organen und in der Organogenese verschiedener sekundärer lymphatischer Organe (Förster et al., 1996; Förster et al., 1999).

1.1.2.1 *Phänotyp der CCR7^{-/-}-Mäuse*

CCR7-defiziente Mäuse zeigen morphologische Veränderungen in der Mikroarchitektur der sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Peyer'sche Plaques (PP) und Milz. In den peripheren Lymphknoten (pLN) fehlt die charakteristische Verteilung der B-Zell-Follikel in Richtung Kortex. In den Lymphknoten und PP ist die Zahl der T-Zellen, vor allem von naiven T-Zellen, verringert und die Verteilung der T-Zellen in der T-Zellzone gestört. Bedingt durch die gestörte Rezirkulation von Lymphozyten in den CCR7^{-/-}-Mäusen, sind T- und B-Zellen vermehrt in der Peripherie zu finden. In adoptiven Transferexperimenten konnte

gezeigt werden, daß sich transferierte T-Zellen aus CCR7^{-/-}-Mäusen nicht in der periarteriellen lymphatischen Scheide (PALS) der Milz sammeln, sondern sich über den Marginalsinus in die rote Pulpa hinein verteilen. Aktivierte DCs aus der Haut sind ebenfalls nicht in der Lage in die drainierenden Lymphknoten einzuwandern. Die gestörte Mikroarchitektur und transendotheliale Migration von T- und B-Zellen über die hochendothelialen Venolen (HEVs) führt möglicherweise zu Defekten in der Primärantwort von T-Zellen und zu einer verzögerten humoralen Immunantwort von B-Zellen auf das T-Zell-abhängige Antigen DNP-KLH (*dinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin*) (Förster et al., 1999; Reif et al., 2002). Somit konnte anhand der CCR7^{-/-}-Mäuse gezeigt werden, daß die Expression von CCR7 wichtig für die „Organisation“ einer Primärantwort ist: Die an einer adaptiven Immunantwort beteiligten Leukozyten werden über CCR7 in sekundäre lymphatische Organe rekrutiert.

1.1.2.2 Phänotyp der CXCR5^{-/-}-Mäuse

Der Chemokinrezeptor CXCR5 wird hauptsächlich auf B-Zellen, einer Subpopulation von T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Unter pathophysiologischen Bedingungen wird der Rezeptor ebenfalls auf verschiedenen Lymphomen, wie Burkitt- und MALT-Lymphomen, exprimiert (Dobner et al., 1992; Förster et al., 1994; Kaiser et al., 1993; Mazzucchelli et al., 1999; Saeki et al., 2000). Der spezifische Ligand von CXCR5 CXCL13 wird in den B-Zell-Follikeln der sekundären lymphatischen Organe hoch exprimiert (Legler et al., 1998).

In CXCR5^{-/-}-Mäusen war sowohl die Wanderung der B-Zellen in die Follikel als auch die Bildung von Keimzentren in der Milz unterbunden. Weiterhin steuert CXCR5 die Organogenese verschiedener lymphatischer Organe. So besitzen die CXCR5^{-/-}-Mäuse keine axilären (ALN) und inguinalen (ILN) Lymphknoten sowie keine oder eine verminderte Zahl an Peyer'schen Plaques (PPs). Bedingt durch die gestörte Rezirkulation von B-Zellen in den CXCR5^{-/-}-Mäusen sind B-Zellen vermehrt in der Peripherie und der Milz zu finden (Förster et al., 1996). Die Kompartimentierung von Lymphozyten in B- und T-Zellzone in der weißen Pulpa der Milz wird entscheidend von Lymphotoxin (LT)- α 1 β 2 geprägt. In PPs stellen B-Zellen die Hauptquelle von LT α 1 β 2 dar, das wiederum die Produktion von CXCL13 durch follikuläre Stromazellen beeinflusst, so daß weitere B-Zellen über CXCL13 in die Follikel rekrutiert werden (Finke et al., 2002; Ngo et al., 1999). Somit ist die Expression von CXCR5 wichtig für das B-Zell-*homing* in lymphatische Organe und für die Bildung intakter, polarisierter Follikelstrukturen in Milz und PP.

1.2 Chemokine

Chemokine sind eine Familie kleiner chemotaktischer Zytokine (Asensio et al., 1999; Campbell et al., 1999), die eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von Migrationsvorgängen von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen spielen. Darüber hinaus sind sie auch in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen sowie in der Organentwicklung involviert (Rossi und Zlotnik, 2000).

In der Regel werden die Chemokine als Proteine von 70-125 Aminosäuren Länge sezerniert, nur CXCL16 und CX₃CL1 können über eine Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert sein. Die Chemokine werden abhängig von ihrer Primärstruktur und der Anzahl der Cysteine in C, CC, CXC und CX₃C Chemokine eingeteilt. Die CXC Chemokine werden wiederum in zwei Gruppen unterteilt, in ELR⁺ und ELR⁻ Chemokine, abhängig davon, ob ein ELR (Glu-Leu-Arg)- Motiv zwischen dem N-Terminus und dem ersten konservierten Cystein vorhanden ist. ELR⁺ CXC Chemokine binden an CXCR1 oder CXCR2 und wirken angiogen auf Endothelzellen (EC), während die angiostatischen ELR⁻ CXC Chemokine in den meisten Fällen an CXCR3 binden und oftmals durch IFN- γ induzierbar sind (Moore, 2001; Wang et al., 1998a; Belperio, et al., 2000). Dennoch gibt es auch ELR⁻ Chemokine wie CXCL12 und CCL2, die ebenfalls angiogen wirken können (Szekanecz und Koch, 2001; Schneider et al., 2002; Salcedo et al., 2000; Molino et al., 2000).

Chemokine werden von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen exprimiert, welche die Chemokine zelltyp- und organspezifisch produzieren (Campbell und Butcher, 2000). Sie können hinsichtlich ihres Expressionsmusters in zwei Gruppen unterteilt werden. Zur ersten Gruppe zählen die sogenannten inflammatorischen Chemokine (wie CCL2-CCL5, CCL11, CCL16, CXCL1-5, CXCL7-10 und CX₃CL1-2), deren Expression durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- α oder IFN- γ induzierbar ist. Inflammatorische Chemokine spielen bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten, Allergieantworten, Entzündungen oder Infektionen eine große Rolle. Ihre Synthese wird aber auch durch Virus-Infektionen wie zum Beispiel durch HHV-8 oder CMV oder durch Tumorpromotoren wie PMA sowie durch bakterielle Toxine wie LPS angeregt (Arenberg et al., 2001; Baggiolini und Dahinden, 1994; Cao et al., 1995; Keane et al., 1997; Kligman und Kligman, 1994; Koch et al., 1994; Li et al., 1999; Moore et al., 1998; Rossi und Zlotnik, 2000; Strieter, 2001; Strieter et al., 1995c).

Die homöostatischen Chemokine (CCL17-19, CCL21, CCL22, CXCL12 und CXCL13) werden hingegen in verschiedenen Geweben lymphatischer Organe, aber auch von spezifischen Zellen außerhalb des lymphatischen Systems konstitutiv exprimiert (Baggiolini und Dahinden, 1994; Baggiolini et al., 1997; Godessart und Kunkel, 2001). Homöostatische Chemokine können auf die B- und T-Zellentwicklung sowie die Entwicklung lymphatischer Organe Einfluß nehmen (Ansel et al., 2000; Butcher und Picker, 1996; Förster et al., 1996; Förster et al., 1999). Die Bedeutung der homöostatischen Chemokine für die Organogenese wird durch Experimente unterstrichen, wo diese ektopisch in den Pankreas-Inseln exprimiert werden. Es zeigte sich, daß die ektopische transgene Expression der Chemokine CXCL13, CCL19 und CCL21 in den Pankreas-Inseln organisiertes lymphatisches Gewebe mit B- und T-Zellzonen, HEVs und Stromazellen induziert (Luther et al., 2000a; Luther et al., 2000b). Es wurde ebenfalls gezeigt, daß möglicherweise homöostatische Chemokine an der Infiltration von Lymphknoten mit hämatopoetischen Tumorzellen beteiligt sind (Hasegawa et al., 2000; Höpken et al., 2002; Teruya-Feldstein et al., 2000). Im MALT-Lymphom wird vermutlich auch die Lokalisation von Lymphomzellen (exprimieren CXCR5) über CXCL13 beeinflusst, da CXCL13 in den ektopischen follikulären Strukturen des Schleimhaut-assoziierten Lymph-

gewebes (MALT) exprimiert wird. Somit können MALT-Lymphomzellen in die MALT-Region über CXCL13 rekrutiert oder auch zurückgehalten werden. Da die MALT-Lymphomzellen CXCR5 und ebenfalls CXCL13 koexprimieren, wird vermutet, daß das homöostatische Chemokin CXCL13 auch über einen autokrinen Wirkmechanismus an der Tumorprogression involviert ist (Mazzucchelli et al., 1999).

Bei der Rekrutierung von Leukozyten (Baggiolini und Dahinden, 1994), und bei dem *homing*-Prozeß von Lymphozyten in lymphatische Organe sind Chemokine entscheidend (Förster et al., 1996; Nagasawa et al., 1996). Bei der Migration sind Chemokine in der Lage Integrine (wie LFA-1, Mac-1 und VLA-4) auf zirkulierenden Leukozyten zu aktivieren, über die eine feste Bindung am Endothel ermöglicht wird. Nach transendothelialer Migration, die molekular bisher nur unvollkommen verstanden ist, steuern Chemokine dann weiter innerhalb des Gewebes oder Organs die Wanderung der Leukozyten entlang eines Chemokin-Gradienten. Die Migration wird entweder chemotaktisch über lösliche Chemokine oder haptotaktisch über gebundene Chemokine gesteuert. Entscheidend für die Haptotaxis ist eine lokal hohe Konzentrationen von gebundenen Chemokinen, wohingegen ein Konzentrationsgradient von freien Chemokinen für die Chemotaxis wichtig ist. Die Besonderheit der Chemokine liegt darin, daß sie aufgrund der Proteoglykan-bindenden Eigenschaften an der extrazellulären Matrix (ECM) binden können; d.h. Chemokine interagieren mittels ihrer basischen Aminosäuren (C-terminal) mit verschiedenen Glykosaminoglykanen. Somit sind Zellen in der Lage, die Migration entweder chemotaktisch oder haptotaktisch oder in Kombination zu steuern (Baggiolini et al., 1994; Banas et al., 2002; Cinamon et al., 2001; Schall und Bacon, 1994; Stein et al., 2000; Tanaka et al., 1993; Webb et al., 1993). Darüber hinaus sind für verschiedene Glykosaminoglykane (GAGs) inhibierende Funktionen in der Regulation von Chemokin-Aktivitäten gezeigt worden (Hirose et al., 2001).

Andererseits sind Chemokine auch für die Differenzierung von T-Helferzellen (Karpus et al., 1997) und für die mitogene Stimulation oder Suppression von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen verantwortlich (Payne und Cornelius, 2002; Ploix et al., 2001). Für einige Chemokine wie CCL4, CCL20, CXCL8 und CXCL13 ist bekannt, daß sie zudem parakrin oder autokrin über die entsprechenden Rezeptoren auf die Tumorprogression wirken (Moore, 2001; Strieter et al., 1995b; Tanaka et al., 1998; Wang et al., 1998a). Im zentralen Nervensystem (ZNS) wirken die Chemokine ebenfalls als Mediatoren zur Rekrutierung von Immunzellen, aber auch als Neurotransmitter oder als neuromodulatorische Moleküle (Limatola et al., 2000). Somit sind Chemokine auch für die Balance der zellulären Kommunikation innerhalb des ZNS wichtig, bei Fehlregulation können sie zu Autoimmunerkrankheiten wie Multipler Sklerose führen (Biber et al., 2002; Biber et al., 2001; Wang et al., 2002).

Die Vielzahl von Chemokinen mit überlappenden Bindungsaffinitäten für verschiedene Chemokinrezeptoren und die Tatsache, daß Zellen meist mehrere Chemokinrezeptoren mit redundanter und promiskuitiver Funktion exprimieren, hat die Frage nach der Spezifität ihrer Wirkung aufgeworfen. Es wird angenommen, daß die Migration von Zellpopulationen aus

einander überlappenden Konzentrationsgradienten oder hierarchisch wirkenden chemotaktischen Signalen resultiert, so daß die Migration von Zellen durch mehrere Chemokine feingesteuert werden kann (Campbell et al., 1997; Foxman et al., 1997; Reif et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, daß verschiedene Chemokine sowohl als Agonisten als auch Antagonisten unterschiedlicher Chemokinrezeptoren agieren können (Loetscher et al., 2001).

1.2.1 Die homöostatischen Chemokine CCL19 und CCL21

Sowohl CCL19 als auch CCL21 werden konstitutiv in verschiedenen lymphoiden Geweben und in der Lunge exprimiert. Im Gewebe werden diese homöostatischen Chemokine hauptsächlich von dendritischen Zellen, Stromazellen und dem Endothel sezerniert. Auf den HEVs der Lymphknoten wird sowohl CCL19 und CCL21 exponiert, wobei aber nur CCL21 von den HEVs selbst exprimiert, CCL19 hingegen durch Transendozytose auf die basolaterale Oberfläche des Endothels transportiert wird. Auf afferenten Lymphkapillaren der Lymphknoten konnte ebenfalls CCL21 nachgewiesen werden, wodurch Antigen-erfahrene reife DCs in den Lymphknoten dirigiert werden (Baekkevold et al., 2001; Kriehuber et al., 2001; Luster, 2002; Nakano und Gunn, 2001; Okada et al., 2002; Vassileva et al., 1999). Neben der konstitutiven Expression der homöostatischen Chemokine kann die Expression von CCL19 *in vitro* durch LPS in dendritischen Zellen induziert werden, und in Neuronen konnte die Expression von CCL21 über Hypoxie induziert werden (Sallusto et al., 1999b; Vassileva et al., 1999).

Die Migration z.B. naiver T-Zellen in die unterschiedlichen lymphatischen Organe wird über CCL19 oder CCL21 gesteuert. Im Gewebe selbst spielen die Chemokine CCL19 und CCL21 in der T-Zellzone bei der Initiierung einer Immunantwort eine wichtige Rolle, indem sie naive T-Zellen und dendritische Zellen zusammenbringen (Butcher und Picker, 1996; Förster et al., 1999; Springer, 1994). In *plt*-Mäusen (*paucity of lymph node T-cells*) ist eines von zwei CCL21-Genen, das CCL21a (CCL21-ser), und das CCL19-Gen deletiert. In *plt*-Mäusen wird CCL21b (CCL21-leu), welches in gleicher Weise die Lymphozyten-Rekrutierung induzieren kann, von lymphatischen Gefäßen nicht-lymphoiden Gewebes weiterhin exprimiert (Nakano und Gunn, 2001; Vassileva et al., 1999). Die *plt*-Mäuse haben durch die Deletion einen Phänotyp vergleichbar der CCR7^{-/-}-Maus, d.h. sie haben eine erhöhte Zahl von T-Zellen im Blut, andererseits eine reduzierte Zahl von T-Zellen im Lymphknoten, PP und in der weißen Pulpa der Milz; auch ist die Immunantwort verzögert. In *plt*-Mäusen gilt es zu beachten, daß murines CCL21 auch an CXCR3 bindet, somit beschränkt sich der *plt*-Phänotyp nicht nur auf die Stimulation von CCR7-exprimierenden Zellen (Girard und Springer, 1995a; Henning et al., 2001; Mori et al., 2001; Nakano und Gunn, 2001; Vassileva et al., 1999).

Beim Menschen befinden sich die Chemokine CCL19 und CCL21 am Genlocus 9p13 und haben offene Leseraster aus 297 bp (CCL19) bzw. 402 bp (CCL21) (Nagira et al., 1997; Yoshida et al., 1998b; Yoshie et al., 1997). Die Sequenzen kodieren basische Polypeptide mit einer Länge von 98 (CCL19) und 134 (CCL21) Aminosäuren mit einem N-terminalen Signalpeptid von 21 (CCL19) bzw. 23 (CCL21) Aminosäuren. CCL21 besitzt im Vergleich zu

CCL19 einen verlängerten basischen C-Terminus und kann damit verstärkt an Heparin (hoch sulfatiertem Glykosaminoglykan) binden (Patel et al., 2001).

Für die Funktion von CCL19 und CCL21 wurde gezeigt, daß die Chemokine nach CCR7-Bindung auf unterschiedlichen Zellen mitogene Signalwege, Integrine wie $\alpha 4\beta 7$ und Chemokin-induzierte Migration aktivieren (Banas et al., 2002; Campbell et al., 1998; Gunn et al., 1998; Sullivan et al., 1999).

1.3 Modulatoren der Chemokin-induzierte Migration

Eine Vielzahl verschiedener chemotaktischer Moleküle induziert die Migration von Zellen. Zu diesen Molekülen gehören neben den Chemokinen auch N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), *platelet activating factor* (PAF), Leukotriene, Lysophospholipide wie Sphingosin-1-Phosphat, Galektine und der Komplementfaktor C5a (Bautz et al., 2001; Ebrahimzadeh et al., 2000; Montrucchio et al., 2000; Paik et al., 2001; Rabinovich et al., 2002; Rainard, 2002). Neben der Aktivierung der chemotaktischen Rezeptoren konnte in Fibroblasten gezeigt werden, daß die kleinen G-Proteine der Rho-Familie an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind und damit entscheidend auf die Migration einwirken. Rho bündelt Aktin-Filamente zu Streßfasern und ist an der Ansammlung von Integrinen in *clustern* auf der Zelloberfläche beteiligt. Rac ist an der *de novo* Polymerisierung von Aktin an der Peripherie der Zelle zur Bildung von Lamellipodien und *membrane ruffles* beteiligt, während Cdc42 die Polymerisation von Aktin zur Bildung von Filopodien und Mikrospiques reguliert (Machesky und Hall, 1997; Nobes und Hall, 1995; Ridley et al., 1992). Die kleinen G-Proteine sind nicht nur an Migrationsprozessen, sondern, wie für Rho C gezeigt wurde, sogar an der Metastasierung beteiligt, begünstigt durch Veränderungen der Zellform und Polarisierung (Clark et al., 2000).

Nicht nur über Agonisten-abhängige Stimulation der Chemokinrezeptoren kann die Migration reguliert werden, sondern auch über die Aktivität der Rezeptoren. Die Aktivität ist nicht nur von der Expressionsstärke der Chemokinrezeptoren abhängig, sondern auch von regulatorischen Faktoren wie RGS (*regulator of G-Protein signalling*)-Proteinen, so genannten GTPase Aktivatoren (GAPs) (Hepler et al., 1997). Die RGS-Proteine regulieren die GTPase-Aktivität von G-Proteinen und verkürzen die Signaldauer der $G\alpha$ -Untereinheit, indem sie die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit erhöhen (Dohlman und Thorner, 1997; Reif und Cyster, 2000). Somit kann schnell neues GTP von der $G\alpha$ -Untereinheit gebunden werden und $G\alpha$ wieder mit $G\beta\gamma$ zu $G\alpha\beta\gamma$ -Komplexen assoziieren. Es wurde gezeigt, daß RGS-Proteine negativ auf die CCL19- oder CXCL13-vermittelte Migration von B-Zellen wirken und somit für die Positionierung von Antigen-erfahrenen B-Zellen im lymphatischen Gewebe eine Rolle spielen (Reif und Cyster, 2000). Damit wären RGS-Moleküle und Heparin/ Heparan-Sulfat ähnlichen Glykosaminoglykane für die Feinsteuerung der CCR7-vermittelten Migration als potentielle Modulatoren verantwortlich (Bardi et al., 2001; Hirose et al., 2002).

1.4 Das immunmodulatorische Molekül FTY720

Das synthetische Molekül FTY720 (*2-amino-2-[2-(4-octylphenyl) ethyl] propane-1,3-diol*) ist ein Derivat des aus Kulturen des Ascomyzeten *Isaria sinclairii* isolierten Metaboliten ISP-1 (Myriocin). FTY720 besitzt eine hohe Strukturähnlichkeit mit dem Sphingosin, wobei beide Moleküle über Sphingosin-Kinasen phosphoryliert werden können (Abb. 2) (Brinkmann und Lynch, 2002). Eine orale Applikation von FTY720 führt in verschiedenen Spezies zur raschen reversiblen Depletion der Blutlymphozyten (Lymphopenie) und gleichzeitig zur Akkumulation der Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe wie peripheren Lymphknoten und Peyer'schen Plaques (PPs). Die immunmodulatorische Substanz FTY720 verhindert zudem das Einwandern von Lymphozyten in Transplantate und kann daher potentiell zur Therapie von verschiedenen Autoimmunkrankheiten wie Rheumatischer Arthritis oder Multipler Sklerose eingesetzt werden (Brinkmann et al., 2001a; Suzuki et al., 1998; Wang et al., 1998b). Andererseits unterdrückt FTY720 die Rezirkulation der in den lymphatischen Organen angereicherten Lymphozyten. Dabei werden die Lymphozyten auf der abluminalen Seite des lymphatischen Endothels zurückgehalten und können nicht in den lymphatischen Sinus migrieren, wodurch der Austritt aus dem lymphatischen Gewebe kontrolliert wird (Mandala et al., 2002).

Obwohl die orale Behandlung mit FTY720 eine Lymphopenie verursacht und auch die Zahl der zytotoxischen T-Zellen (CTLs) in peripheren Geweben reduziert, inhibiert FTY720 weder die zelluläre noch die humorale Immunantwort, d.h. weder die Aktivierung noch die Proliferation von B- und T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen (Pinschewer et al., 2000).

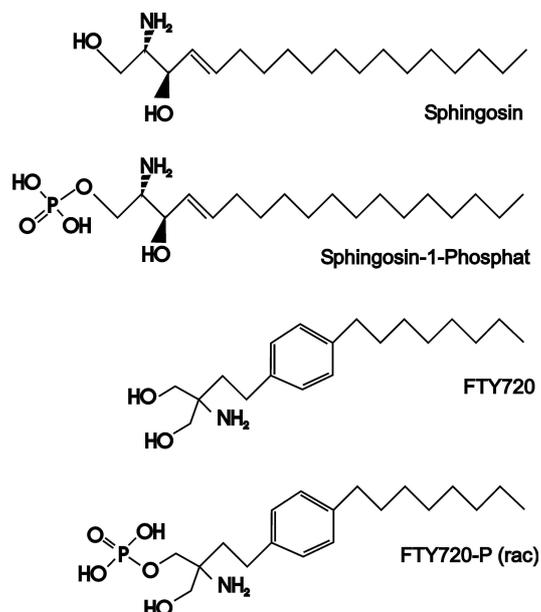


Abb. 2: Strukturvergleich der un- und phosphorylierten Form von Sphingosin mit der un- und phosphorylierten Form von FTY720 (Brinkmann und Lynch, 2002).

Die Tatsache, daß FTY720 das *homing* von Lymphozyten reguliert, bekräftigt die Vermutung, daß *homing*-Rezeptoren wie die Chemokinrezeptoren CXCR5 oder CCR7 direkt oder indirekt am Wirkmechanismus von FTY720 beteiligt sind. Zudem konnte in Transferexperimenten

gezeigt werden, daß das FTY720-induzierte *homing* in lymphatische Organe durch Behandlung mit Pertussis-Toxin (Ptx) inhibiert werden konnte. Möglicherweise inhibiert Pertussis-Toxin (Ptx) die FTY720-induzierte Aktivierung von GPCRs oder Integrinen. Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß die CCR7- und CXCR5-vermittelte Migration durch Behandlung mit Ptx inhibiert werden kann (Kim et al., 1998; Müller und Lipp, 2001). Andererseits könnte auch ein CXCR5- und CCR7-unabhängiger Mechanismus vermutet werden, so daß FTY720 auch direkt über eine Aktivierung von G α i der Lymphozyten oder über stimulierte Endothelzellen wirken kann (Brinkmann et al., 2001a; Brinkmann et al., 2001b; Chiba et al., 1998).

1.5 Metastasierung von soliden Brusttumoren

Maligne Brustkrebszellen weisen ein spezifisches Metastasierungsmuster auf, wobei bevorzugt Lymphknoten, Knochenmark, Leber und Lunge betroffen sind. An dem Prozeß der Metastasierung sind eine Vielzahl von Faktoren wie Proteasen, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, Zytokine und angiogene Moleküle (z.B. angiogene Chemokine oder angiogene Wachstumsfaktoren) beteiligt. Im Zusammenspiel dieser unterschiedlich wirkenden Moleküle kann sowohl die Tumorprogression als auch das Metastasierungspotential beeinflußt werden (Karkkainen und Alitalo, 2002; Meiners et al., 1998; Moor, 2001; Reuning et al., 1998; Skobe et al., 2001; Wang et al., 1998a). Bezüglich der organspezifischen Metastasierung gab es bis jetzt zwei gängige Modelle, die dieses Phänomen erklärten: 1) invasive Tumorzellen bilden nur Metastasen in Organen mit einer Mikroumgebung, die das Wachstum und Überleben der Tumorzellen fördern, und 2) organspezifische Endothelzellen rekrutieren Tumorzellen über die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle. Da Tumore verstärkt Chemokinrezeptoren exprimieren, kann als ein weiteres Modell vermutet werden, daß organspezifische Chemokine die Invasion von Tumorzellen in diese Organe lenken.

1.5.1 Tumorprogression bei Karzinomen

Ein solider Primärtumor wie das Karzinom entsteht entweder aus terminal differenzierten Epithelzellen durch Akkumulation von Mutationen, beispielsweise in Tumorsuppressorgenen, wie Rb und BRCA (Kinzler und Vogelstein, 1996; Knudson, 1993), oder aus undifferenzierten Stammzellen, die im Reifungsprozeß blockiert bzw. eingefroren sind (Sell und Pierce, 1994). Um eine hohe Teilungsrate zu gewährleisten, exprimieren die neoplastischen Zellen verstärkt angiogene Faktoren, die das Karzinom an den vorhandenen Blut- und Lymphkreislauf anschließen (Abb. 3). Dadurch wird die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen und eine Entsorgung von Abfallprodukten gewährleistet. Die Neovaskularisierung fördert nicht nur die Durchblutung des Tumors, sondern auch die Verteilung von Tumorzellen, die sich vom Primärtumor losgelöst haben. Über Blut- oder Lymphgefäße in der Peripherie des Primärtumors verteilen sich dann die dissoziierten Tumorzellen im Organismus und können schließlich Metastasen in verschiedenen Organen bilden. Der Angiogenese-

Prozeß wird durch verschiedene direkte oder indirekte angiogene Faktoren wie Zytokine (z.B. IL-6), Wachstumsfaktoren aus der VEGF-Familie (z.B. VEGF-A, -B und -C), löslichen endothelialen Adhäsionsmolekülen (z.B. sEAM) und angiogenen Chemokinen (z.B. CXCL8) ausgelöst (Folkman, 1992; Karkkainen et al., 2001; Koch et al., 1995; Mandriota et al., 1995; Olson und Ley, 2002). Entscheidend bei der Tumorentwicklung ist, daß die Balance von angiogenen und angiostatischen Molekülen zugunsten angiogener Moleküle gestört ist, was sich fördernd auf die Neovaskularisierung und damit auf das Tumorwachstum auswirkt (Gershenwald und Fidler, 2002; Strieter et al., 1995a).

1.5.2 Dissoziation vom Tumorverband

Die Metastasierungskaskade wird von einer Vielzahl von Molekülen beeinflusst und gesteuert, die wiederum die dafür notwendigen physiologischen Prozesse wie in Abb. 3 dargestellt regulieren. Bei der Invasion machen sich maligne Karzinome Mechanismen zunutze, die 1. in der Embryonalentwicklung, zum Beispiel bei der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT), 2. bei der Wundheilung oder 3. bei der Rekrutierung von Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe, beispielsweise bei der transendothelialen Migration (TEM), eine Rolle spielen (Boyer et al., 2002; Boyer et al., 2000).

Maligne Tumorzellen zeigen in der Regel eine erhöhte Zellmotilität, die mit der Abnahme von interzellulären Verbindungen durch die Niederregulierung von Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise E-Cadherin einhergeht (Engers und Gabbert, 2000; Kurschat und Mauch, 2000; Meiners et al., 1998). Der Erwerb mesenchymaler Eigenschaften und der zunehmende Verlust des Differenzierungsgrads der epithelialen Tumorzellen bezeichnet man als Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) (Boyer et al., 2000; Boyer et al., 2002; Meiners et al., 1998). Die EMT wird als wichtige Voraussetzung für den Prozeß der Intravasation (Eintritt in das Blut-/ Lymphsystem) und der Invasion (Migration von Tumorzellen in das umliegende Gewebe) angesehen. Dieser Schritt markiert die Organisation von Tumorzellen, in dem sich ein Tumorverband hin zu Aggregaten aus Einzelzellen entwickelt und mit einer veränderten phänotypischen und funktionellen Plastizität einhergeht. Nach der EMT lösen sich Zellen aus dem Tumorverband ab und können über die Blut- oder Lymphbahnen im Organismus verteilt werden. Die Umstrukturierung der Zytoskelett-Komponenten, wie für das Intermediär-Filament Vimentin beschrieben, und die Struktur des Aktin-Netzwerkes korreliert in vielen Fällen mit dem Grad an Malignität und bestimmt zudem die Zellmotilität. Aktin-Polymerisierung ist auch später für die Bildung von Pseudopodien und für die Invasion der Zellen in das Gewebe notwendig (Hendrix et al., 1996; Kirschmann et al., 1999; Kucharzik et al., 1998; Sim et al., 1999).

Ein besonderer ubiquitärer Bestandteil der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche das Heparin/ Heparan-Sulfat ähnliche Glykosaminoglykan (HSGAG) ist in der Lage das maligne Wachstum zu beeinflussen, da er Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine binden kann, die eine Heparin-Bindungsdomäne enthalten. Dadurch werden die Faktoren in hoher

Konzentration angesammelt, manche sogar polymerisiert, durch Konformationsänderung aktiviert und gegenüber chemischer und physiologischer Degradation geschützt. Die Akkumulation von gebundenen Chemokinen und Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche führt vermutlich zu einer verstärkten mitogenen oder chemotaktischen Antwort von Zellen, die entsprechende Rezeptoren exprimieren (Capila und Linhardt, 2002; Olson und Ley, 2002).

1.5.2.1 Beeinflussung der Tumorprogression durch autokrin- und parakrin-wirkende Chemokine

Während die vorliegende Doktorarbeit durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, daß auf verschiedenen Tumorentitäten wie den Brustkrebszellen verschiedene Chemokinrezeptoren erhöht exprimiert werden, und es wurde deshalb vermutet, daß die Tumorzellen aufgrund der lokalen Expression der entsprechenden Chemokine in distinkte Organ einwandern und metastasieren (Moore, 2001; Wang et al., 1998a). Das von Müller *et al.* (2001) verwendete Mausmodell unterstützt die Hypothese, daß die Infiltration von Brustkrebszellen in bestimmte Organe über lokal exprimierte Chemokine gesteuert wird, wobei die Tumorzellen in diesem Modell den Chemokinrezeptor CXCR4 überexprimieren. Die Chemokine sind dabei am Endothel der infiltrierten Organe gebunden und können Zellen an diesen Positionen mit hoher Ligandenkonzentration in die Organe dirigieren. Im Organ können die Zellen dann weiter über neue Gradienten positioniert werden.

Ferner könnten Chemokine als Wachstumsfaktoren für verschiedene Tumorentitäten wirken, wie es beispielsweise für CXCL1 und CXCL8 bei Melanomzellen gezeigt wurde (Fujisawa et al., 2000; Schadendorf et al., 1993; Ye, 2001). Tumorzellen, die sich aus dem Tumorverband lösen, können nach gerichteter Einwanderung in Gewebe oder Organe Metastasen bilden, sofern diese eine geeignete Mikroumgebung bilden. Die Proliferation metastasierender Tumorzellen in infiltrierten Geweben kann dann entweder durch autokrine- oder durch gewebespezifische, parakrin-wirkende Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Chemokine ausgelöst werden. Zu den autokrin-wirkenden Chemokinen zählen z.B. die Chemokine CXCL8, die von einer Reihe von Tumorzellen exprimiert werden (Dhawan und Richmond, 2002; Shimonaka und Yamaguchi, 1994). Parakrin-wirkende Chemokine in der Lunge und Lymphknoten sind beispielsweise CCL21 oder CXCL12, das in der jeweiligen Mikroumgebung des Organs oder dem Endothel exprimiert wird (Müller et al., 2001), oder der Wachstumsfaktor TGF- β , der von rekrutierten Makrophagen in den von Tumorzellen befallenen Organen exprimiert wird (Dalal et al., 1993; Ronnov-Jessen und Petersen, 1993).

Vereinzelt finden sich Daten zur Koexpression homöostatischer Chemokine und ihrer Rezeptoren, wie beispielsweise in MALT-Lymphomen und primären ZNS-Lymphomen, die endogen CXCL13 und CXCR5 exprimieren. Es ist anzunehmen, daß CXCL13 im Tumorgewebe autokrin auf die Tumorzellen wirkt und an der neoplastischen Transformation beteiligt ist (Mazzucchelli et al., 1999; Smith et al., 2002). Ein ähnliches Beispiel für inflammatorische Chemokine wurde für die chronische lymphatische Leukämie (CLL)

beschrieben, wo B-Zellen CXCR3 und CXCL9 koexprimieren (Trentin et al., 1999). Für die Brustkrebszelllinie MCF-7, die CCL5 und CCR5 koexprimiert, konnte gezeigt werden, daß die Brustkrebs-Progression über eine parakrine wie autokrine Stimulation von CCR5 gefördert werden kann. Beispiele für den parakrinen Einfluß von CCL5 sind: 1. erhöhte Vaskularisierung des Tumor, 2. die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IFN- γ und TNF- α , und 3. die Migration Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) in den Tumor, welche Wachstumsfaktoren, TNF- α , angiogene Faktoren und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) exprimieren. Es wurde gezeigt, daß die MMP-Produktion auf den Tumorzellen über TNF- α , Integrin-Aktivierung oder über autokrin-wirkende Chemokine wie CCL5 erhöht werden kann (Azenshtein et al., 2002; Kurschat et al., 1999).

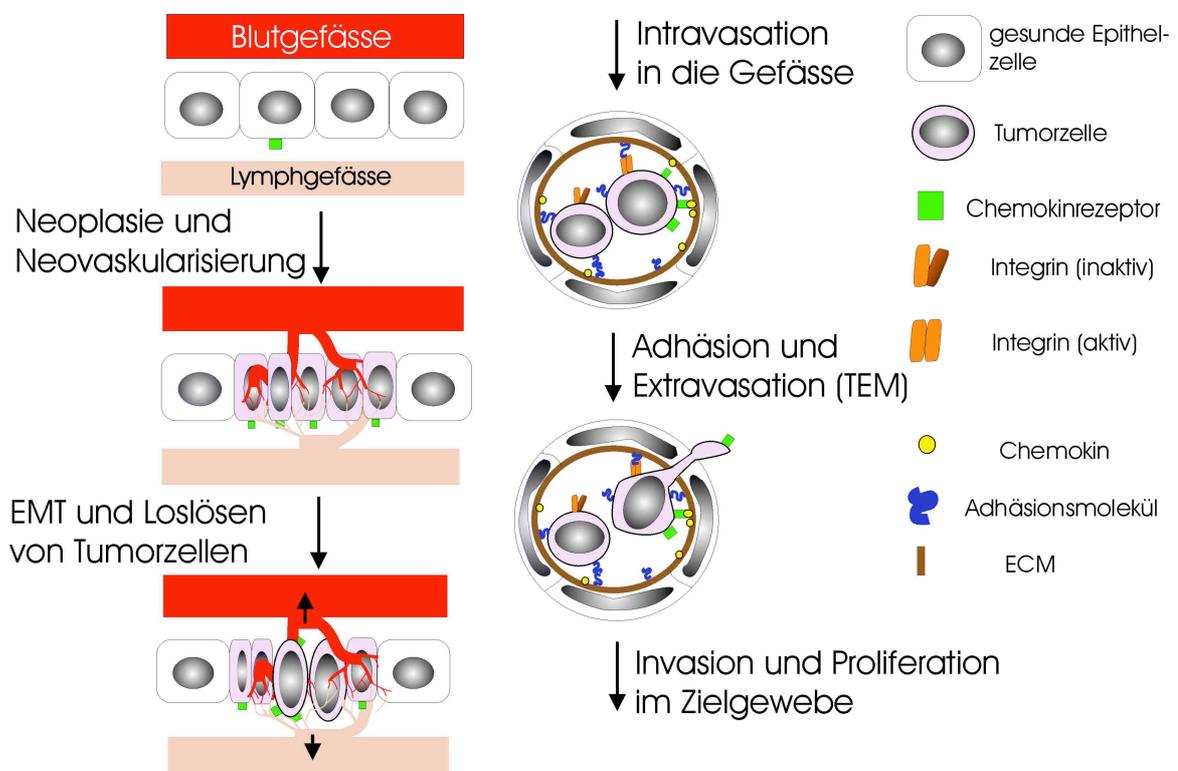


Abb. 3: Schematische Darstellung des Prozesses der Metastasierung in Verbindung mit dem Chemokin-System. Für die Entstehung von Metastasen müssen Tumorzellen verschiedene restriktive Stadien durchlaufen, bevor sie in verschiedenen Organen wieder neu anwachsen können und sich damit Fernabsiedlungen des Primärtumors etablieren. Zu Beginn der Tumorentstehung zeigen die Tumorzellen eine erhöhte Teilungsrates und angiogene Stimulation der umliegenden Blut- und Lymphgefäße. Tumorzellen, die sich aus dem Tumorverband lösen, z.B. aufgrund einer Transformation (EMT) bzw. des Verlustes interzellulärer Adhäsion, verteilen sich über Blut- und Lymphsystem im Körper. Die disseminierten Tumorzellen adhären dann beispielsweise über verschiedene Adhäsionsmoleküle im Endothel verschiedener Organe. Im nächsten Schritt kann das Organ über das Endothel hinweg infiltriert werden. Es kann angenommen werden, daß sowohl Chemokinrezeptoren verschiedene Integrine für die feste Adhäsion der Tumorzelle am Endothel aktivieren, als auch ein hapto- oder chemotaktischer Gradient die Migration (TEM) in das Organ steuert. EMT: Epitheliale-Mesenchymale-Transition; TEM: Transendotheliale Migration.

Vereinzelt finden sich Daten zur Koexpression homöostatischer Chemokine und ihrer Rezeptoren, wie beispielsweise in MALT-Lymphomen und primären ZNS-Lymphomen, die

endogen CXCL13 und CXCR5 exprimieren. Es ist anzunehmen, daß CXCL13 im Tumorgewebe autokrin auf die Tumorzellen wirkt und an der neoplastischen Transformation beteiligt ist (Mazzucchelli et al., 1999; Smith et al., 2002). Ein ähnliches Beispiel für inflammatorische Chemokine wurde für die chronische lymphatische Leukämie (CLL) beschrieben, wo B-Zellen CXCR3 und CXCL9 koexprimieren (Trentin et al., 1999). Für die Brustkrebszelllinie MCF-7, die CCL5 und CCR5 koexprimiert, konnte gezeigt werden, daß die Brustkrebs-Progression über eine parakrine wie autokrine Stimulation von CCR5 gefördert werden kann. Beispiele für den parakrinen Einfluß von CCL5 sind: 1. erhöhte Vaskularisierung des Tumor, 2. die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. IFN- γ und TNF- α , und 3. die Migration Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) in den Tumor, welche Wachstumsfaktoren, TNF- α , angiogene Faktoren und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) exprimieren. Es wurde gezeigt, daß die MMP-Produktion auf den Tumorzellen über TNF- α , Integrin-Aktivierung oder über autokrin-wirkende Chemokine wie CCL5 erhöht werden kann (Azenshtein et al., 2002; Kurschat et al., 1999).

Chemokinrezeptoren die konstitutiv aktiv sind, z.B. über eine autokrine Stimulation, sind sowohl an der Proliferation als auch an der Transformation von Zellen beteiligt. Bei Epithelzellen nennt man diese Transformation Epitheliale-Mesenchymale-Transition. Ein Beispiel für konstitutiv aktive GPCRs ist der ORF74 vom Karposi-Sarkom assoziierten Herpesvirus HHV-8. Dieser virale Rezeptor besitzt hohe Homologie zu CXCR2 und transformiert NIH3T3-Zellen in Nacktmäusen (Bais et al., 1998). In bezug auf die Expressionshöhe von autokrin-wirkenden CXCL8 stellte man in Studien fest, daß mit zunehmender Expressionshöhe die Malignität des Primärtumors anstieg (De Larco et al., 2001; Green et al., 1997). Im Gegensatz zu einigen inflammatorischen Chemokinen ist über die Wirkung autokrin-wirkender homöostatischer Chemokine wie CCL19 oder CCL21 auf das Metastasierungspotential von Brustkrebszellen nichts bekannt.

1.5.3 Migration von Tumorzellen über das Endothel

Für die Infiltration von Geweben mit Tumorzellen, z.B. mit Brustkrebszellen, gibt es verschiedene Modelle der Extravasation aus den Blut- und Lymphgefäßen. Die Interaktion von streuenden Tumorzellen mit dem Endothel der Blut- und Lymphgefäße und dem Gewebestroma wird als kritischer Schritt in der Metastasenbildung angesehen. Essentielle Elemente bei der Tumorzell-Invasion sind die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle, die Migrationsfaktoren und verschiedene Proteinasen. Das bedeutet, daß Tumorzellen in den dünnen Blut- oder Lymphkapillaren entweder arretieren, indem sie sich mechanisch verkeilen (1), oder es kommt zu schwachen und transienten Wechselwirkungen zwischen Endothel und Tumorzelle aufgrund reversibler Bindungen zwischen Adhäsionsmolekülen (2) (Salmi und Jalkanen, 1997). Daraufhin hat die Tumorzelle mehrere Möglichkeiten, die Organe zu infiltrieren und dort Metastasen zu bilden:

1. Arretierte Tumorzellen durchdringen das Endothel der Blutkapillare und invasieren in das subendotheliale bindegewebige Stroma (Lissitzky et al., 1985). Proteinasen, wie Matrix-Metalloproteasen und Serinproteasen, degradieren dabei die Basalmembran und die Bestandteile des interstitiellen Bindegewebes, indem sie die extrazelluläre Matrix (ECM) abbauen (Abb. 3). Eine Voraussetzung für die Infiltration bindegewebiger Strukturen ist die Expression von Adhäsionsmolekülen, die an Bestandteilen der ECM binden. Dabei korreliert in vielen Tumoren die Tiefe des Eindringens direkt mit der Expressionsstärke von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (CD54) (Collins und White, 1995; Johnson, 1991; Yu et al., 2000) oder Fibronectin-bindendem Integrin $\alpha\beta 3$ (Albelda und Buck, 1990; Natali et al., 1997).
2. Die gerichtete Migration von Tumorzellen über das Endothel kann möglicherweise unter der Berücksichtigung der Beteiligung von Chemokinrezeptoren mit der transendothelialen Migration (TEM) von Lymphozyten verglichen werden. Die Extravasation von Lymphozyten aus den Blutkapillaren erfolgt in der Milz über spezialisierte Endothelien oder in PPs und Lymphknoten über hochendotheliale Venolen (HEVs) (Luster, 2002). Während des Prozesses (TEM) kommt es zu reversiblen Wechselwirkungen der Lymphozyten oder Tumorzellen mit dem Endothel über Adhäsionsmoleküle wie CD62L oder CD62E; damit gelangen die Zellen in räumliche Nähe zu Chemokinen, die auf der Oberfläche von Endothelzellen präsentiert werden. Eine Vielzahl von Chemokinen werden auf dem Endothel lymphatischer Organe und der Lunge an HSGAGs gebunden und stimulieren entsprechende Chemokinrezeptoren auf infiltrierenden Zellen. So könnte CCL21 über CCR7, exprimiert z.B. auf T-Zellen oder Tumorzellen, eine feste Adhäsion über aktivierte $\alpha 4$ - oder $\beta 2$ -Integrine induzieren. Die Integrin-abhängige feste Anheftung an das Endothel wird dann meist über Mitglieder der Ig-Superfamilie vermittelt (Ben Baruch et al., 1995; Butcher, 1991; Gunn et al., 1998; Oppenheim et al., 1991; Schall und Bacon, 1994; Tangemann et al., 1998).