

7 Zusammenfassung

Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle als immunologische Regulatoren für die Migration funktionell unterschiedlicher T- und B-Zellen sowie dendritischer Zellen in lymphatische Organe. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß homöostatische Chemokine und ihrer Rezeptoren für die Disseminierung von Tumorzellen in lymphatische Organe von Bedeutung sind. Der Chemokinrezeptor CCR7 wird beispielsweise nicht nur auf B- und T-Zellen, sondern auch auf Zellen vieler hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Tumoren exprimiert. Im Gegensatz zu seiner Funktion beim *homing* von Lymphozyten ist seine Funktion im Zusammenhang mit der Disseminierung und Metastasierung von Tumorzellen, sowie die Bedeutung von autokriner und parakriner Stimulation der Zellen über CCR7 wenig bekannt.

Um das metastatische Potential von CCR7 *in vivo* zu bestimmen, wurden humane MDA-MB435S1 Brustkrebszellen stabil mit CCR7 oder alternativ mit CCR7 und einem seiner spezifischen Liganden, CCL19 oder CCL21, transfiziert. Die Koexpression von CCR7 und CCL19 kann *in vitro* die CCR7-vermittelte migratorische Aktivität dieser Zellen gegenüber rekombinanten CCL19 oder CCL21 modulieren.

Weiterhin wurden stabil exprimierende Brustkrebszellen für Kurzzeitmigrationsexperimente intravenös in BALB/c-Mäuse oder für die organspezifische Migration in die Lunge oder drainierenden Lymphknoten orthotop in das Mammafettpolster von Nacktmäusen appliziert. Nacktmäuse mit Tumoren, die ektopisch CCR7 exprimierten zeigten keine verstärkte Bildung von Lungen-Metastasen gegenüber Tumoren, die aus der Parentalzelllinie entstanden. Ebenso hatte die Koexpression von CCR7-CCL19 oder CCR7-CCL21 keinen signifikanten Einfluß auf das Metastasierungspotential dieser Zellen in der Lunge. Dieses Ergebnis wird durch Kurzzeitmigrationsexperimente in BALB/c-Mäuse zusätzlich belegt, die der Expression von CCR7 oder der Koexpression mit seinen Liganden keine Bedeutung in bezug auf die Wanderung von Tumorzellen in die Lunge zuweisen. Nach einer i.v. Injektion von CCR7-CCL19- oder CCR7-CCL21-koexprimierender Tumorzellen wurde nach 3 Stunden keine signifikante Migration zu den axilären Lymphknoten gegenüber einfach-CCR7-exprimierender Zellen beobachtet. Lediglich Primärtumore, die CCR7 und CCL21 koexprimierten, bildeten in einzelnen Fällen Metastasen in den drainierenden Lymphknoten. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, daß die Infiltration der Lunge

mit Brustkrebszellen unabhängig von der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 reguliert wird. Da die Koexpression von CCR7 und CCL21 nur vereinzelt zur Bildung von Metastasen im axilären Lymphknoten führt, bleibt die Bedeutung der Koexpression für die organspezifische Metastasierung daher noch weiter abzuklären.

Die Chemokinrezeptoren CXCR5 und CCR7 sind wichtige Mediatoren für das *homing* von Lymphozyten in sekundärer lymphatischer Organe. Deshalb sollte geklärt werden, ob diese Rezeptoren eine Rolle bei der FTY720-induzierten Lymphopenie, die mit einer Akkumulation von Lymphozyten in peripheren Lymphknoten und Peyer'schen Plaques einhergeht, spielen.

Die FTY720-induzierte Lymphopenie nach oraler Gabe von FTY720 war in CXCR5^{-/-}-Mäusen vergleichbar zu der von Wildtyp-Mäusen. Aus diesem Grund erfolgt die FTY720-induzierte Lymphopenie wahrscheinlich unabhängig von CXCR5. Interessanterweise wurde beobachtet, daß die Kinetik der Lymphopenie nach oraler Administration von FTY720 in CCR7^{-/-}- gegenüber Wildtyp-Mäusen verlangsamt war. Im Unterschied zu Wildtyp-Mäusen, in denen eine Akkumulation von Lymphozyten in brachiale Lymphknoten und Peyer'schen Plaques nach Gabe von FTY720 beobachtet wurde, war die Lymphozytenzahl in den brachialen Lymphknoten von CXCR5^{-/-}-Mäusen und in den PPs von CCR7^{-/-}-Mäusen nach Behandlung mit FTY720 reduziert. Der Grund für diese Effekte ist bis jetzt nicht bekannt, da es keinen Hinweis auf eine direkte Wechselwirkung von FTY720 an CXCR5 oder CCR7 gibt. Aus diesen Grund könnte eine gestörten Entwicklung bzw. veränderte Gewebestruktur dieser sekundären lymphatischen Organe der *knockout*-Mäuse diese FTY720-induzierten Effekte begründen.

Da kürzlich gezeigt wurde, daß die *in vivo* phosphorylierte Form von FTY720 an verschiedene Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren bindet, sind diese Rezeptoren potentielle Kandidaten, die neben den Chemokinrezeptoren das FTY720-induzierte *homing* von Lymphozyten steuern. Die hier präsentierten Ergebnissen legen nahe, daß FTY720 möglicherweise nicht nur die Chemokinrezeptor-induzierte transendotheliale Migration, sondern auch die Emigration von Lymphozyten aus den sekundären lymphatischen Organen beeinflussen kann.

Summary

Chemokines and their receptors play a critical role as principal regulators for targeting functionally distinct subsets of T cells, B cells, and dendritic cells into secondary lymphoid organs. In addition, evidence accumulates for the involvement of the homeostatic chemokine system in the dissemination of neoplastic cells in lymphoid malignancies and cancer metastases. It has been found that the chemokine receptor CCR7 is expressed on different subsets of T cells and B cells as well as on malignant cells of breast cancer, melanoma, and gastric carcinoma. Despite the well characterized function of CCR7 in the homeostatic regulation of lymphocyte homing, little is known about its impact on metastasis formation of breast cancer cells dependent on paracrine and autocrine stimulation of CCR7.

To determine the metastatic potential of CCR7 *in vivo*, human MDA-MB435S1 breast cancer cells were stably transfected with CCR7 alone or in combination with one of its specific ligands CCL19 or CCL21. It has been shown that co-expression of CCR7 and one of its ligand CCL19 on breast cancer cells is able to increase the chemo- or haptotactic activity *in vitro* in response to recombinant CCL19 or CCL21. Stably transfected breast cancer cells were either applied intravenously into BALB/c mice for short-term migration experiments or into the mammary fat pad of nude mice in order to analyze organ-specific metastasis in the lung and draining lymph nodes. Despite the increased chemo- or haptotactic activity of breast cancer cells co-expressing CCR7 and CCL19 *in vitro*, trafficking of these cells in short-term experiments following adoptive transfer to the axillary lymph nodes (ALN) of tumor cells was not significantly enhanced.

Nude mice harbouring cells expressing CCR7 or co-expressing CCR7 and CCL19 or CCL21 did not show a higher incidence of pulmonary metastases. In some examples tumor cells co-expressing CCR7 and CCL21 infiltrated the draining ALN and were positioned within the interfollicular T cell areas, whereas breast cancer cells expressing CCR7 alone or in combination with CCL19 were not able to form metastases inside the draining lymph node. Taken together, these results support the hypothesis that the infiltration of the lung by breast cancer cells is not orchestrated by murine- or tumor-specific ligands of CCR7. However, the autocrine stimulation of CCR7 on breast cancer cells and the formation of tissue-specific metastases in the draining lymph node has to be further characterized.

The chemokine receptors CXCR5 and CCR7 are predominant mediators for lymphocyte homing into lymphoid organs. Therefore it was asked whether the lymphopenia induced by the synthetic immune modulator FTY720, which is associated with the accumulation of lymphocytes in peripheral lymph nodes and Peyer's patches (PP), is also mediated by these receptors.

The FTY720-induced depletion of lymphocytes from peripheral blood, following oral administration of FTY720 to CXCR5^{-/-} mice, was comparable to that in FTY720-treated wild-type mice, indicating a CXCR5-independent mechanism of FTY720-induced depletion of lymphocytes. Interestingly, FTY720-induced lymphopenia was delayed in CCR7-deficient mice. In contrast to the observed accumulation of lymphocytes in brachial lymph nodes (BLN) und Peyer's patches of wild-type mice, the number of lymphocytes in the BLN of CXCR5^{-/-} and PP of CCR7^{-/-}-mice is significantly reduced following FTY720-treatment. The direct cause of these effects is still not clear, as there is no evidence of FTY720 binding to either CXCR5 or CCR7. Therefore, fundamental alterations in lymphoid organ structure and function might be responsible for the observed changed homing behavior.

Recent results show that Sphingosine-1-phosphate (S1P)-receptors bind *in vivo* efficiently the *in vivo* phosphorylated form of FTY720, making S1P-receptors also plausible candidates for involvement in the FTY720-induced homing to secondary lymphoid organs. However, it still has to be resolved whether FTY720 not only affects the transendothelial migration induced by chemokines, but also the emigration of lymphocytes from secondary lymphatic organs.