

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Klinik für Augenheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. M. H. Foerster

Chemokine bei Aderhautmelanomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Bianca Dobner
aus Leipzig

Referent: Herrn Prof. Dr. med. Nikolaos E. Bechrakis

Korreferent: Frau PD. Dr. med. D. – G. Grimm

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin

Berlin

Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 19.09.2008

For my beloved Family

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einführung</i>	7
1.1	Die Anatomie des Auges	7
1.2	Das Aderhautmelanom	9
1.2.1	Befunde.....	10
1.2.2	Therapiemöglichkeiten.....	10
1.3	Klassifikation des Aderhautmelanoms	13
2	<i>Stand der Forschung</i>	16
2.1	Einleitung	16
2.2	Chemokine allgemein	16
2.3	Chemokinrezeptoren	17
2.4	Chemokine und Interaktionen	18
2.5	Chemokine speziell	20
2.6	Chemokine und Metastasierung	23
3	<i>Zielsetzung</i>	25

4	<i>Material und Methoden</i>	26
4.1	Geräte und Chemikalien	26
4.1.1	Geräte.....	26
4.1.2	Chemikalien.....	28
4.1.3	Herstellung.....	29
4.1.4	Antikörper.....	30
4.2	Methoden	31
4.3	Auswertung	33
4.4	Statistische Auswertung	34
4.5	Fehlerquellen	35
5	<i>Ergebnisse</i>	36
5.1	Allgemein	36
5.2	Chemokinrezeptor CXCR 4	44
5.3	Chemokinligand CCL 12	51
5.4	Chemokinrezeptor CCR 7	58

5.5	Chemokinligand CCL 19.....	65
5.6	Chemokinrezeptor CKR 10.....	72
5.7	Chemokinligand CCL 27.....	79
6	<i>Diskussion</i>	86
6.1	Allgemein.....	86
6.2	Chemokinrezeptor CXCR 4 und Chemokinligand CXCL 12.....	87
6.3	Chemokinrezeptor CCR 7 und Chemokinligand CCL 19.....	90
6.4	Chemokinrezeptor CKR 10 und Chemokinligand CCL 27.....	93
7	<i>Zusammenfassung</i>	95
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	97
9	<i>Danksagung</i>	104

1 Einführung

Die melanotischen Neubildungen sind die am häufigsten auftretenden Tumoren der Uvea. Je nach Differenzierungsstufe sind die gutartigen Tumoren (Melanozytome, Naevi) von dem bösartigen Melanom zu unterscheiden. Sie können in allen Teilen der Uvea auftreten. Die malignen Melanome breiten sich rasch aus und können das Auge und die Orbita infiltrieren, sowie zu Metastasen und schließlich zum Tod führen.

1.1 Die Anatomie des Auges

Das 24 Millimeter große Auge eines normalsichtigen Menschen besteht aus verschiedenen Strukturen, zu denen unter anderem die Netzhaut, die Aderhaut und der Ziliarkörper, welche man auch zusammen als Uvea bezeichnet, gehören. Die Uvea (auch Gefäßhaut genannt) liegt als mittlere Schicht (Tunica vasculosa) zwischen der Sklera und der Netzhaut. Sie besteht topographisch aus:

- Iris (Regenbogenhaut)
- Corpus ciliare (Ziliarkörper, Strahlenkörper)
- Choroidea (Aderhaut)

Die Iris regelt die Netzhautbelichtung durch den Tonus- und Sphinktermuskel, welcher parasymphatisch innerviert wird und durch den Dilatatormuskel, der eine sympathische Innervation aufweist. Das Pigmentepithel auf der Rückseite der Iris verhindert den Eintritt von aberrierendem nichtaxialem Licht und verbessert somit die Optik.

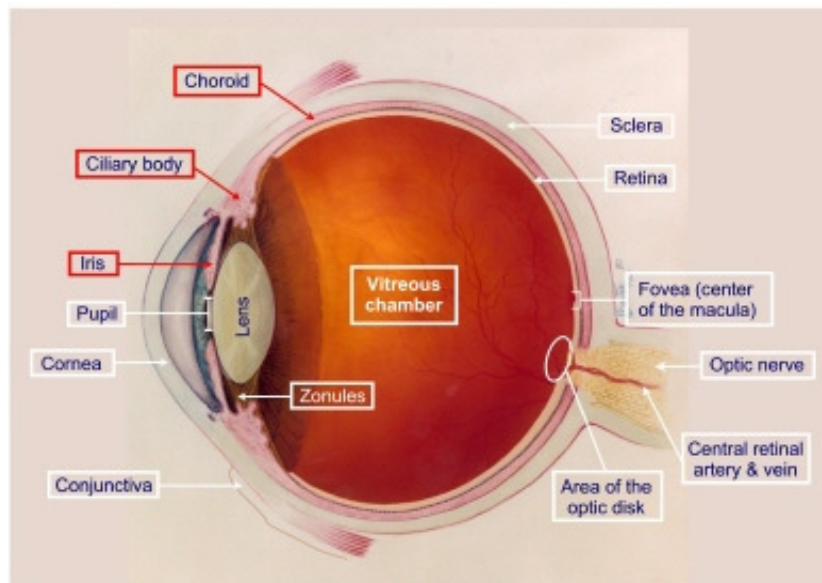


Abbildung 1.1.1. - schematische Darstellung des Auges (J. Kanski)

Der Ziliarkörper beinhaltet den Musculus ciliaris, welcher longitudinale, radiäre und zirkuläre Fasern aufweist und der Akkomodation dient. Er unterteilt sich zu 2/3 in die pars plana, die an die Ora serrata retinae grenzt und zu 1/3 in die pars plicata. Die Ziliarfortsätze des Ziliarkörpers weisen pigmentiertes und unpigmentiertes Epithel auf und sind für die Kammerwasserproduktion zuständig.

Die Aderhaut, auch Choroidea genannt, versorgt das retinale Pigmentepithel und die Photorezeptoren über die hinteren und vorderen Ziliararterien, die durch die A. Ophthalmica gespeist werden. Es besteht eine hohe Durchblutung (677 mg/min) mit einer arteriovenösen Sauerstoff-Differenz von nur 3%. Der Abfluss erfolgt über die vier Vortexvenen.

Alle drei Gewebe bilden eine morphologische Einheit, sind sehr gefäßreich und enthalten einen großen Anteil von Melanozyten [16, 26, 36].

1.2 Das Aderhautmelanom

Das maligne Melanom der Uvea ist bereits mehr als hundert Jahre bekannt. Schon am Anfang des letzten Jahrhunderts hat René Théophile Hyacinthe Laenec (1781-1826), ein berühmter Chirurg aus der Zeit der Napoleonischen Kriege und Erfinder des Stehtoskops (1819), diese pigmentierten Geschwülste als „Melanoses“ bezeichnet. Im Jahre 1863 führte Rudolph Virchow eine Studie des malignen Melanoms durch, deren Erkenntnisse hauptsächlich von der histopathologischen Struktur bzw. Klassifikation des Melanoms handelten. Er unterschied zwischen benignen Melanomata, Melano-Sarcomata und Melano-Carcinomata und zeigte, dass der Pigmentgehalt dieses Tumors von relativ geringer Bedeutung war. In den unmittelbar folgenden Arbeiten von Albrecht v. Graefe (1868) und Knapp (1868) wurden die histologischen Erkenntnisse von Virchow bestätigt. Im Jahre 1882 erschien die klassische detaillierte Monographie von Ernst Fuchs aus Wien, in der alle Details und Informationen bezüglich des Melanoms aus 259 Fällen einschließlich 22 eigener Fälle diskutiert wurden. Andere wichtige Beiträge zu diesem Thema wurden gegen Ende des letzten Jahrhunderts von Lawford und Collins (1891) aus Frankreich, Pawel (1899) mit 100 Fällen aus Halle und Kerschbaumer (1900) mit 67 Fällen aus Leipzig hinzugefügt. In den Beiträgen von Lagnange (1901) und Parsons (1905) wurden alle Erkenntnisse auf diesem Gebiet kritisch zusammengefasst und diskutiert. Dieser Wissenstand bildet die Basis unserer jetzigen Kenntnisse auf dem Gebiet des intraokularen Melanoms.

Die Einteilung der intraokularen Tumore in Melano- und Leukosarkom zum Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts (moderne Bezeichnung: melanotisch – amelanotisch) wurde, obwohl sie klinisch relevant ist, unter der Autorität von Virchow fallengelassen [40].

Das Aderhautmelanom ist der häufigste primäre intraokuläre Tumor des Erwachsenen und gehört dennoch zu den seltenen Tumoren des Menschen. Er wird meistens in der sechsten Lebensdekade manifest. In Westeuropa und den Vereinigten Staaten werden jährlich ca. 5-7 Neuerkrankungen / 1 Mio Einwohner diagnostiziert. Allein in Deutschland zählen wir jährlich 500 neue Fälle. Das Aderhautmelanom metastasiert aufgrund einer fehlenden lymphatischen Abflussmöglichkeit, ausschließlich hämatogen, was es vom Melanom der Haut unterscheidet, welches vorwiegend lymphogen metastasiert [5, 6, 16, 26, 36].

1.2.1 Befunde

Dieser langsam wachsende Tumor wird von Patienten meistens mit einhergehender Visusminderung oder Gesichtsfelddefekten, je nach Lage des Tumors in der Aderhaut, beschrieben. Die Funduskopie ergibt eine erhabene, subretinale, kuppelförmige, braune oder graue Raumforderung, welche häufig orangefarbenes Pigment (Liposfuszin) an ihrer Oberfläche aufweist. Das Aderhautmelanom kann pigmentiert oder amelanotisch sein. Die Gefahr des Tumors besteht primär im Verlust des Sehvermögens meist durch eine exsudative Netzhautablösung und sekundär durch die Fernmetastasierung, wobei das primäre Manifestationsorgan in 93% aller Fälle die Leber ist. Des Weiteren finden sich auch in geringerem Ausmaß Metastasen in der Lunge (24%) und in den Knochen (16%). Abhängig vom Zeitpunkt der Diagnose sowie der Größe und des Stadiums des Tumors findet sich eine Fernmetastasierung [5, 6, 26].

1.2.2 Therapiemöglichkeiten

Es gibt mehrere Therapiemöglichkeiten zur Behandlung des Aderhautmelanoms. Sie wird individuell auf den einzelnen Patienten abgestimmt. Dabei spielen die Faktoren der Größe, Lokalisation, Ausdehnung

des Tumors, sowie der allgemeine Gesundheitszustand eine entscheidende Rolle.

Die häufigste Behandlungsmethode ist die Brachytherapie bzw. die Bestrahlung des Tumors mit Strahlenträgern, sogenannten Applikatoren, die in einer OP aufs Auge aufgenäht werden. Man verwendet hierbei primär Ruthenium Applikatoren. Der Strahlenträger bleibt nur eine begrenzte Zeit im Auge, danach wird er in einer weiteren Operation entfernt. Durch die lokale Bestrahlung kann es je nach Lage und Größe des Tumors, zur Schädigung des Sehnerven und somit zum Visusverlust kommen. Als weitere häufige Nebenwirkungen sind hier auch die radiogene Cataract, radiogene Retinopathie, Optikusneuropathie und die Sicca-Symptomatik zu nennen. Bis heute werden viele verschiedene radioaktive Materialien verwendet, wie z.B. Iod-125 Gammastrahler. Cobalt-60 β -Strahler und in Gold eingekapseltes Radongas sind obsolet.

Eine weitere Möglichkeit ist die externe Strahlentherapie mit Protonen bzw. Helium-Ionen. Dabei wird in einer Operation ein begrenzter Bereich am Auge durch Clipaufnäher markiert und dann im Rahmen der Behandlung fraktioniert über 4-5 Tage je ca. 30 Sekunden mit Protonen bestrahlt. Aufgrund der guten Steuerbarkeit von Protonen wird diese Form bei der Behandlung von Tumoren angewendet, welche sehr nahe an den strahlenempfindlichen Strukturen wie z.B. der Papille oder der Fovea lokalisiert sind. Benötigt wird für diese Therapie ein Zyklotron (Teilchenbeschleuniger) mit sehr hoher Energie. Die Energie der Protonen baut sich im Gegensatz zur Brachytherapie wegen der zunehmenden Absorption im Gewebe allmählich auf, um dann nach einem Maximum (Bragg-peak) abrupt abzufallen. Dadurch besteht die Möglichkeit auch ein sehr kleines Zielvolumen sehr genau zu bestrahlen, denn auch die seitliche Streuung der Protonenstrahlung ist minimal. Die Lage des Bragg-peaks ist abhängig von der Energie der Protonenstrahlen. Diese kann mittels eines in den Strahlengang eingeführten Reichweitenmodulators so verändert werden, dass mehrere Bragg-peaks entstehen und somit eine gleichmäßige Irradiation des Zielvolumens sicherstellen. Die Überlebensraten bei dieser Therapie sind vergleichbar mit denen anderer Therapieformen. Die häufigsten

Nebenwirkungen dabei sind die radiogene Cataract, die Optikusneuropathie, das Sekundärglaukom und Komplikationen der vorderen Augenabschnitte, wie die Sicca-Symptomatik und der Zilienverlust.

Die Transpupilläre Thermotherapie ist die Zerstörung der Aderhauttumorzellen durch Überwärmung mit einem Laser (Dioden-Laser 810 nm). Die klinische Studie dieser Art der Behandlung von uvealen Melanomen wurde erstmals 1995 von Oosterhuis et al. publiziert. Die Transpupilläre Thermotherapie wird heute vorwiegend in Kombination mit der Brachytherapie oder der Protonentherapie, sowie als ergänzende Therapie bei flachen Aderhautmelanom-Rezidiven verwendet.

Des Weiteren besteht noch die Möglichkeit der lokalen transskleralen Resektion, welche die Exzision des Tumors in systemischer arterieller Hypotension darstellt. Diese von Stallard erstmals 1961 publizierte Methode, wird meist bei Aderhautmelanomen angewendet, welche für die Strahlentherapie zu groß sind, aber einen Durchmesser von 16 mm nicht überschreiten. Besonderes anterior des Äquators sowie nasal gelegene, hochprominente und schmalbasige Tumoren sind mittels dieser Therapie gut zu behandeln. Der Vorteil der Behandlung in Hypotension ist die Reduktion intraoperativer Komplikationen, wie z.B. Glaskörperblutungen. Der Tumor wird mit einem Abstand von 3 mm von den sichtbaren Tumorgrenzen entfernt. Die Netzhaut bleibt intakt und wird nicht berührt. Um eventuell übriggebliebene Tumorzellen zu zerstören, wird die Operation mit einer Brachytherapie-Nachbestrahlung oder einer Protonen-Vorbestrahlung kombiniert. Häufige Nebenwirkungen sind in erster Linie durch Entfernung des Tumors begünstigte rhegmatogene oder traktionsbedingte Netzhautablösungen. Weitere auftretende postoperative Komplikationen sind Glaskörper- und subretinale Blutungen, sowie die Katarakt.

Eine weitere Methode ist die Endoresektion, bei welcher der Tumor durch den Auginnenraum entfernt wird. Dabei wird zunächst eine Vitrektomie durchgeführt und die Netzhaut vom darunterliegenden Tumor getrennt, so dass der Tumor im Auginnenraum gut zugänglich wird. Vor Entfernung des

Tumors wird die Gefäßversorgung mittels Diathermie unterbunden. Da insbesondere bei der Endoresektion die Bestrahlung präoperativ erfolgen muss, wird die Operation ebenfalls mit einer Protonen-Vorbestrahlung und/oder einer Brachytherapie-Nachbestrahlung kombiniert. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen die Glaskörper- und subretinale Blutung, das Sekundärglaukom und die Katarakt.

Die letzte Möglichkeit besteht in der Eukleation des Auges, was aber nur bei prognostisch ungünstigen Tumoren oder bereits bestehendem irreversiblen Visusverlust durchgeführt wird. Die Muskeln werden während der Operation vorsichtig isoliert und nach Bulbusentfernung mit Optikusdurchtrennung auf oder um ein Kunststoffimplantat aufgenäht. Es dient im späteren Verlauf der Bewegung der Prothese. Danach wird die Bindehaut vernäht. Sie dient als Basis zur Einsetzung der zur späteren Prothese [5, 6,16, 26, 36].

1.3 Klassifikation des Aderhautmelanoms

Histologisch werden Aderhautmelanome nach der von Callender 1931-Klassifikation unterteilt. Auf dieser Einteilung basiert die Klassifikation der World Health Organisation (WHO) welche seit 1979 gilt.

1. Spindelzell-Melanome:

Man unterteilt die Spindelzell-Melanome weiter in Spindel-A-Zell Melanome und Spindel-B-Zell Melanome.

Spindelzelltyp A – Melanome bestehen zu mehr als 75% aus Zellen des Spindelzelltyps A, im Übrigen aus Spindelzelltyp B. Die Spindel A-Zellen sind relativ langgestreckte, schlanke Zellen mit kleinen Zellkernen, die im Regelfall keine Nukleoli besitzen.

Spindelzelltyp B – Melanome enthalten mehr als 25% Zellen des Spindelzelltyps B, sonst vorwiegend Spindelzelltyp A und kleine Anteile von Epitheloidzellen. Spindel B-Zellen sind längliche Zellen,

welche größer und plumper als Spindel A-Zellen sind und eine ovoide Form, sowie einen größeren Kern und einen deutlichen Nukleolus besitzen.

Diese Einteilung wurde aufgrund der unterschiedlichen 10-Jahres-Mortalitätsrate, welche bei den Spindel-A-Zell Melanomen 10-20% und bei den Spindel-B-Zell Melanomen 20-36% beträgt, vorgenommen.

2. Epitheloidzell-Melanome:

Bis zu 5% der Aderhautmelanome sind reine Epitheloidzell-Melanome. Sie haben eine 10-Jahres-Mortalitätsrate von 72-100%. Die Epitheloidzellkerne beinhalten einen bis mehrere große Nukleoli, die in ihrer Form stark variieren.

3. Gemischtzellige Melanome

Diese Aderhautmelanome bestehen histologisch gesehen aus Spindel- und Epitheloidzellen und sind bei 45% der Patienten zu finden. Sie haben eine 10-Jahres-Mortalitätsrate von 63-79%. Diese Tumoren enthalten sowohl Spindel- als auch Epitheloidzellen:

3.1. Gemischtzellige maligne Melanome mit Spindelzelldominanz

3.2. Gemischtzellige maligne Melanome mit Spindelzell-Epitheloidzell- Gleichgewicht.

3.3. Gemischtzellige maligne Melanome mit Epitheloidzelldominanz

4. Nekrotische Melanome

Die verbleibenden restlichen 5% sind Aderhautmelanome deren dominierender Zelltyp nicht mehr festzustellen ist. Sie werden als nekrotische Melanome bezeichnet.

In der modifizierten Callendar -Klassifikation (McLean et al 1983) wurden einige bis dato geltende Punkte folgendermaßen geändert:

- Reine Spindel A Tumoren werden seitdem als Nävi bezeichnet
- Der faszikuläre Typ wurde nach der zytologischen Charakteristik klassifiziert.
- Die Spindelzell-Tumore werden nicht mehr in den Unterklassen A und B klassifiziert, da diese beiden Untergruppen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Prognose aufweisen.
- Tumoren welche auch nur wenige Epitheloidzellen beinhalten werden als gemischtzellige Melanome klassifiziert.

2 Stand der Forschung

2.1 Einleitung

Chemokine sind eine große Familie von Polypeptid-Signal-Molekülen. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Chemotaxis und der G-Protein gekoppelten Rezeptoraktivierung und sind von Bedeutung bei der Zellproliferation, Proteininduzierung, Tumorwachstum und Angiogenese, zusammengefasst Onkogenese [53, 63, 64].

2.2 Chemokine allgemein

Der Begriff 'Chemokin' ist eigentlich eine Kurzform für 'chemoattractant cytokine' [23]. Es handelt sich hierbei also um eine Untergruppe der Zytokine. Sie sind eine Gruppe von molekularen Leichtgewichtproteinen (8-10 kd), welche verschiedene zelluläre Funktionen haben und an der Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen beteiligt sind und somit ein Rearrangement des Zytoskeletts bewirken. Effektorzellen wie Granulozyten und Makrophagen wandern in das Gewebe ein, indem sie Konzentrationsgradienten verschiedener Zytokine folgen [12, 33, 68, 75].

Chemokine können aufgrund ihrer Funktion im Immunsystem und der Expression in homeostatische und inflammatorische Chemokine unterteilt werden [7, 56, 57].

Man unterscheidet dabei zwischen zwei großen und zwei kleinen Klassen. Die beiden großen Klassen werden von den CC-Rezeptoren (CCR1 – CCR10), auch β -Rezeptoren genannt, und den CXC-Rezeptoren (CXCR1 – CXCR6) oder α -Rezeptoren gebildet. Sie sind in ihrer aktiven Form Homodimere. Die Strukturen der Monomere für CC und CXC Chemokine sind sehr ähnlich, die Dimerstrukturen unterscheiden sich. Chemokine besitzen 4 konservierte Cysteinbausteine, die 2 essentielle Disulfidbrücken ausbilden. Die Nomenklatur richtet sich nach den zwei konservierten Cysteinen, welche bei den CC

Chemokinen in der Sequenz direkt benachbart liegen, während sich bei CXC Chemokinen noch eine Aminosäure dazwischen befindet.

Es existieren neben CC und CXC auch noch zwei Mini-Familien: C Chemokin (Lymphotactin) und ein C(X)3C Chemokin (Fractalkin) [53, 69].

2.3 Chemokinrezeptoren

Chemokine vermitteln ihren biologischen Effekt über eine Bindung an spezielle Chemokinrezeptoren, welche sich auf der Oberfläche unterschiedlicher Zellen befinden.

Die Chemokinrezeptoren gehören zur großen Gruppe der heterotrimeren G-Proteine, die 7 Transmembran-Domänen aufweisen [53, 37].

Die G-Protein-Untereinheiten aktivieren in einer Kaskade verschiedene Effektorenzyme, darunter Phospholipasen, die am Ende zu einer Inositol-Trisphosphat Produktion, einem Anstieg des intrazellulären Kalziums oder einer Aktivierung von Protein-Kinasen führen [35]. Der chemotaktische Effekt wird durch Polymerisation monomeren Aktins zu filamentösem Aktin (F-Aktin) erreicht, die auch durch die G-Protein-Untereinheiten induziert wird. Diese Aktin-Polymerisation initiiert Veränderungen am Zytoskelett, die schließlich die Fortbewegung der Zelle in Richtung des Chemokingradienten bewirken [47].

Es konnten bisher neunzehn verschiedene humane Chemokinrezeptoren identifiziert werden, nämlich zehn CC- (CCR1-10), sieben CXC- (CXCR1-6 und CXCR3B), ein CX3C- (CX3CR1) sowie ein C- (XCR1) Rezeptor. Es existieren des Weiteren noch zwei Proteine, die den Chemokinrezeptoren ähneln. Es handelt sich hierbei um den „Duffy antigen receptor for Chemokines“ (DARC) und D6, die CXC- und CC- Chemokine mit gleicher Affinität binden, ohne jedoch dadurch aktiviert zu werden [34].

2.4 Chemokine und Interaktionen

Die Interaktion der Chemokine mit ihrem Rezeptor erfolgt über zwei Bindungsstellen der Chemokine. Zum einen über die N-terminale Region, zum anderen über einen prominenten Loop zwischen β -Faltblattstrukturen, der zwischen dem 2. und 3. Cystein herausragt. Es wird vermutet, dass diese Loop-Region zuerst erkannt wird, und dass diese Interaktion wichtig ist für die korrekte Präsentation der Signal-transduzierenden N-terminalen Bindungsstelle [14].

Die N-terminalen Aminosäuren sind die kritischen Komponenten für die biologische Aktivität. So kann das Hinzufügen einer einzelnen Aminosäure im MCP-1 Molekül die biologische Aktivität um den Faktor 100 oder 1000 verringern [25], und die Deletion einer Aminosäure kann beispielsweise ein Chemoattractant für Basophile in ein Chemoattractant für Eosinophile umwandeln [70]. Auf diese Weise können auch Chemokin-Rezeptor-Antagonisten hergestellt werden. So wurde beispielsweise ein potenter CXCR4-Antagonist durch Modifikation der ersten beiden N-terminalen Aminosäuren von SDF-1 kreiert [17].

Chemokine induzieren durch die Aktivierung von Leukozyten die Produktion von bakteriziden Sauerstoffradikalen, bioaktiven Lipiden und auch das Freisetzen zytoplasmatischer Granula, wie zum Beispiel Proteasen von Neutrophilen und Monozyten, Histamin von Basophilen und zytotoxische Proteine von Eosinophilen [1, 2].

Des Weiteren können CXC Chemokine können unterteilt werden nach der Präsenz oder Abwesenheit des Aminosäure-Triplets Glutamat-Leuzin-Arginin (ELR). Die Chemokine mit ELR Motiv in der N-terminalen Rezeptorbindungsstelle können die Angiogenese induzieren [7] und wirken auf neutrophile Granulozyten.

CC Chemokine wirken vor allem auf Monozyten, eosinophile und basophile Granulozyten und auf die T-Zellen. Dementsprechend finden sich die zugehörigen Rezeptoren nur auf den entsprechenden Zellentypen.

Eine Ausnahme dieser Regel bildet CXCR4, der fast ubiquitär und auch auf Monozyten vorkommt [3, 42, 13].

Jeder dieser Rezeptoren kann nur an Liganden der zugehörigen Klasse binden, jedoch mit unterschiedlich hoher Affinität. Es ist ebenfalls eine Bindung diverser Liganden an verschiedene Rezeptoren ihrer Klasse möglich. Die Chemokin-Rezeptoren DARC und D6 bilden die Ausnahmen dieser Regel, da sie gleichermaßen CC und CXC-Chemokine binden können [34].

An der Diapedese von Leukozyten durch das Endothel sind verschiedene Mechanismen beteiligt. Chemokine adhären lokal an der Glykokalix der Endothelzelloberflächen, wodurch der chemotaktische Gradient aufgebaut wird. Die angelockten Leukozyten interagieren zunächst, mit niedrigerer Affinität, mit Selektinen der Endothelzellen („rolling“), wobei sie mit den Chemokinen in Kontakt kommen. Die Chemokine induzieren in den Leukozyten die Expression und Aktivierung von Integrinen, die zu einer festeren Bindung der Leukozyten an Adhäsionsmoleküle führen [62].

Lymphozyten und Monozyten können entweder durch afferente lymphatische Gefäße oder spezielle Blutgefäße (high-endothelia-venules) in Lymphknoten eintreten. Während dendritische Zellen und T-Gedächtniszellen die afferenten lymphatischen Wege nutzen, treten naive B- und T-Zellen durch die HEVs in die Lymphknoten ein. Diese Zellenwanderung wird nicht nur durch Adhäsionsmoleküle, sondern auch durch Chemokinrezeptoren vermittelt. Anfangs gibt es eine lose Selektin-vermittelte rollende Bindung von Lymphozyten am Endothel. Danach folgt die Interaktion zwischen oberflächengebundenen Chemokinen auf den HEVs und den ausgeprägten Chemokinrezeptoren auf den Lymphozyten. Diese Interaktion bewirkt ein Signal, welches sofort die Integrine auf der Lymphozytenmembran aktiviert. Die intrazellulären Adhäsionsmoleküle erlauben eine feste Bindung von Lymphozyten mit der Gefäßwand und ein anschließenden Austritt in das umliegende lymphoide Gewebe. Bei diesem Prozess spielen der Rezeptor

CCR7 und sein Ligand der EBV- induzierte CCL19 sowie der Ligand für lymphoides Gewebe CCL21 eine Schlüsselrolle. CCL19 und CCL27 sind auf den luminalen Wänden ausgeprägt, wo sie von CCR7 erkannt werden und die Wanderung der Lymphozyten durch das HEV in den Lymphknoten bewirken [22, 23, 51].

2.5 Chemokine speziell

1987 wurde das erste Chemokin, IL-8, der Prototyp der CXC-Chemokine, entdeckt und auch seine Funktion als potentes Chemoattractant für neutrophile Granulozyten [72]. Bis vor einigen Jahren dachte man, dass Chemokine nur die Funktion besäßen, verschiedene Arten von Blut-Leukozyten zu den Orten von Infektionen und Entzündungen zu locken. Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass Chemokine eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese, Leukozytenreifung, Angiogenese, Entwicklung des lymphoiden Gewebes und im Homing von B- und T-Lymphozyten und der Entwicklung lymphatischer Gewebe spielen [3, 8, 23, 50].

Durch verschiedene Studien hat sich gezeigt, dass CXCR4 fast ubiquitär auf verschiedenen Zelltypen, unter anderem auf den meisten Zellen der Hämatopoese, sowie auf vaskulären Endothelzellen, Neuronen, Mikroglia und Astrozyten exprimiert wird [11, 30, 32, 31]. Das Gen für CXCR4 wurde auf Chromosom 2 lokalisiert.

Des Weiteren spielt CXCR4 eine wesentliche Rolle bei AIDS und ist der nötige Co-Faktor für die CD4- vermittelte Infektion von T-Zellen bei HIV [46].

CXCR4 wurde zum Gegenstand intensiver Forschungen als man herausfand, dass dieser Rezeptor ein HIV-1 Corezeptor ist, der von T-tropischen (T-Zell – tropisch) HIV-1 strains für den zellulären Eintritt benötigt wird [21, 41, 46]. Experimente zeigten, dass der physiologische Ligand SDF-1 den Eintritt der T-tropischen HI-Viren blockieren kann [10].

Eine ebenso große Rolle spielen dabei auch die Liganden des HIV-Assoziierten Chemokin-Rezeptors CCR5, da sie den Eintritt der M-tropischen Viren (Makrophagen-topisch) in die Zelle verhindern können [15].

HIV muss sehr schnell in Zellen gelangen, da das Virus an sich sehr instabil ist. Primärer Rezeptor ist das CD4 Antigen auf T-Helfer-Zellen und Makrophagen. Als Co-Rezeptor dienen dabei verschiedene Chemokinrezeptoren. Man kennt mehrere Mutationen in Chemokinen oder ihren Rezeptoren die HIV-Infektion von Zellen blockieren.

SDF-1 (stromal-cell derived factor-1) ist der Ligand für CXCR4 und ist stark komprimiert auf Chromosom 10q11.1. zu finden, während alle anderen CXC-Chemokingene auf Chromosom 4 lokalisiert sind [75].

Seine mRNA ist überwiegend in allen Geweben vorhanden. SDF1 wurde ursprünglich als prä-b-Zellen-Wachstums-Stimulierungsfaktor beschrieben und es wurde gezeigt, dass dieser für die lymphozytäre Reifung verantwortlich ist [49, 50]. Der humane SDF1-Faktor bewirkt die Chemotaxis von T-Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten [73]. Trotzdem ist seine Ausprägung nicht nur auf die Leukozytenabstammung beschränkt. Hohe Ausprägung weist SDF1 auch in der menschlichen Bauchspeicheldrüse, Leber, Milz, Eierstock und Dünndarm auf. Niedrige Ausprägung wurden gefunden im Intestinum, Niere, Haut Skelettmuskel und dem Gehirn [45, 44, 67].

SDF1 interagiert mit dem 7-Transmembran-G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR4. Die Ausprägung von CXCR4 in T-Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten vermitteln die chemotaktische Antwort auf SDF1. CXCR4 hat eine wichtige Funktion bei der embryonalen Reifung des Immunsystems und des Kreislaufsystems, wie Experimente an SDF-1- Knock-out Mäusen zeigten, die in utero aufgrund schwerer Entwicklungsfehler verstarben [48, 76]. Fehlt bei Mäusen SDF1 so wird auch an Herz, Hirn und bei der Hämatopoese CXCR4 nicht ausgeprägt [50].

Ein Symptom dieser Mäuse war, dass sie abnormal niedrige Zahlen an B-Lymphozyten und myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark aufwiesen [48]. Es wurde deswegen vermutet, dass SDF-1 ein wichtiger chemotaktischer Faktor für B-Zell-Vorläuferzellen im Knochenmark ist, wo die Reifung und Differenzierung der B-Zellen stattfindet. CXCR4/SDF1-Interaktionen sind von Bedeutung bei der Immunantwort durch die Induzierung von Makrophagen

ausgelöster Apoptose der CD-8 T-Zellen und spielen damit auch eine wichtige Rolle bei der T-Zellentwicklung und beim T-Zelltrafficking [61].

CXCR4 wird in hoher Zahl auf doppelt-positiven Thymozyten exprimiert, und im Thymus während der Reifung zu einfach-positiven Thymozyten runterreguliert und wieder vermehrt exprimiert, wenn die Thymozyten den Thymus verlassen [66].

Analog wurde von Gazitt gezeigt, dass eine Herunterregulierung von CXCR4 auf CD34+ Zellen stattfinden muss, damit diese das Knochenmark verlassen können. In der Peripherie wird die Ausprägung der Rezeptoren für das Homing zu den peripheren lymphatischen Geweben (Lymphknoten) wieder hochreguliert [24].

CCR10 und sein Ligand CCL27 sind Hautspezifische Chemokine [44, 33]. Beide wurden hauptsächlich im Rahmen der primären Metastasierung von Hautmelanomen in den Lymphknoten, der Lunge, der Leber, der Haut und im Knochenmark gefunden. Das auf Chromosom 9p13 lokalisierte Chemokin CCL27 bindet dabei an seinen Rezeptor CCR10, welcher an der Oberfläche von Melanozyten, Melanomzellen, dermalen Fibroblasten, Endothelzellen und Langerhanszellen ausgeprägt wird. Auch werden beide Chemokine beim Homing von T-Gedächtniszellen in die Haut gefunden [45, 33].

Der Rezeptor CCR7 besitzt zwei Liganden, an die er binden kann. Es handelt sich dabei um CCL19/MIP-3 β und CCL21/6 Ckine. Beide Liganden sind auf Chromosom 9p13 lokalisiert. Rezeptor und Liganden sind hauptsächlich in Lymphknoten, Lunge, Leber und Knochenmark auffindbar und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Metastasierung, sowie der Migration von T-Zellen in die Lymphknoten [28, 29, 52, 74].

Im Laufe der Forschung der letzten Jahre wurde auf Melanomen die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR7, CCR10 und ihre Liganden CCL12/SDF-1, CCL21/MIP-3 β , CCL19/6 Ckine und CCL27/CTACK nachgewiesen [53, 45, 44].

2.6 Chemokine und Metastasierung

Das Metastasierungspotential von Primärtumoren ist der Hauptgrund für die Mortalität bösartiger Erkrankungen. Metastasierung und Invasion werden durch weitreichende Interaktionen reguliert, welche Prozesse zwischen dem Tumor und dem Host-Gewebe bewirken. Zwei Hauptpfade der Metastasierung können unterschieden werden: die lymphogene Metastasierung zu regionalen Lymphknoten und die hämatogene Metastasierung zu entfernten Organen. Diese Metastasierung ist nicht von willkürlicher Art, sondern an Mechanismen gebunden die denen der Leukozytenwanderung ähneln. Das Potential der Tumorzellen zu metastasieren wird durch ihre individuelle Ausprägung auf den Genen bestimmt. [9, 39, 20, 23]

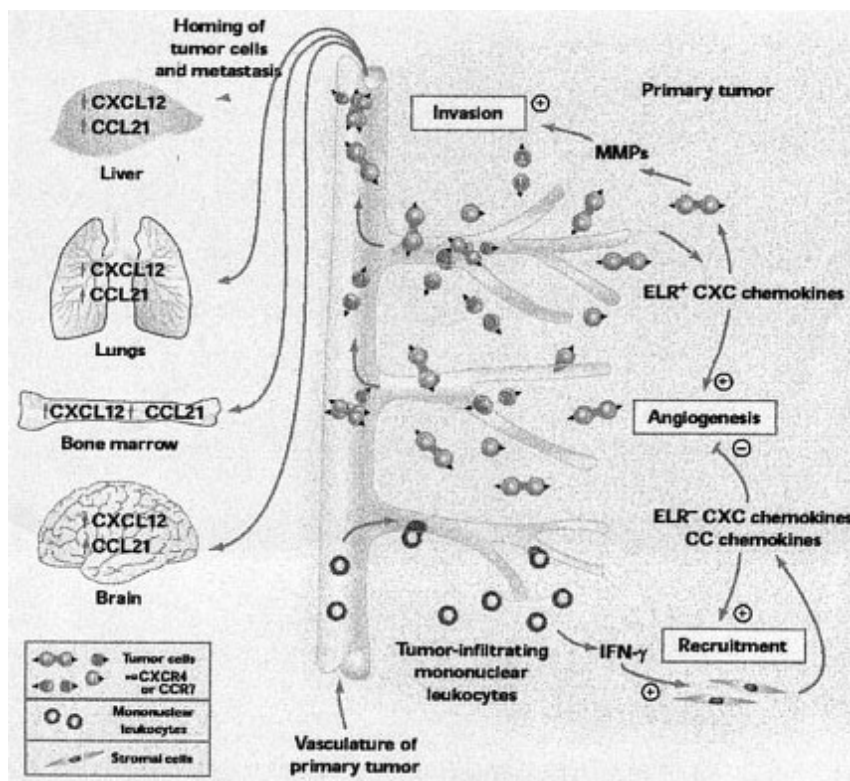


Abbildung 2.6.1 - Chemokine role in cellular transformation, tumor growth, invasion and homing and metastasis to distant preferential organs. Reprinted from: Strieter RM: Chemokines: Not just leukocyte chemoattractants in the promotion of cancer. Nat Immunol 2:285±286, 2001. [65]

Metastasierung ist ein großer, komplexer Prozess, der Abberationen bei der Genexpression beinhaltet und so Transformation, Wachstum, Angiogenese, Invasion, Dissemination und Wachstum von Krebszellen in anderen Organen bewirkt. Dies bedeutet eine Abwanderung von Zellen des betroffenen in gesundes Gewebe. Die Bewegung ist dabei nicht zielgerichtet, jedoch weisen verschiedene Typen eines Tumors verschiedene Metastasierungsziele auf. Der Grund dafür liegt in den Wachstumsbedingungen für die Ausprägung von Sekundärtumoren, welche mit spezifischen Wachstumsfaktoren erklärbar sind.

Chemokine sind strukturell und funktionell den Wachstumsfaktoren ähnlich. Sie spielen bei der Metastasierung eine große Rolle, da sie an G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf den Plasmamembranen der Zielzellen binden und somit eine Signalkaskade aktivieren, welche die Manifestation einer Metastasierung hervorrufen kann. Dazu müssen sie sich vorher auf den Zellen des Primärtumors befunden haben, welche natürlicherweise abgeschilfert werden und somit durch die Gefäßsysteme zum Sekundärorgan gelangen. Die Metastasierung wird dabei durch die Angiogenese erleichtert. Diese führt mit großer Häufigkeit zur Ausschwemmung der Tumorzellen vom Primärtumor ins Blut und fördert die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung für das Wachstum am metastatischen Standort. VEGF, Interleukin-8 und PEGF gehören zu den pro-angiogenetische Faktoren von verschiedenen Haupttumoren. Die Hemmung der Aktivität dieser Faktoren ist ein viel versprechender therapeutischer Ansatz für Patienten mit Lebermetastasen.

3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob bestimmte Chemokine Rezeptoren bzw. Liganden auf den Zellen der Aderhautmelanome exprimiert werden. Dazu wurden Paraffinschnitte dieser Tumore angefertigt und immunhistochemisch mit der APAAP-Methode untersucht.

Wir entwickelten diese Idee, da sich in den letzten Jahren gezeigt hat, dass auf Melanomzellen Chemokine Rezeptoren und Liganden ausgeprägt werden können und dabei unterschiedliche Auswirkungen bei der Ausprägung aufweisen. So wurden die Rezeptoren CXCR4, CKR10, CCR7 und ihre Liganden CCL12, CCL27, CCL19 auf Hautmelanomen nachgewiesen. In weiteren Studien hat man festgestellt, dass bestimmte Rezeptoren z.B. CXCL 8, CXCL 1-3, und die Liganden CCL 5 und CCL 2, zu einer Zunahme des Tumorwachstums und der Tumorentwicklung führen.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit zu untersuchenden Chemokinrezeptoren weisen eine organspezifische Ausbildung von Metastasen, wie z.B. in Leber, Lymphknoten, Lunge, Knochenmark und Haut auf. In Bezug darauf wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Ausprägung dieser Chemokinrezeptoren bzw. liganden und der Lebermetastasierung oder Überlebensrate besteht.

4 Material und Methoden

Zur Durchführung der Experimente im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 70 Proben verschiedener Patienten mit Aderhautmelanomen, welche enukleiert oder transskleral rezidiert wurden, untersucht. Die E nukleation fand entweder nach Bestrahlung z.B. mit Ruthenium Applikatoren oder aufgrund der TumorgroÙe ohne vorherige Behandlung statt.

Die Proben wurden unmittelbar nach Entfernung in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden histologische Schnitte von 4 µm angefertigt, die im weiteren Verlauf mit immunhistochemischen Methoden angefärbt wurden. Es handelt sich bei den Tumoren um eine Zufallsstichprobe der Jahre 96/97. Soweit es uns möglich ist, wird der Verlauf bzw. die Krankengeschichte der Patienten nach E nukleation verfolgt und im Auswertungsteil angerissen.

4.1 Geräte und Chemikalien

- Geräte
- Chemikalien
- Antikörper

4.1.1 Geräte

Deckgläser (Menzel)	24 x 32 mm, 24 x 50 mm
Feuchte Inkubationskammer	
Handschuhe (Derma Clean)	Gr. 6, 7, 8
GefäÙe	Brand 2000 ml, Jenaer Glas 500 ml Schott 5000 ml, 100 ml

Lösungsreservoir	
Magnetrührer (Jahnke & Kunkel GmbH & Co)	Ikamag RCT Combimag
Magnetrührstäbchen	
Microtom (Schlittenmicrotom)	HM 360
Microtommesser (PfM)	S35
Mikroskop	
PH-Meter (Wissenschaftliche technische Werkstätten Weillen)	Digital pH-Meter
Pipetten (Eppendorf)	100ul, 250ul, 500ul, 1000ul
Objektträger (r. Langenbrinck)	76 x 26 mm
Reaktionsgefäße	3 x 1 inch
Schnellkochtopf (Silit)	Sicomatic -L
Schüttler (Köttermann)	
Standardtipps (Plastibrand Sarstedt)	1000 St/pcs 200ul 250 St/pcs 1000ul
Thermometer	
Waage (Mettler)	P 1200
Wachsstift (Dako Cytomation)	Dako Cytomation Pen S2002
Wecker (Eurochrom)	
Zellstoff (Tork)	Facial Tissue
Centrifuge (Heidolph)	Relax Top

Tab. 4.1.1.: Geräte

4.1.2 Chemikalien

Acetone-B-trinatriumcitrat		MERCK
Citratpuffer		s.u.
Citronensäure	21,01g/l	MERCK 100 244
Dako Chemomate Detection Kit 500		DakoCytomation
Dest. Wasser	1000 ml steril	DeltaSelect
DMF (N,N Dimethylformamid)	1000 ml	MERCK
Ethanol	100%, 96%, 80%, 70%	MERCK
NaOH	1 molar bzw. 1N 2 molar bzw. 2N	MERCK
HCL	1 molar bzw. 1N 2 molar bzw. 2N	MERCK
HCL-Ethanol	1000 ml	Dr. K. Hollborn & Söhne
Human Serum		Biotest
Kaisers Glycerin Gelatine	100 g	MERCK
Levamisole	5 g	Sigma
Natriumacid	100 mg	MERCK
Natriumcitrat	29,41 g/l	MERCK 64 48
Natriumchlorid	58,44 g/mol	MERCK 64 04
Natriumnitrit	100 g	MERCK

Naphtol	5 g	Sigma ASBI
Neurofuchsin		MERCK
Papanicolaoblau		MERCK
Paraffin		MERCK
Pronase E		MERCK
RPMI + L-glutamine	500 ml	Gibco 1640
RPMI + FCSI	Kälberserum	s. u.
Tris-Base	1000 g	SIGMA T- 1503
Tris-HCL	1000 g	SIGMA T- 3253
Tween	500 g	Serva 37470
Spülpuffer		s. u.
Xylol	Xylene	J.T. Baker

Tab. 4.1.2. Chemikalien

4.1.3 Herstellung

Spülpuffer

pH 7,4-7,6

5 Liter Aqua dest.

Tris – HCL (Sigma T-3253)

34,25 g

Tris – Base (Sigma T-1503)

4,50 g

NaCl (MERCK 6404)

43,75 g

Tween (Serva 37470)

5,00 ml

Vorbehandlung mit Pronase E

Pronase E (MERCK 7433) 0,10 g

In 100 ml Aqua dest. Bei 30 °C lösen. Danach werden die Schnitte in die Pronase – Lösung gestellt und 10 Minuten bei 30 °C inkubiert.

Vorbehandlung mit Citratpuffer

pH 6,0

Lösung A: Citronensäure (MERCK 100244) 21,01 g/l

Lösung B: Na – Citrat (MERCK 6448) 29,41 g/l

Ansatz: 36 ml Lösung A und 164 ml Lösung B auf 2000 ml mit Aqua dest. auffüllen und dann die Schnitte in der entstandenen Lösung für 5 Minuten im Schnellkochtopf kochen.

4.1.4 Antikörper

APAAP	DakoCytomation	Mouse Monoclonal IgG
CXCR4	R&D Systems	Monoclonal Mouse IgG
CXCL12	R&D Systems	Monoclonal Mouse IgG
CCR7	R&D Systems	Monoclonal Mouse IgG
CCL19	R&D Systems	Monoclonal Mouse IgG
CCR10	Santa Cruz	Polyclonal Goat IgG
CCL27	R&D Systems	Polyclonal Goat IgG
MAG	Dianova	Polyclonal Anti Goat-Anti Mouse
Bide	DakoCytomation	Mouse IgG

Tab. 4.1.4. Antikörper

4.2 Vorbehandlung und Verdünnung

Antikörper	Art der Vorbehandlung der zu untersuchenden Paraffinschnitte	Verdünnung
CXCR4	Pronase	1:50
CXCL12	Pronase	1:25
CCR7	Citrat	1:100
CCL19	Pronase	1:50
CKR10	Citrat	1:50
CCL27	Citrat	1:25

Tab. 4.2.1. Vorbehandlung der Paraffinschnitte und Verdünnung der primären Antikörper

4.3 Methoden

Zur Detektion der verschiedenen Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen, wurde eine Immunfärbe-Methode mit dem APAAP-Komplex angewandt.

Polyklonale Antikörper besitzen im Gegensatz zu den monoklonalen Antikörpern aufgrund ihrer Heterogenität verschiedene Epitope. Dies kann im Experimentverlauf zu unspezifischen Nebenreaktionen und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen. Um dieses zu erkennen bzw. auszuschließen, wurden bei jeder Versuchsreihe Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Aufgrund der Negativkontrolle konnten unspezifische Immunreaktionen erkannt, entsprechend bewertet und wiederholt werden. Als Positivkontrolle wählten wir Lebergewebe, welches durch nachgewiesene positive Immunreaktion die zu untersuchenden Antikörper auf den Zellen aufweist. Zur Bestimmung der

Verdünnung der spezifischen Antikörper bei der Verwendung in unseren Versuchsreihen führten wir Vorversuche mit Lebergewebe und anschließend mit dem zu untersuchenden Tumorgewebe durch.

Die fixierten Schnitte wurden vor Arbeitbeginn für 10 Minuten in Xylol gestellt. Nach abgelaufener Zeit wurden die Schnitte für je eine Minute nacheinander mit 100%iger Ethanol-, 96%iger Ethanol-, 80%iger Ethanol- und 70%iger Ethanollösung gespült und anschließend in Aqua dest. sowie in Spülpuffer getaucht.

Bei einigen der zu untersuchenden Antikörpern war eine Vorbehandlung der Schnitte mit Citratpuffer bzw. Pronase-E-Lösung (0,1%) nötig.

Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte erneut mit TBS-Lösung gespült, mit dem jeweiligen primären Antikörper behandelt und für 30 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

Der nächste Schritt war abhängig davon ob der verwendete primäre Antikörper von der Maus oder von der Ziege stammte. Bei Antikörpern welche von der Ziege stammten wurde eine so genannte Mousification durchgeführt, was bedeutet, dass nach der Behandlung des Schnittes mit dem primären Antikörper eine Behandlung durch den MAG (Mouse-Anti-Goat) Antikörper mit der Verdünnung 1:500 erfolgt und eine nachfolgende Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur stattfindet.

Im nächsten Schritt wurde der vorher verdünnte Brückenantikörper dazugegeben. Zur Verdünnung wurde 500 µl Humanserum (BIOTEST) und 3500 µl RPMI (GIBCO 21875-034) vermischt. Die entstandene Lösung wurde anschließend mit dem Brückenantikörper in der Konzentration 1:20 verdünnt und auf die zu untersuchenden Schnitte aufgetragen und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert. Wie nach jedem Schritt erfolgte auch hier danach das Abspülen mit TBS.

Im weiteren Verlauf wurde der mit RPMI in der Konzentration 1:50 verdünnte APAAP-Antikörper auf die zu untersuchenden Schnitte aufgetragen und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert.

Die Antikörper mit Mousification wurden gleich für 30 Minuten in die Entwicklerlösung gestellt und anschließend der Kernfärbung unterzogen, während die Antikörper ohne Mousification vorher noch für jeweils 10 Minuten mit dem Brücken-AK bzw. APAAP-Antikörper behandelt wurden. Erst danach wurden ihre Kerne gefärbt.

Im Anschluss erfolgte schließlich das Eindecken der Schnitte mit Kaisers Glycingelatine.

4.4 Auswertung

Nach Anfärbung der Schnitte wurden diese unter dem Mikroskop nach dem Grad der Anfärbung der Zellen, sowie der Intensität der Färbung ausgewertet. Anschließend wurden die Schnitte fotografiert.

Maximale Färbeintensität		Prozentzahl angefarbter Zellen		Immunreaktiver Score 0-12
0 = keine Anfärbung	X	0 = Keine Zellen angefarbt	=	
1 = schwache Anfärbung		1 = 0 – 25 % der Zellen angefarbt		
2 = mäßige Anfärbung		2 = 25 – 50 % der Zellen angefarbt		
3 = starke Anfärbung		3 = 50 – 75 % der Zellen angefarbt		
		4 = 75 – 100 % der Zellen angefarbt		

Tab. 4.4.1. Errechnung des Immunreaktiven Score nach Stegner und Remmele [55]

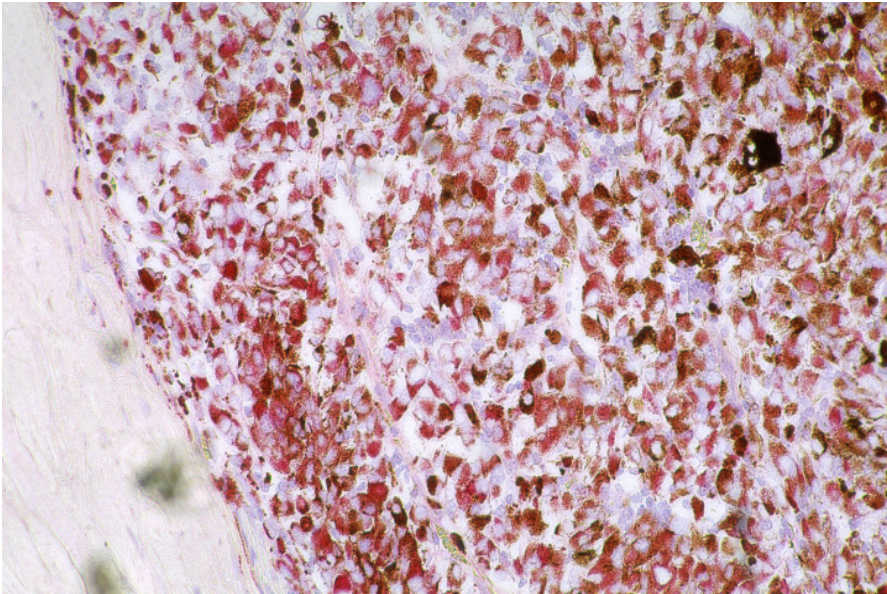


Abbildung 4.4.1. Patient 178-96 (Nr. 20)

Farbintensität 3 x Anfärbung der Zellen 4 = Immunreaktiver Score 12

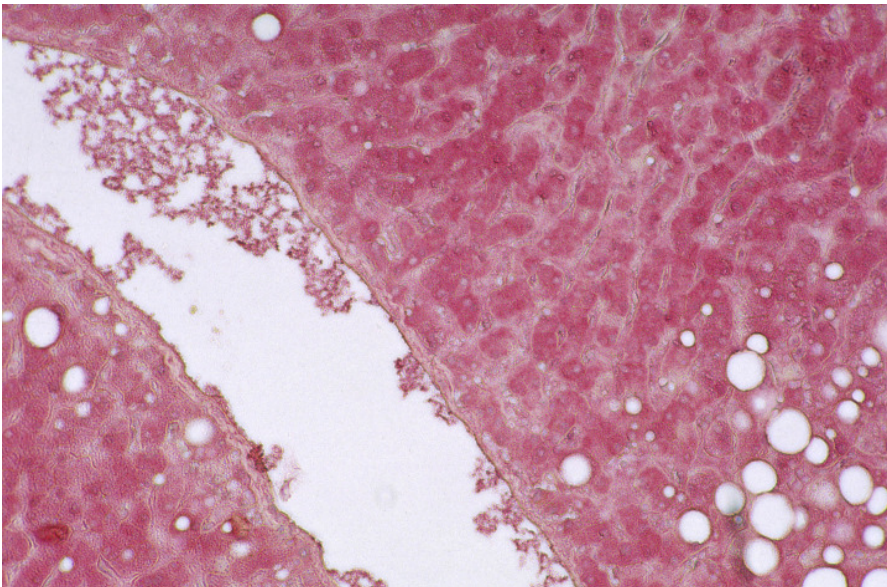


Abbildung 4.3.2.

Anfärbung von Lebergewebe (Positivkontrolle)

4.5 Statistische Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die bei der experimentellen Untersuchung ermittelten immunhistochemischen Ergebnisse mit den bereits vorhandenen klinischen und histologischen Daten dieser Tumoren verglichen. Dazu wurde die interne Datenbank der Augenklinik der Charité, Campus Benjamin Franklin genutzt.

Für die statistische Auswertung wurde das Statistik-Programm SPSS verwendet. Damit konnten die Daten berechnet und in Graphen dargestellt werden.

Zur Bestimmung der Signifikanz der Messwerte wurde der P-Wert im Chi-Quadrat Test berechnet und der exakte Fischer Test durchgeführt.

4.6 Fehlerquellen

In experimentellen Arbeiten besteht immer die Möglichkeit des Auftretens von unspezifischen Reaktionen, welche das Gesamtergebnis verfälschen können. Diese können hervorgerufen werden durch die falsche Berechnung und Herstellung der Antikörperkonzentration, Wechselwirkungen mit anderen Substanzen durch beispielsweise verunreinigte Geräte oder ungenügendes Spülen mit Pufferlösungen. Dadurch kann es zu Artefakten und Hintergrundfärbungen kommen, die ein positives Ergebnis vortäuschen können. Des Weiteren ist die Einbettung der Schnitte in Paraffin ein weniger schonendes Verfahren, da bei der Erwärmung bis auf 60°C und der Trocknung Proteinstrukturen bzw. Antigen determinanten durch inter- und intramolekulare Prozesse zerstört werden können. Zu beachten sind ebenfalls die Einhaltung der vorgeschriebenen PH-Werte, Temperaturen, Kochzeiten sowie die planmäßige Durchführung der vorgesehenen Abläufe. Auch sollte darauf geachtet werden, dass die zu untersuchenden Schnitte nicht austrocknen.

5 Ergebnisse

5.1 Allgemein

Die angefertigten Schnitte wurden nach der APAAP Methode angefärbt und ausgewertet. Im Folgenden werden die Ergebnisse hier angegeben.

Klinische Parameter

Zu den hier untersuchten klinischen Parametern zählen das Patientengeschlecht, das Patientenalter bei OP, das vom Tumor betroffene Auge, die maximale Tumorprominenz, die Tumorart, die Art der Behandlung, die Tumorvaskularisierung und die Tumorpigmentierung.

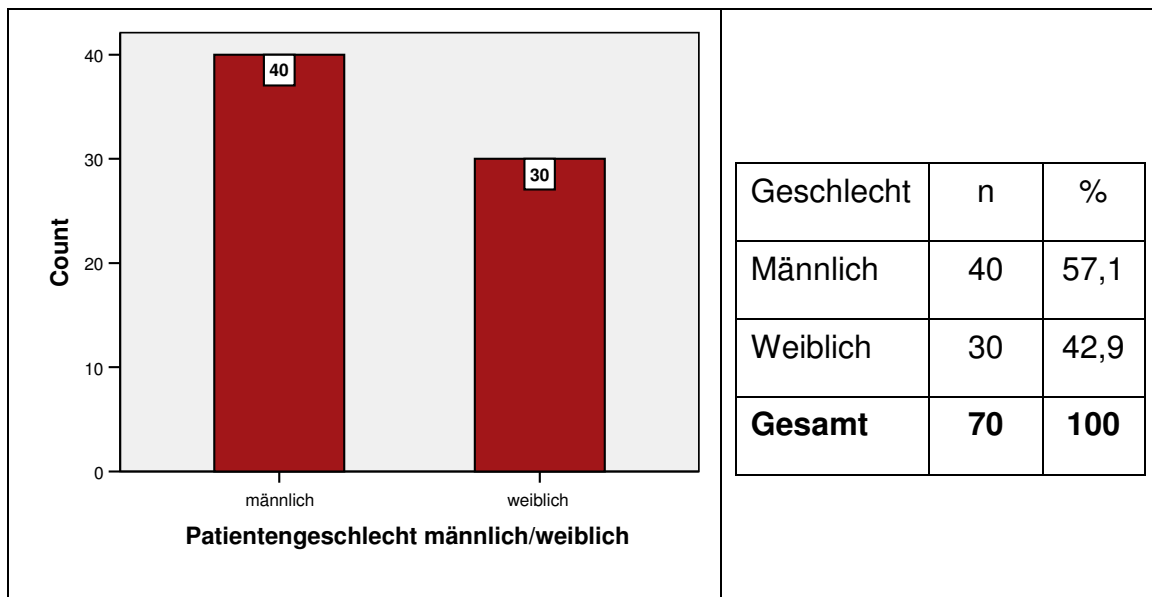


Abbildung 5.1.1. und Tabelle 5.1.1. - Verteilung des Patientengeschlechts

Bei der Verteilung des Patientengeschlechts männlich zu weiblich wurden vierzig männliche (57,1%) und dreißig weibliche (42,9%) gezählt. Es lässt sich also keine Abhängigkeit von Aderhautmelanomen in Bezug auf das Patientengeschlecht feststellen.

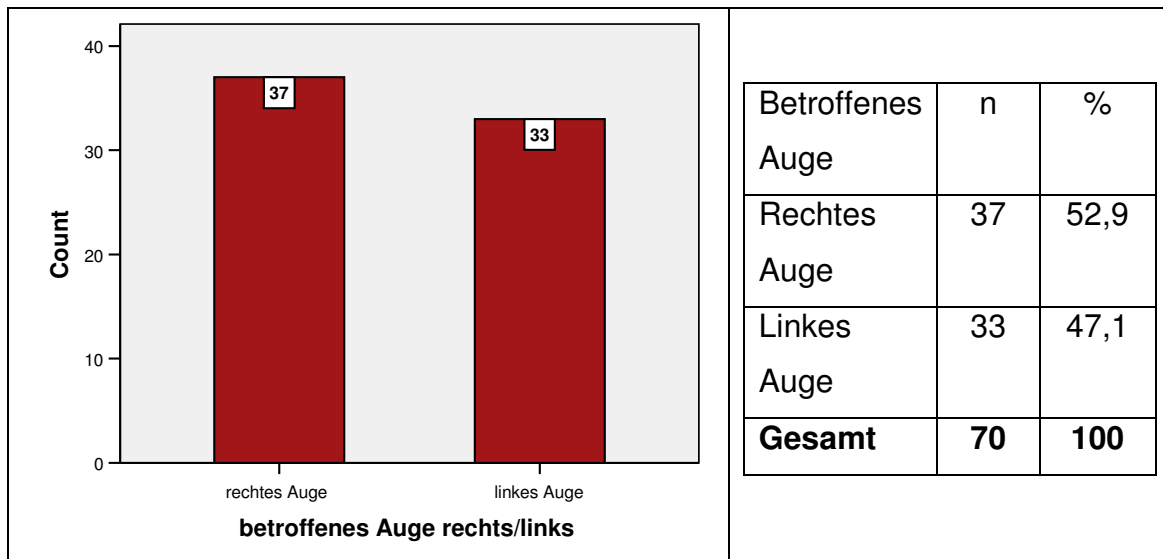


Abbildung 5.1.2. und Tabelle 5.1.2. - Vergleich betroffenes Auge rechts/links

Die Verteilung des Tumors in Bezug auf das betroffene Auge mit 37 rechten betroffenen Augen (52,9%) und 33 linken betroffenen Augen (47,1%) gestaltete sich relativ gleichmäßig.

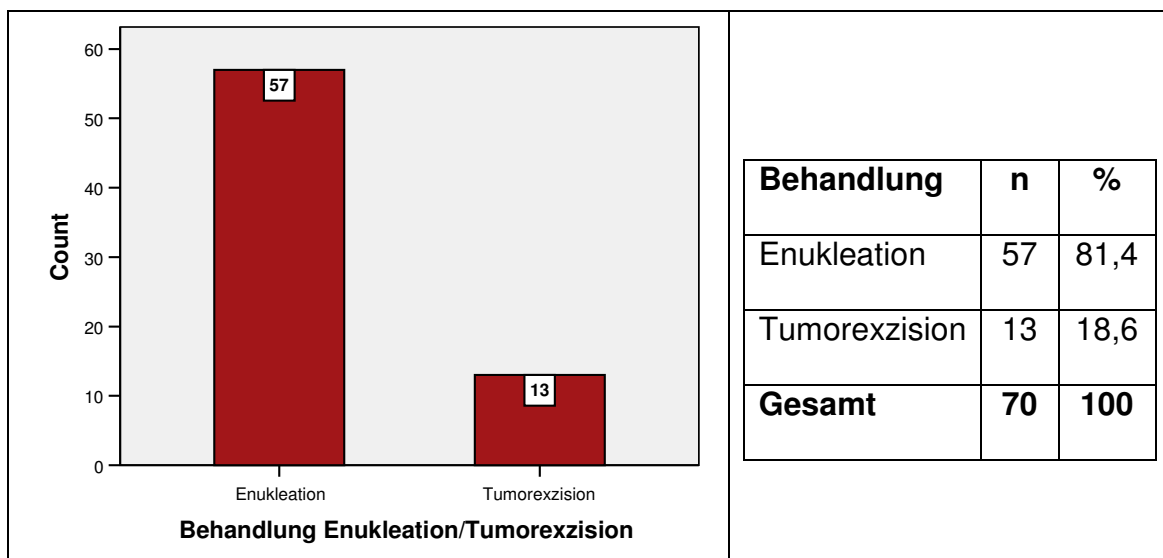


Abbildung 5.1.3. und Tabelle 5.1.3. - Vergleich der Behandlung Enukleation und Tumorexzision

Bei diesen untersuchten 70 Patienten wurden 57 enukleiert (81,4%) und bei 13 fand eine Tumorsektion statt (18,6%).

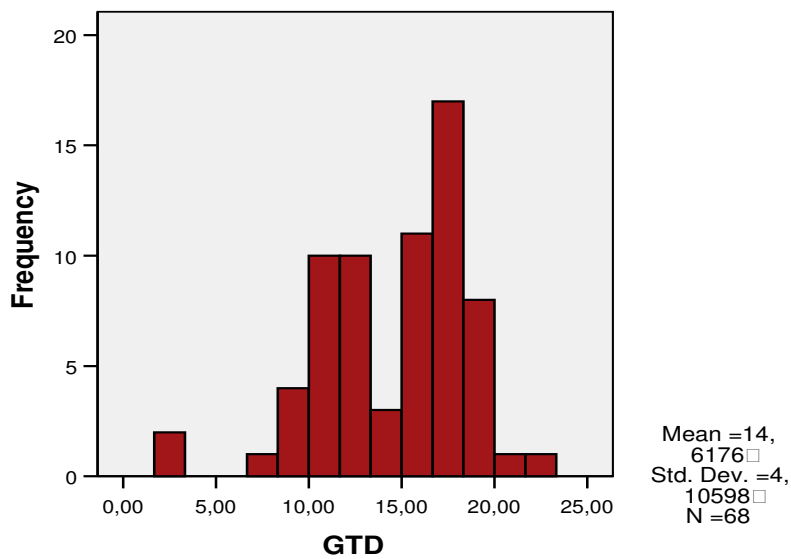


Abbildung 5.1.4. und Tabelle 5.1.4. – Vergleich Größter Tumordurchmesser

Tumordurchmesser	Minimum	2,5 mm
	Maximum	21 mm
	Mittelwert	14,6 mm
	Standardabweichung	4,1 mm

Der maximale Tumordurchmesser betrug 21 mm, der minimale Tumordurchmesser 2,5 mm, der Mittelwert lag bei 14,6 mm und die Standardabweichung bei 4,1 mm. Von den zu untersuchenden Patienten erfasste der Tumordurchmesser einen relativ breiten Bereich, konnte jedoch nicht mit der Metastasierung oder Überlebensrate in Verbindung gebracht werden.

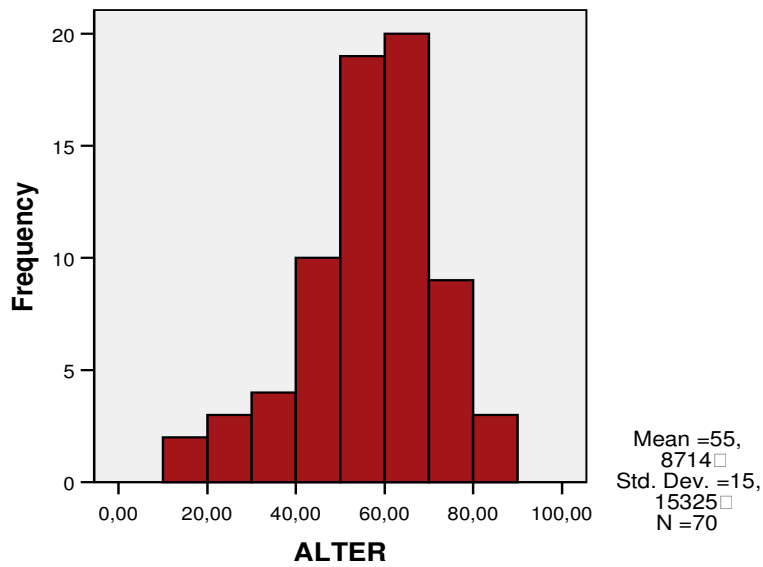
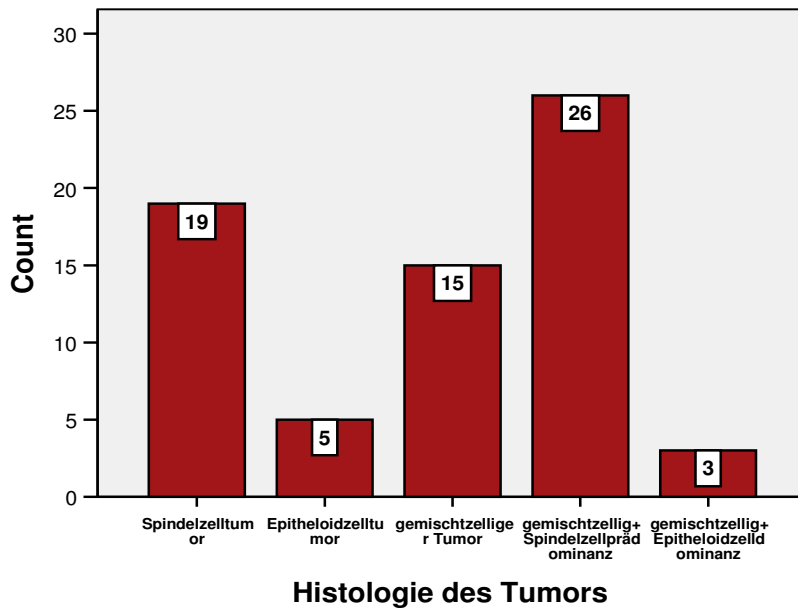


Abbildung 5.1.5. und Tabelle 5.1.5. – Vergleich des Alters der Patienten

Alter der Patienten	Minimum	13 Jahre
	Maximum	88 Jahre
	Mittelwert	55,9 Jahre
	Standardabweichung	15,2 Jahre

Das Patientenalter bei OP reichte von dreizehn bis achtundachtzig Jahre, wobei das mittlere Patientenalter bei 55,9 Jahren lag. Bei unseren untersuchten Patienten lag somit der Mittelwert des Patientenalters leicht unter dem von der Literatur angegebenen sechsten Lebensjahrzehnt.



Histologie des Tumors	n	%
Spindelzelltumor	19	27,9
Epitheloidzelltumor	5	7,4
Gemischtzelliger Tumor	15	22,1
Gemischtzelliger Tumor mit Spindelzelldominanz	26	38,2
Gemischtzelliger Tumor mit Epitheloidzelldominanz	3	4,4
Gesamt	68	100

Abbildung 5.1.6. und Tabelle 5.1.6. - Vergleich der Histologie des Tumors

Bei der histologischen Untersuchung wiesen 53 (75,7%) eine Tumorpigmentierung und 48 (68,8%) eine Tumovaskularisierung auf. Die weiteren 15 (21,4%) Melanome zeigten keine Tumorpigmentierung, sowie 20 (28,5%) Melanome keine Tumovaskularisierung. Von 2 (2,9%) der untersuchten Tumore lagen uns keine Angaben vor.

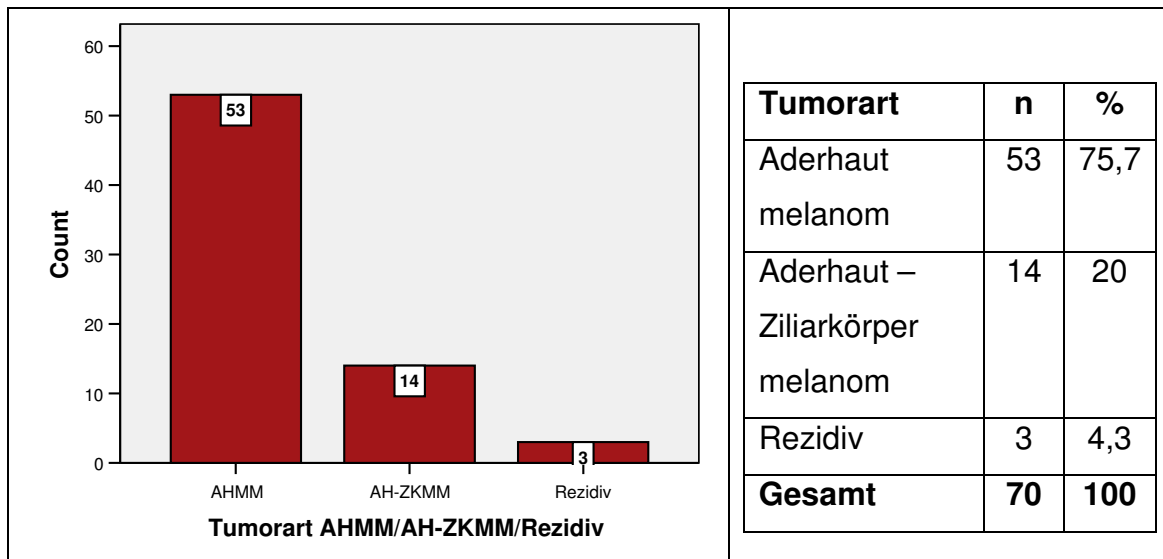


Abbildung 5.1.7. und Tabelle 5.1.7. - Vergleich Aderhautmelanom, Aderhaut-Ziliarkörpermelanom und Rezidiv

Die untersuchten Tumoren unterteilten sich in 53 Aderhautmelanome (75,7%), 14 Aderhaut-Ziliarkörpermelanome (20%) und 3 Aderhautmelanom-Rezidive (4,3%).

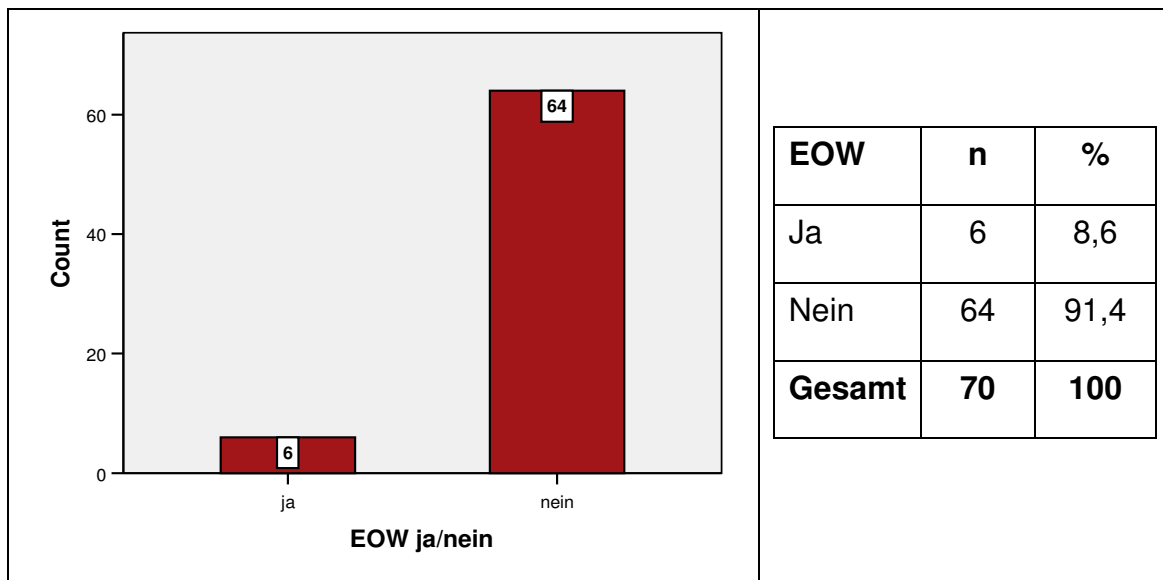


Abbildung 5.1.8. und Tabelle 5.1.8. - Vergleich Extraokuläres Wachstum vorhanden/nicht vorhanden

Bei den 70 untersuchten Patienten wiesen 6 Patienten (8,6%) ein extraokuläres Wachstum und 64 Patienten (91,4%) keinerlei extraokuläres Wachstum auf.

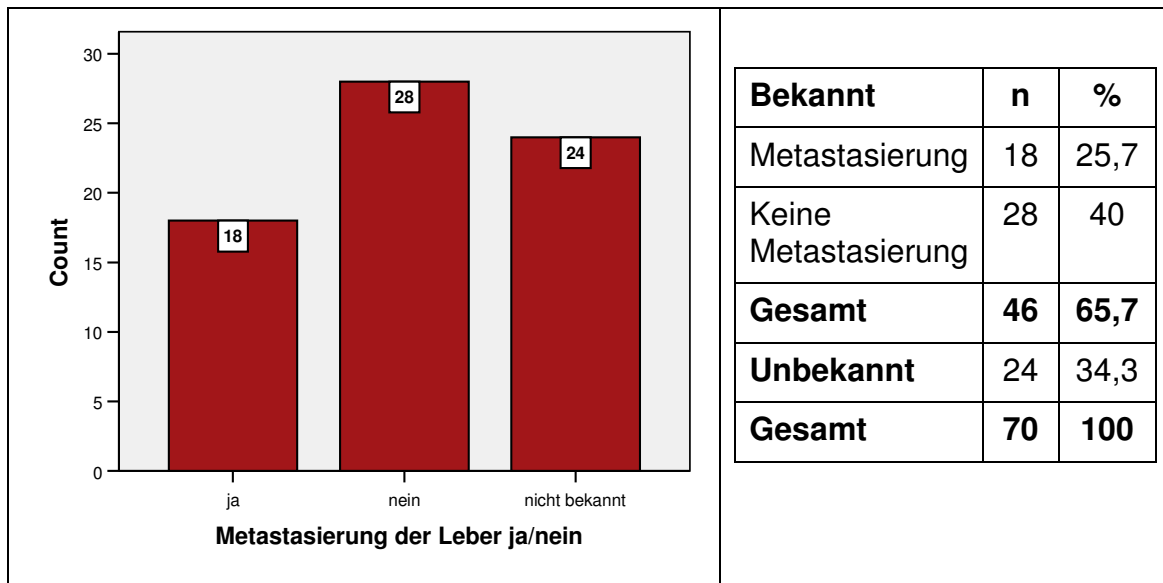


Abbildung 5.1.9. und Tabelle 5.1.9.- Metastasierung der Leber ja/nein/unbekannt

Ein Follow up in Bezug auf die Metastasierung gelang uns bei 46 der 70 untersuchten Patienten. Von diesen 46 Patienten (65,7%) wiesen 18 Lebermetastasen (25,7%) und 28 keine Lebermetastasen (40%) auf. Bei den übrigen 24 Patienten (34,3%) konnten wir den Krankheitsverlauf nicht ermitteln.

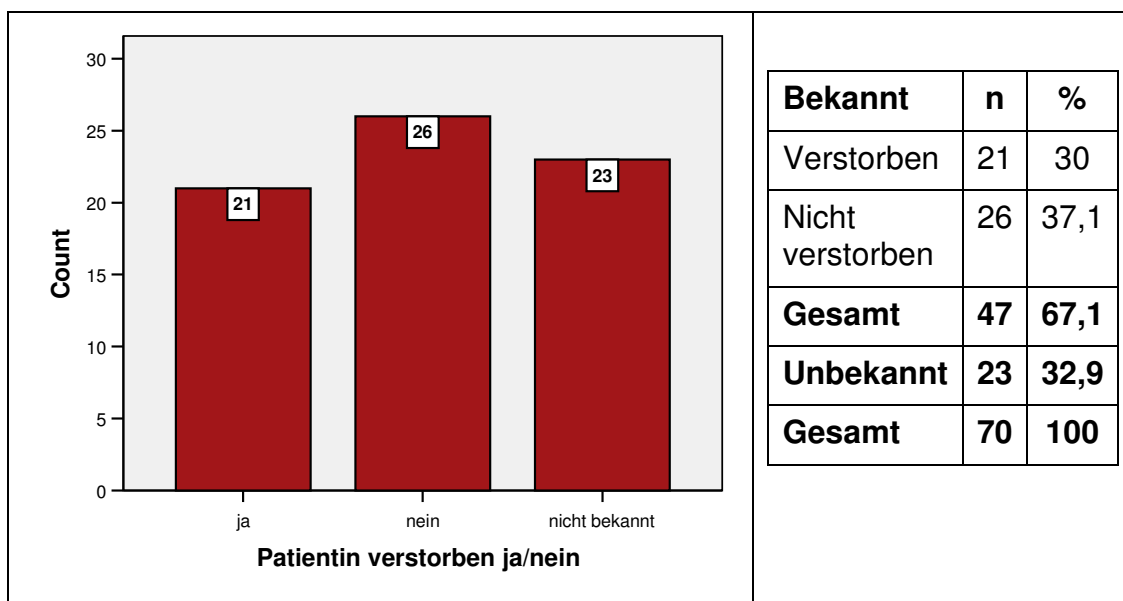


Abbildung 5.1.10. und Tabelle 5.1.10. - Patient verstorben ja/nein/nicht bekannt

Ein Follow up in Bezug auf die Überlebensrate gelang uns bei 47 der 70 untersuchten Patienten. Von diesen 47 Patienten (67,1%) verstarben 21 der Patienten (30%). Die restlichen 26 Patienten wiesen keine Lebermetastasen (40%) auf. Bei den übrigen 23 Patienten (32,9%) konnten wir den Krankheitsverlauf nicht ermitteln. Es konnte festgestellt werden, dass Patienten mit Metastasen innerhalb der 5 Jahre auch verstorben waren.

5.2 Chemokinrezeptor CXCR 4

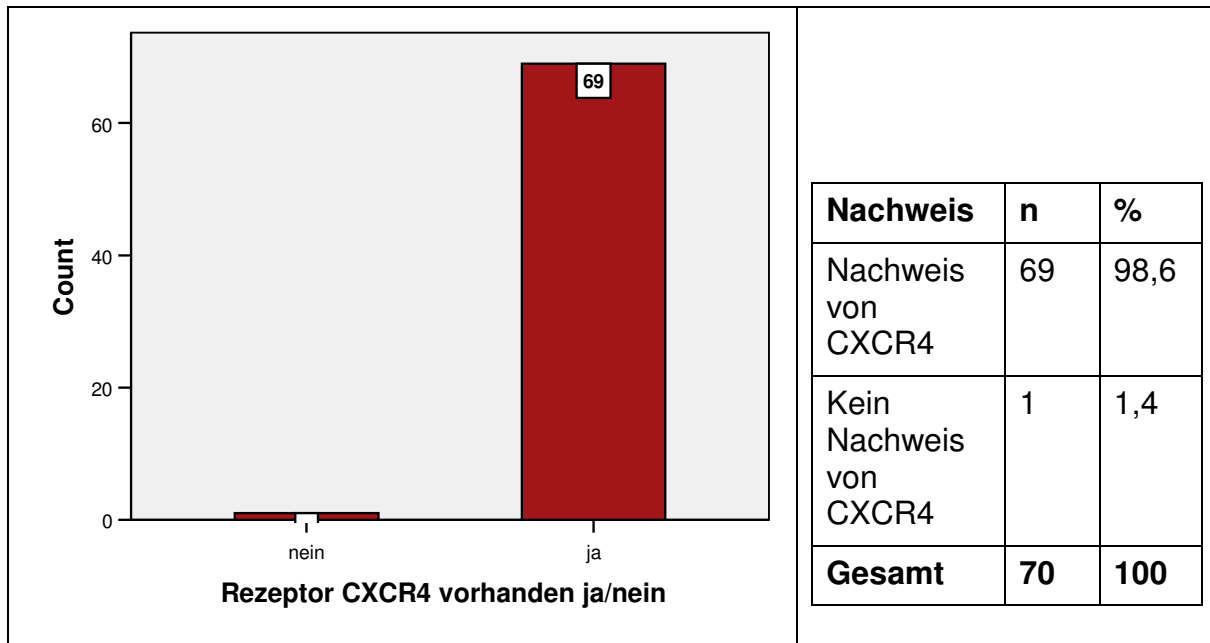
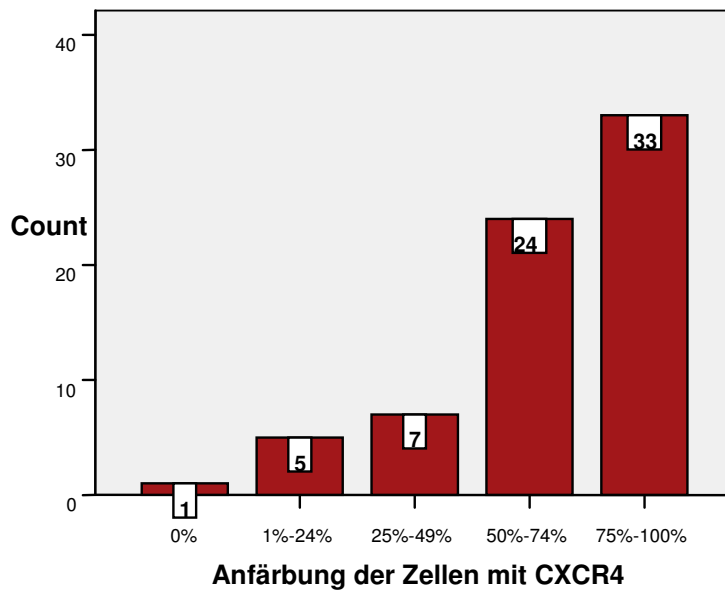


Abb. 5.2.1. und Tabelle 5.2.1.

Nachweis der Ausprägung des Chemokinrezeptors CXCR 4 auf den Aderhautmelanomzellen

In 98,6 % der Fälle (n = 69), also bei fast allen der 70 Patienten konnte der Rezeptor CXCR 4 auf den Zellen der Aderhautmelanomen nachgewiesen werden.



Nachweis	n	%
Keine Anfärbung der Zellen	1	1,4
1 – 24 % Anfärbung der Zellen	5	7,1
25 – 49 % Anfärbung der Zellen	7	10
50 – 74 % Anfärbung der Zellen	24	34,3
75 – 100 % Anfärbung der Zellen	33	47,1
Gesamt	70	100

Abbildung 5.2.2. und Tabelle 5.2.2. - Nachweis der Ausprägung der Anfärbung der Zellen mit dem Chemokinrezeptor CXCR4

Es wird die Ausprägung der Anfärbung der Zellen gezeigt. Bei 33 der 70 Patienten (47,1%) lag die Ausprägung der Anfärbung der Aderhautmelanomzellen in der Kategorie 75 –100 % und war damit am meisten vertreten. Bei weiteren 24 Patienten (34,3%) zeigte sich eine Anfärbung der Zellen von 50-74%. Nur zu einem geringen Anteil fanden wir keine oder nur eine geringe Anfärbung.

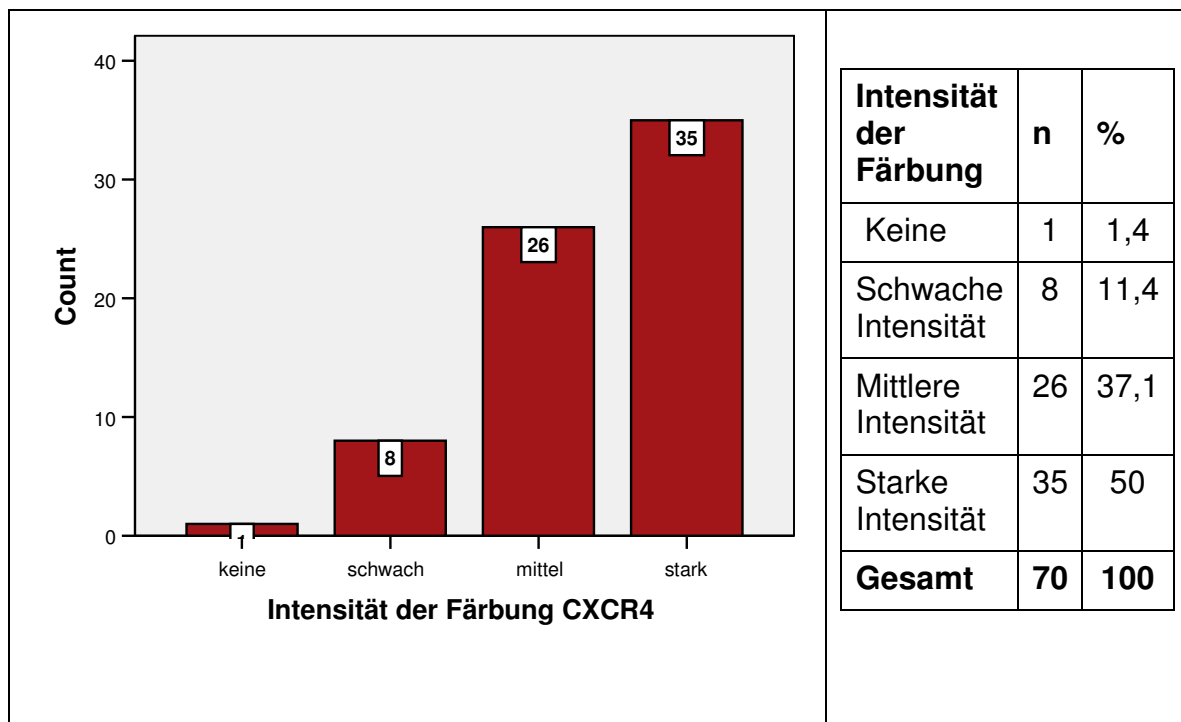
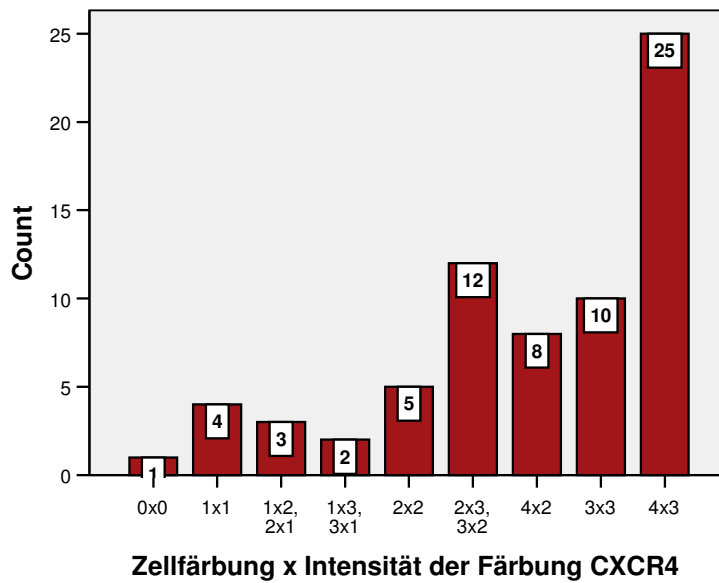


Abbildung 5.2.3. und Tabelle 5.2.3. - Vergleich der Intensität keine/schwach/mittel/stark von CXCR4

In Tabelle 5.2.3. kann man erkennen, dass die Zellen zum überwiegenden Teil (35 Patienten bzw. 50%) eine starke Intensität bei der Anfärbung aufweisen. Danach folgt mit 37,1% (26 Patienten) die mittelstarke Ausprägung der Färbung. Da auch die Anfärbung der Zellen (Abbildung 5.2.2. und Tabelle 5.2.2.) im Bereich 75 – 100% sehr hoch war (47,1%), erhalten wir bei der Multiplikation der beiden Faktoren einen Immunreaktiven Score mit ebenfalls überwiegend hohen Werten (siehe Abbildung 5.2.4. und Tabelle 5.2.4.).



Nachweis	n	%
Zellfärbung x Intensität 0 x 0	1	1,4
Zellfärbung x Intensität 1 x 1	4	5,7
Zellfärbung x Intensität 1x2, 2x1	3	4,3
Zellfärbung x Intensität 1x3, 3x1	2	2,9
Zellfärbung x Intensität 2x2	5	7,1
Zellfärbung x Intensität 2x3, 3x2	12	17,1
Zellfärbung x Intensität 4x2	8	11,4
Zellfärbung x Intensität 3x3	10	14,3
Zellfärbung x Intensität 4x3	25	35,7
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.2.4. und
Tabelle 5.2.4.**

**Vergleich der
Zellfärbung x Intensität
der Färbung von CXCR
4**

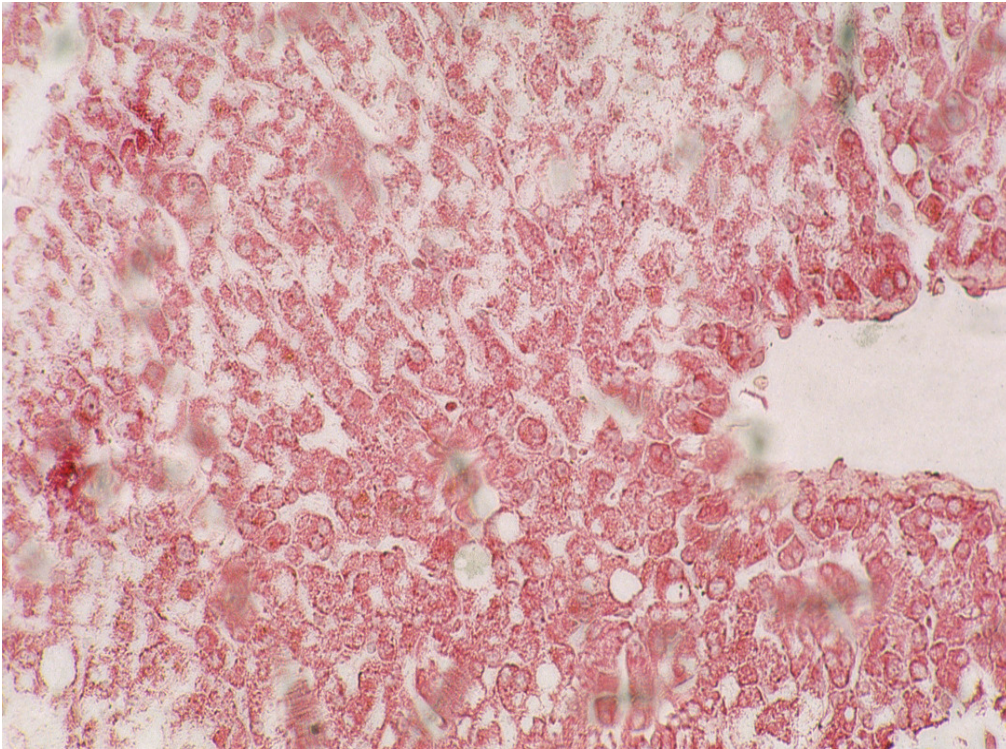


Abbildung 5.2.5. - Positivkontrolle Nachweis von CXCR4, Leber

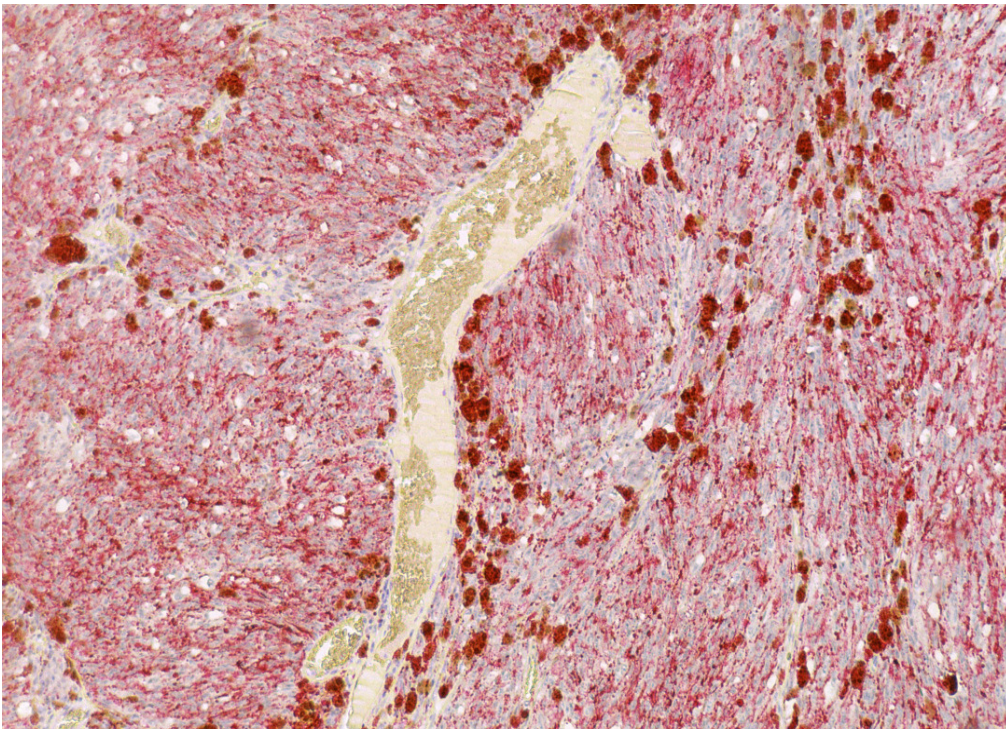


Abbildung 5.2.6. - Nachweis Rezeptor CXCR4 , Aderhautmelanom Nr. 24-97

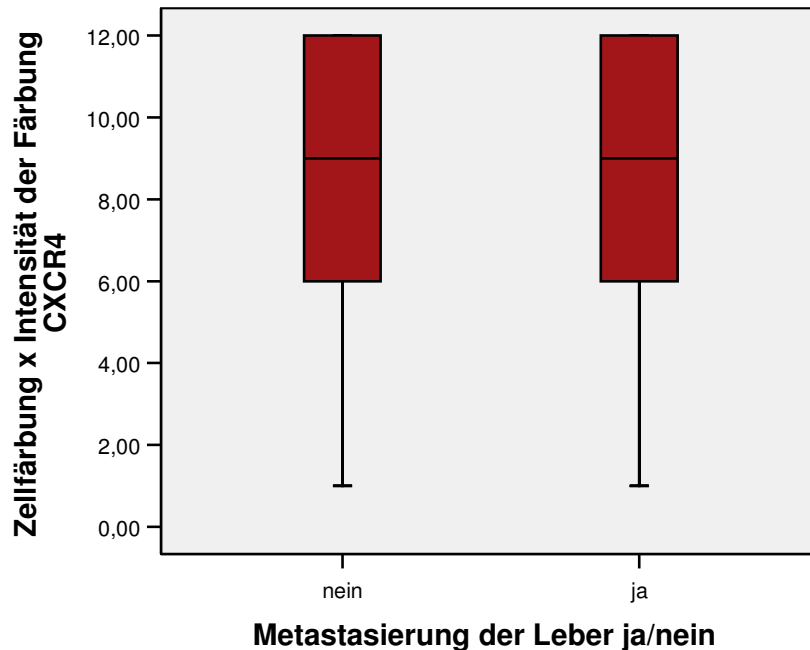


Abbildung 5.2.7. - Vergleich der Metastasierung der Leber mit dem Immunreaktiven Score von CXCR4

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten welche eine Lebermetastasierung aufweisen und bei Patienten, die keine Lebermetastasierung aufweisen. Der Immunreaktive Score war bei beiden gleich.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.2.5. – Bestimmung der Signifikanz

CXCR4 und Metastasierung	P – Wert
Chi-Quadrat	0,207
Exakter Fisher – Test	0,391

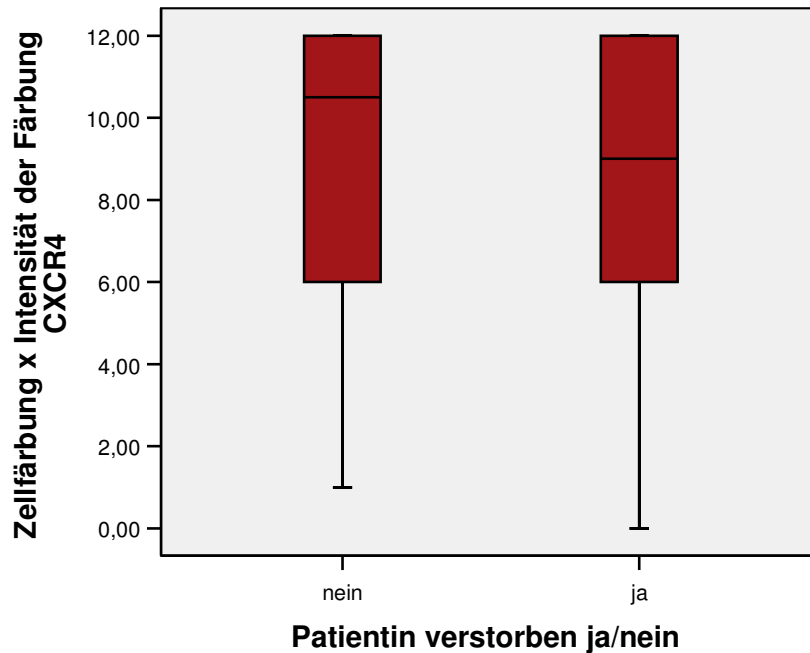


Abbildung 5.2.8. - Vergleich der Überlebensrate mit dem Immunreaktiven Score von CXCR4

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten welche eine Lebermetastasierung aufweisen und bei Patienten, die keine Lebermetastasierung aufweisen. Der Immunreaktive Score war bei beiden gleich.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.2.6. – Bestimmung der Signifikanz

CXCR4 und Überlebensrate	P – Wert
Chi-Quadrat	0,261
Exakter Fisher – Test	0,447

5.3. Chemokinligand CCL 12

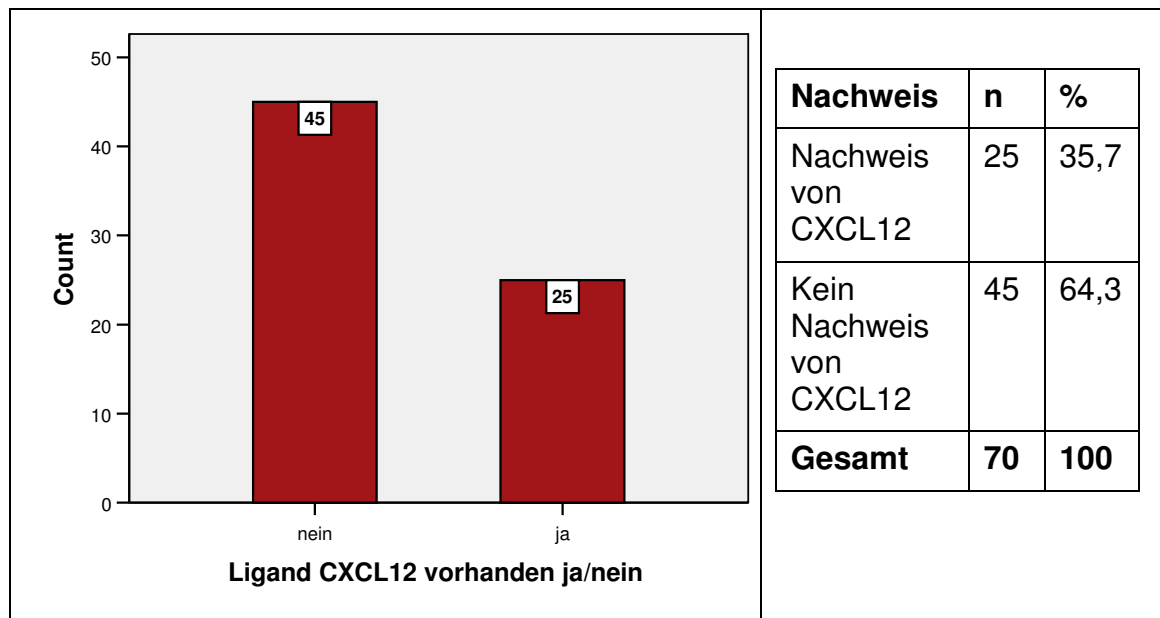


Abbildung 5.3.1. und Tabelle 5.3.1. - Nachweis der Ausprägung des Chemokinliganden CCL 12 auf den Aderhautmelanomzellen

Von den untersuchten 70 Patienten konnte nur in 35,7 % der Fälle (n = 25) CCL 12 auf den Zellen der Aderhautmelanomen nachgewiesen werden.

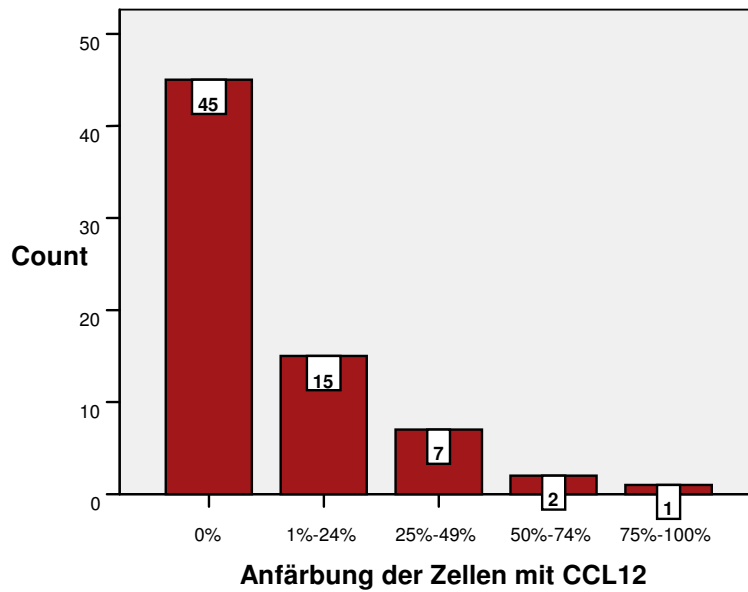
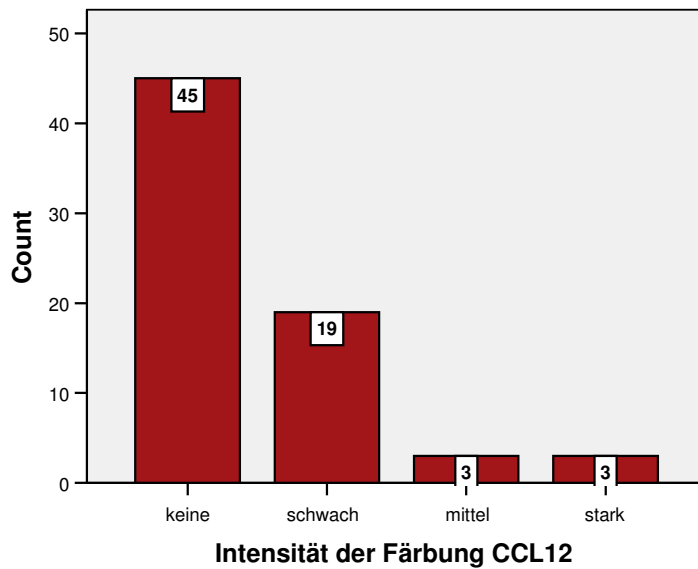


Abbildung 5.3.2. - Nachweis der Ausprägung der Anfärbung der Zellen mit dem Chemokinliganden CCL 12

Nachweis	n	%
Keine Anfärbung der Zellen	45	64,3
1 – 24 % Anfärbung der Zellen	15	21,4
25 – 49 % Anfärbung der Zellen	7	10
50 – 74 % Anfärbung der Zellen	2	2,9
75 – 100 % Anfärbung der Zellen	1	1,4
Gesamt	70	100

**Tabelle 5.3.2.
Nachweis der
Ausprägung der
Anfärbung der Zellen
mit dem
Chemokinliganden
CCL 12**

Es wird die Ausprägung der Anfärbung von Aderhautmelanomzellen gezeigt. Bei 45 der 70 Patienten (64,3%) konnte keine Ausprägung der Anfärbung der Zellen nachgewiesen werden. Bei weiteren 15 Patienten (21,4%) zeigte sich eine Anfärbung der Zellen von 1-24%. Nur zu einem geringen Anteil fanden wir eine mittlere oder starke Anfärbung.

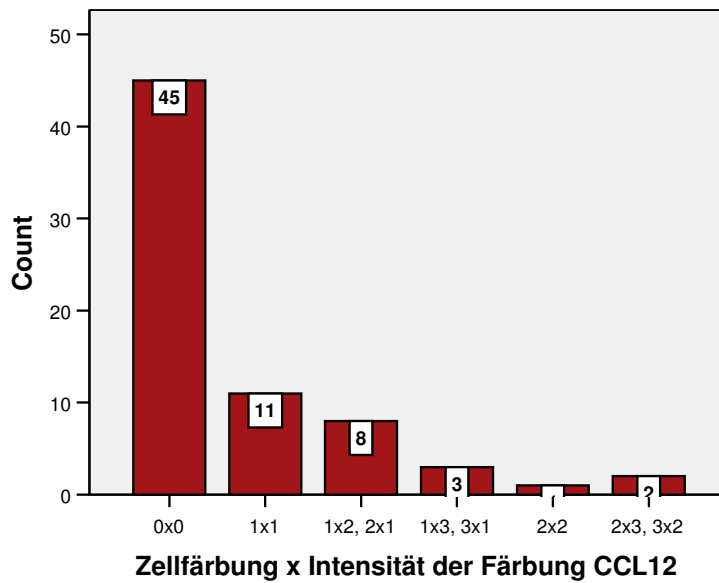


Intensität der Färbung	n	%
Keine	45	64,3
Schwache Intensität	19	27,1
Mittlere Intensität	3	4,3
Starke Intensität	3	4,3
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.3.3. und
Tabelle 5.3.3.**

**Vergleich der Intensität
keine/schwach/
mittel/stark von CCL 12**

In Tabelle 5.3.3. kann man erkennen dass die Zellen zum überwiegenden Teil (64,3%) keine Intensität bei der Anfärbung aufweisen. Danach folgt mit 27,1% die schwache Intensität der Färbung. Da auch die Anfärbung der Zellen (Abbildung 5.3.2. und Tabelle 5.3.2.) hauptsächlich im Bereich 0% lag (bei 45 Patienten bzw. 64,3%) und bei 21,4% die Anfärbung der Zellen auch nur schwach war, erhalten wir bei der Multiplikation der beiden Faktoren eine überwiegend niedrige Werteverteilung des Immunreaktiven Scores (Abbildung 5.3.4. und Tabelle 5.3.4.)



Nachweis	n	%
Zellfärbung x Intensität 0 x 0	45	64,3
Zellfärbung x Intensität 1 x 1	11	15,7
Zellfärbung x Intensität 1x2, 2x1	8	11,4
Zellfärbung x Intensität 1x3, 3x1	3	4,3
Zellfärbung x Intensität 2x2	1	1,4
Zellfärbung x Intensität 2x3, 3x2	2	2,9
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.3.4. und
Tabelle 5.3.4.**

**Vergleich der
Zellfärbung x Intensität
der Färbung von CCL
12**

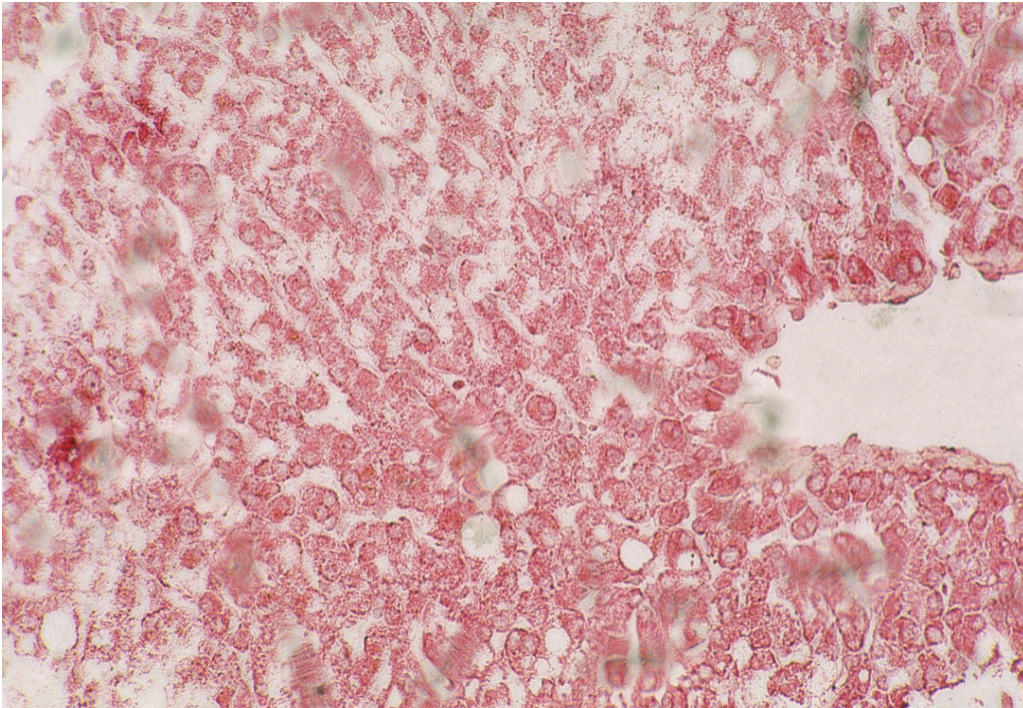


Abbildung 5.3.5. - Positivkontrolle Nachweis CXCL12, Leber

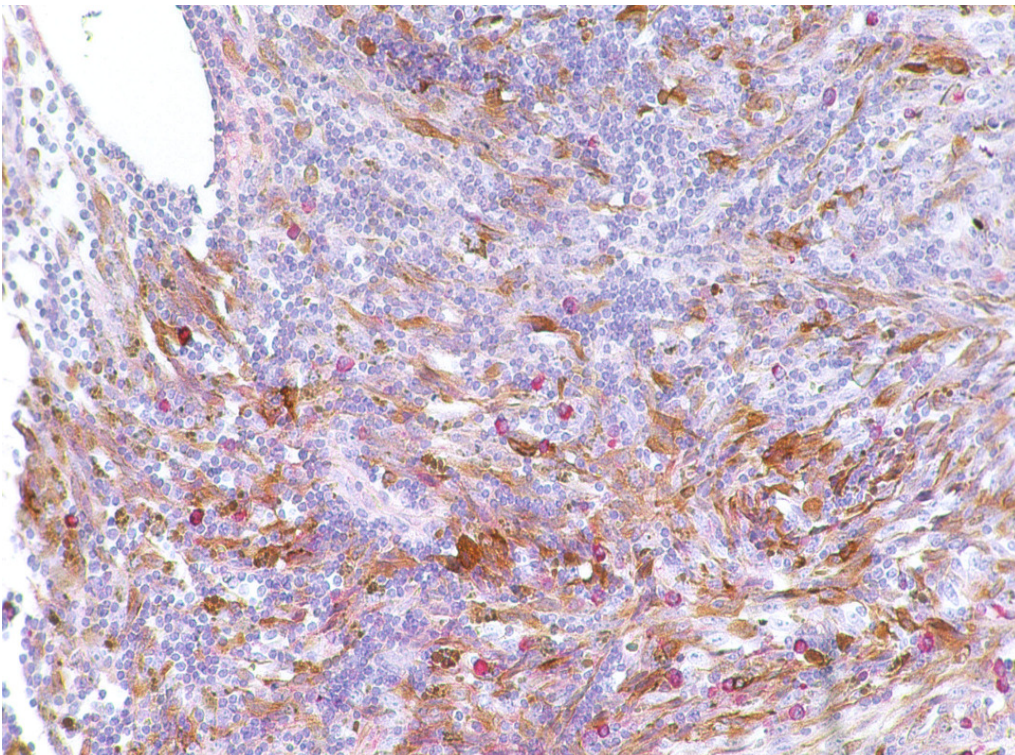


Abbildung 5.3.6. - Nachweis von CXCL12, Aderhautmelanom Nr. 241-96

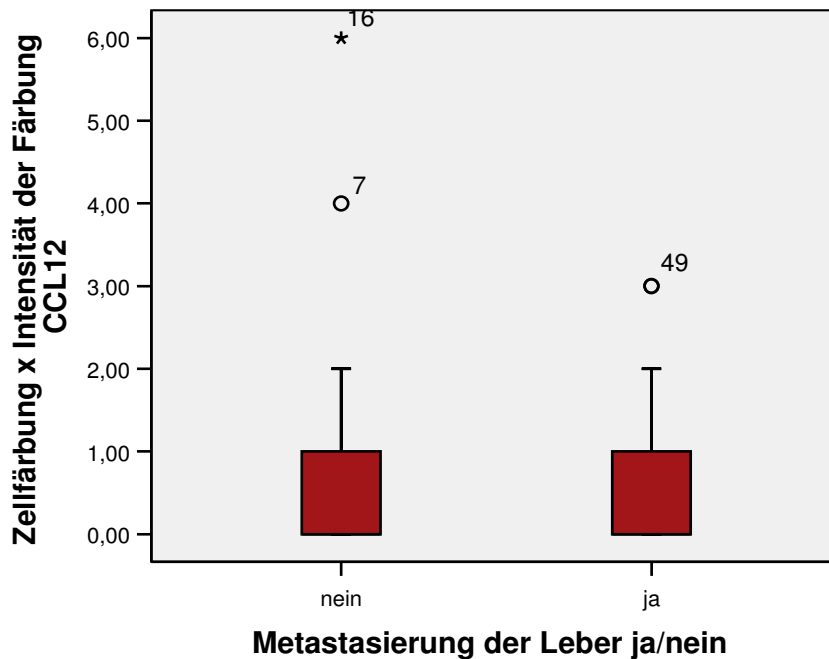


Abbildung 5.3.7. - Vergleich der Metastasierung der Leber mit dem Immunreaktiven Score von CCL12

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten welche eine Lebermetastasierung aufweisen und bei Patienten, die keine Lebermetastasierung aufweisen. Der Immunreaktive Score ist bei beiden Patientengruppen gleich.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.3.5. – Bestimmung der Signifikanz

CCL 12 und Metastasierung	P – Wert
Chi-Quadrat	0,297
Exakter Fisher – Test	0,399

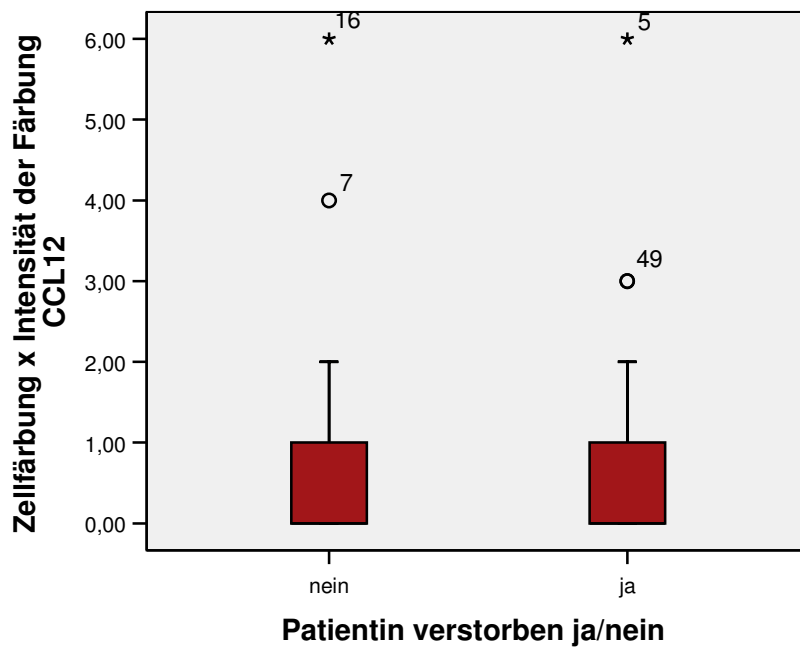


Abbildung 5.3.8. - Vergleich der Überlebensrate mit dem Immunreaktiven Score von CCL12

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten mit positiver Überlebensrate und Patienten mit negativer Überlebensrate. Der Mittelwert ist bei beiden Patientengruppen gleich.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.3.6. – Bestimmung der Signifikanz

CCL12 und Überlebensrate	P – Wert
Chi-Quadrat	0,290
Exakter Fisher – Test	0,391

5.4. Chemokinrezeptor CCR 7

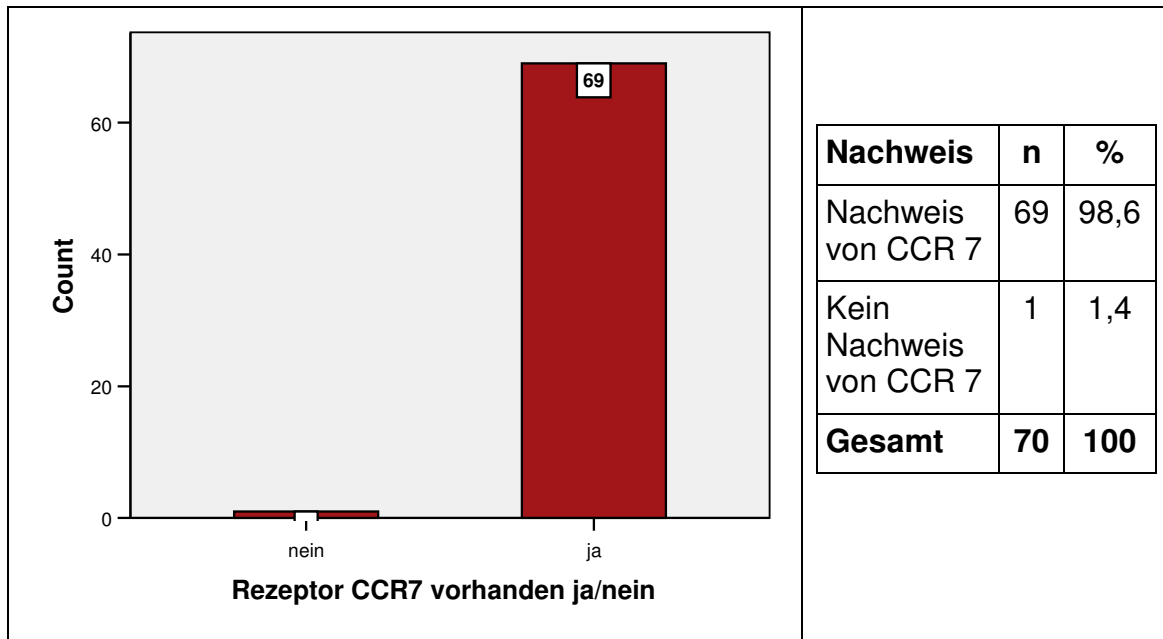
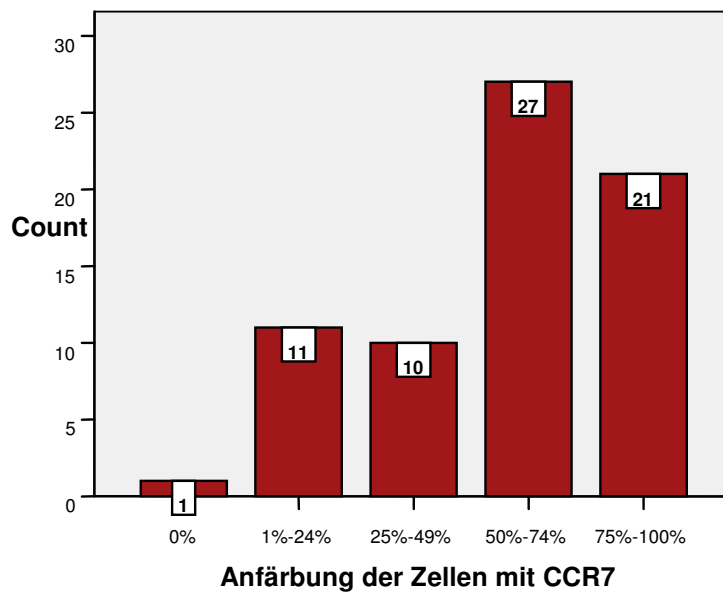


Abbildung 5.4.1. und Tabelle 5.4.1. - Nachweis der Ausprägung des Chemokinrezeptors CCR 7 auf den Aderhautmelanomzellen

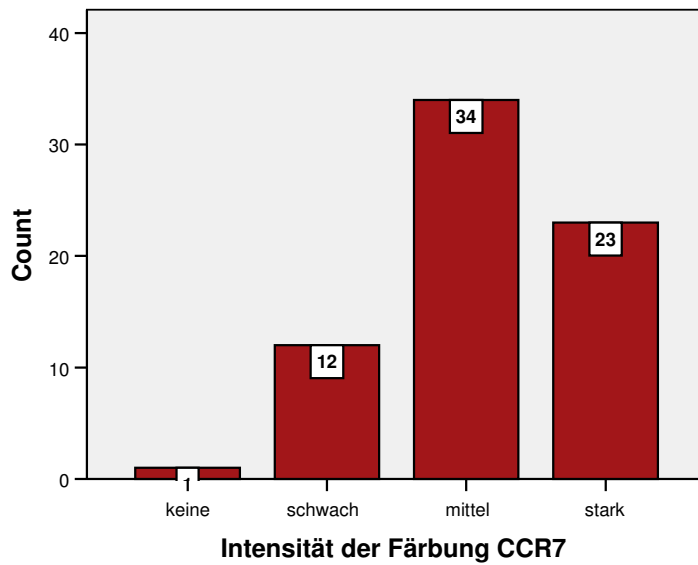
In 98,6 % der Fälle (n = 69), also bei fast allen der 70 Patienten konnte der Rezeptor CCR7 auf den Zellen der Aderhautmelanomen nachgewiesen werden.



Nachweis	n	%
Keine Anfärbung der Zellen	1	1,4
1 – 24 % Anfärbung der Zellen	11	15,7
25 – 49 % Anfärbung der Zellen	10	14,3
50 – 74 % Anfärbung der Zellen	27	38,6
75 – 100 % Anfärbung der Zellen	21	30
Gesamt	70	100

Abbildung 5.4.2. und Tabelle 5.4.2. - Nachweis der Ausprägung der Anfärbung der Zellen mit dem Chemokinrezeptor CCR 7

Es wird die Ausprägung der Zellanfärbung gezeigt. Bei 27 der 70 Patienten (38,6%) lag die Ausprägung der Zellanfärbung der Aderhautmelanome in der Kategorie 50–74% und war damit am meisten vertreten. Bei weiteren 21 Patienten (30%) zeigte sich eine Anfärbung der Zellen von 75-100%. Nur zu einem geringen Anteil fanden wir keine oder nur eine geringe Anfärbung.

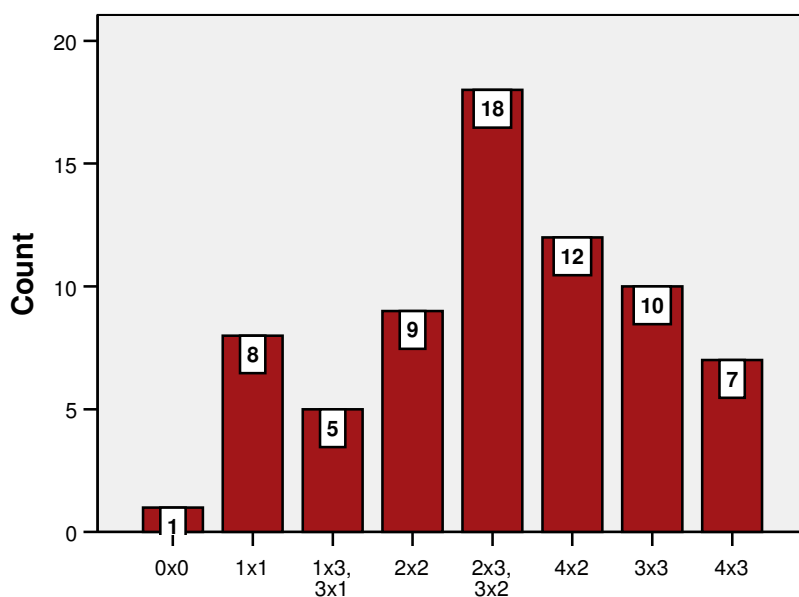


Intensität der Färbung	n	%
Keine	1	1,4
Schwache Intensität	12	17,1
Mittlere Intensität	34	48,6
Starke Intensität	23	32,9
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.4.3. und
Tabelle 5.4.3.**

**Vergleich der Intensität
keine/schwach/
mittel/stark von CCR7**

In Tabelle 5.4.3. kann man erkennen, dass die Zellen zum überwiegenden Teil (48,6%) eine mittlere Intensität bei der Anfärbung aufweisen. Danach folgt mit 32,9% die starke Ausprägung der Färbung. Da auch die Anfärbung der Zellen (Abbildung 5.4.2. und Tabelle 5.4.2.) überwiegend im Bereich 50-74 % (38,6%) und bei 30 % die Anfärbung der Zellen bei 75-100% lag, erhalten wir bei der Multiplikation der beiden Faktoren eine mittlere Werteverteilung des immunreaktiven Scores (siehe Abbildung 5.4.4. und Tabelle 5.4.4.)



Zellfärbung x Intensität der Färbung CCR7

Nachweis	n	%
Zellfärbung x Intensität 0 x 0	1	1,4
Zellfärbung x Intensität 1 x 1	8	11,4
Zellfärbung x Intensität 1x3, 3x1	5	7,14
Zellfärbung x Intensität 2x2	9	12,9
Zellfärbung x Intensität 2x3, 3x2	18	25,7
Zellfärbung x Intensität 4x2	12	17,1
Zellfärbung x Intensität 3x3	10	14,3
Zellfärbung x Intensität 4x3	7	10
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.4.4. und
Tabelle 5.4.4.**

**Vergleich der
Zellfärbung x Intensität
der Färbung von CCR 7**

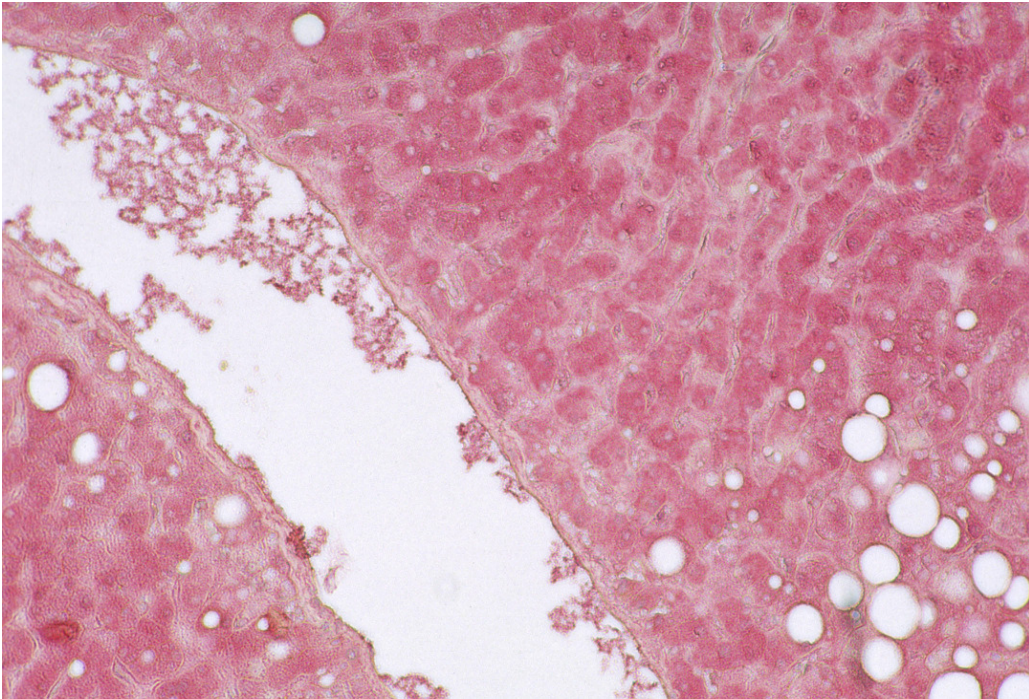


Abbildung 5.4.5. - Positivkontrolle Nachweis CCR7 Leber

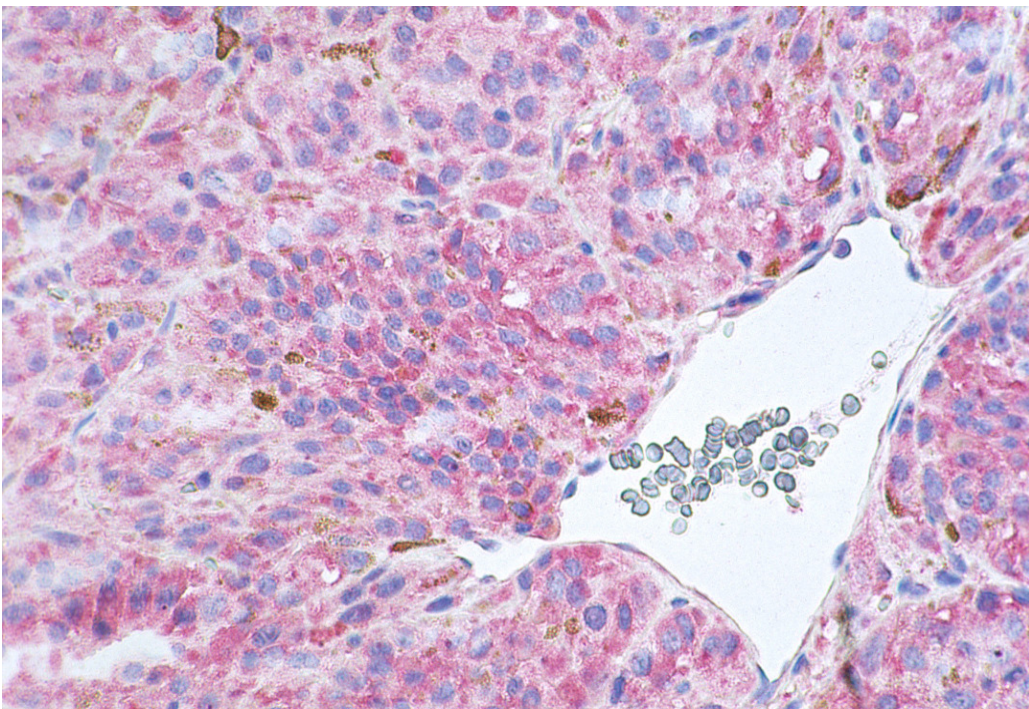


Abbildung 5.4.6. - Nachweis von CCR7, Aderhautmelanom Nr. 24-97

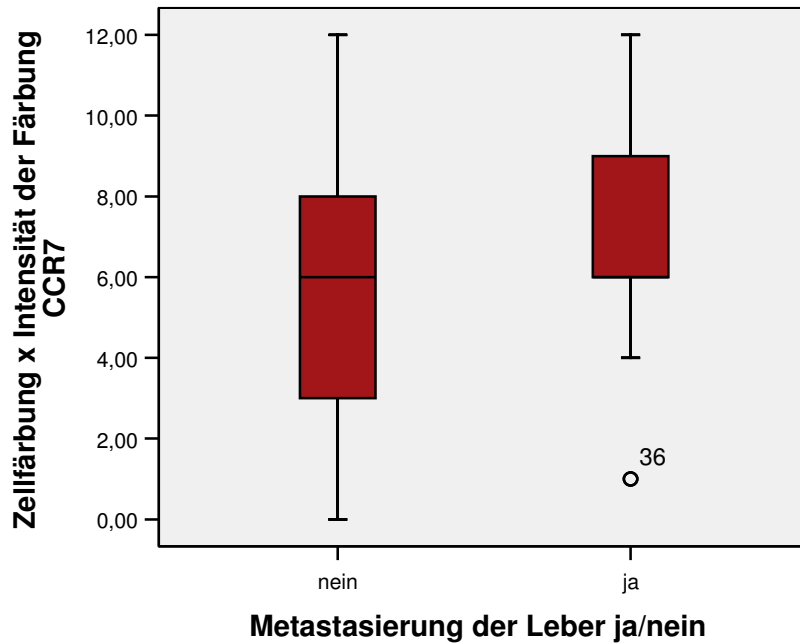


Abbildung 5.4.7. - Vergleich der Metastasierungsrate mit dem Immunreaktiven Score von CCR7

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten welche eine Lebermetastasierung aufweisen und bei Patienten, die keine Lebermetastasierung aufweisen. lässt sich ein deutlicher Unterschied in der Verteilung des Immunreaktiven Score zwischen beiden Patientengruppen feststellen.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.4.5. – Bestimmung der Signifikanz

CCR7 und Metastasierung	P – Wert
Chi-Quadrat	0,418
Exakter Fisher – Test	0,609

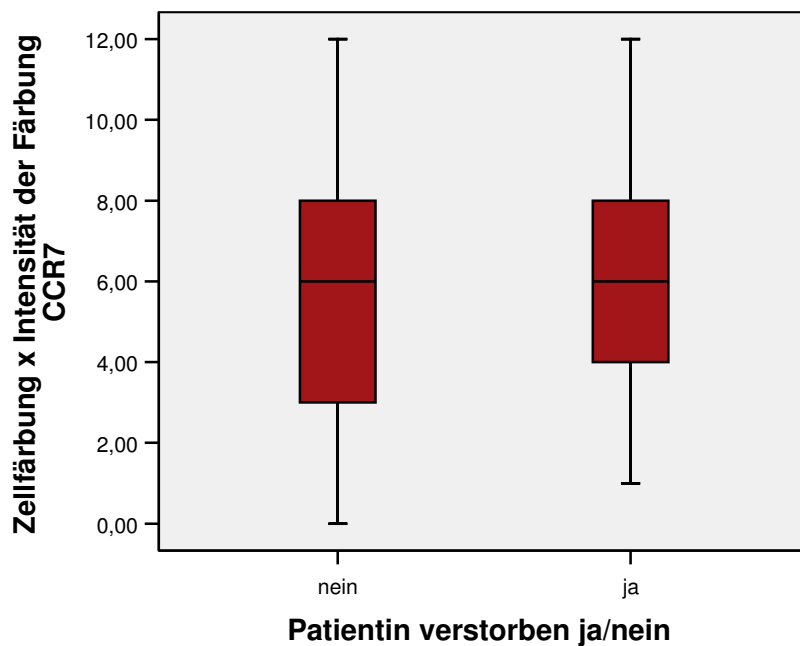


Abbildung 5.4.8. - Vergleich der Überlebensrate mit dem Immunreaktiven Score von CCR7

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten welche eine Lebermetastasierung aufweisen und bei Patienten, die keine Lebermetastasierung aufweisen. Der Immunreaktive Score war bei beiden gleich.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.4.6. – Bestimmung der Signifikanz

CCR7 und Überlebensrate	P – Wert
Chi-Quadrat	0,364
Exakter Fisher – Test	0,553

5.5. Chemokinligand CCL 19

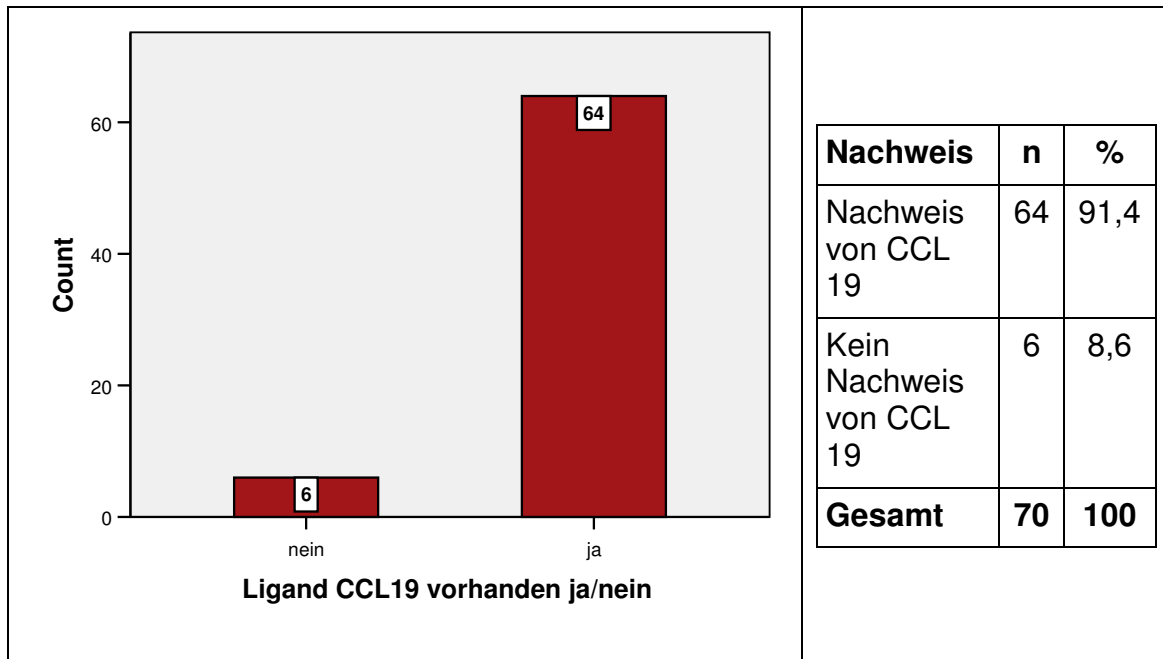
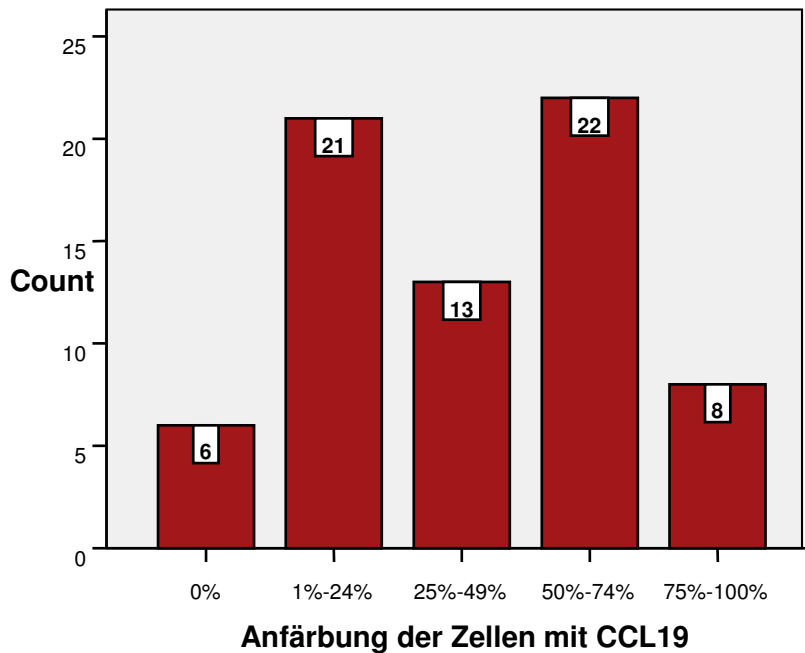


Abbildung 5.5.1. und Tabelle 5.5.1. - Nachweis der Ausprägung des Chemokinliganden CCL 19 auf den Aderhautmelanomzellen

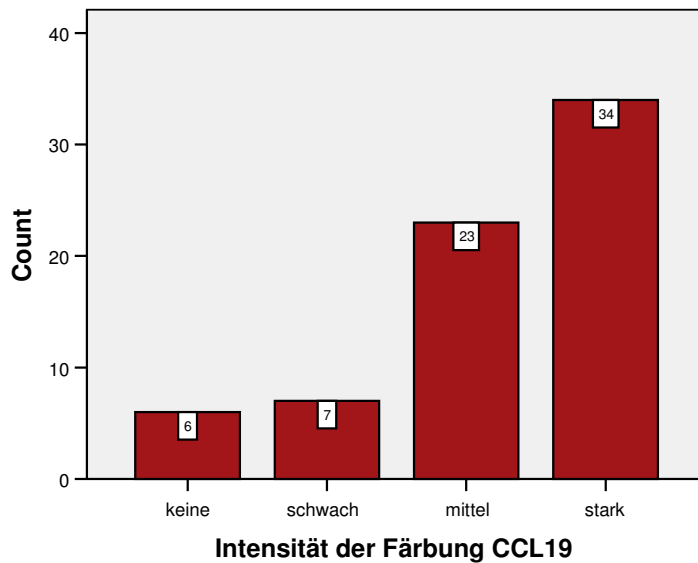
In 91,4 % der Fälle (n = 64), also bei fast allen der 70 Patienten konnte der Ligand CCL 19 auf den Zellen der Aderhautmelanomen nachgewiesen werden.



Nachweis	n	%
Keine Anfärbung der Zellen	6	8,6
1 – 24 % Anfärbung der Zellen	21	30
25 – 49 % Anfärbung der Zellen	13	18,6
50 – 74 % Anfärbung der Zellen	22	31,4
75 – 100 % Anfärbung der Zellen	8	11,4
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.5.2. und
Tabelle 5.5.2.
Nachweis der
Ausprägung der
Anfärbung der Zellen
mit dem
Chemokinliganden
CCL 19**

Es wird die Ausprägung der Zellanfärbung gezeigt. Bei 21 der 70 Patienten (30%) lag die Ausprägung der Zellanfärbung der Aderhautmelanome in der Kategorie 1-24% und bei 22 Patienten (31,4%) in der Kategorie 50-74% und war damit am meisten vertreten. Bei weiteren 13 Patienten (18,6%) zeigte sich eine Anfärbung der Zellen von 25-49%. Nur zu einem geringen Anteil fanden wir keine oder eine sehr starke (75-100%) Anfärbung.

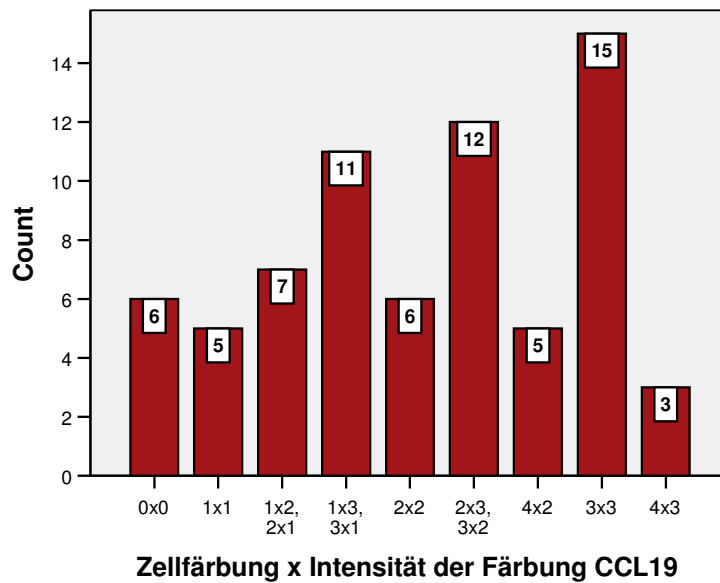


Intensität der Färbung	n	%
Keine	6	8,6
Schwache Intensität	7	10
Mittlere Intensität	23	32,9
Starke Intensität	34	48,5
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.5.3. und
Tabelle 5.5.3.**

**Vergleich der Intensität
keine/schwach/
mittel/stark von CCL19**

In Tabelle 5.5.3. kann man erkennen, dass die Zellen zum überwiegenden Teil (34 Patienten bzw. 48,5%) eine starke Intensität bei der Anfärbung aufweisen. Danach folgt mit 32,9% (n = 23) die mittlere Ausprägung der Färbung. Da die Anfärbung der Zellen (Abbildung 5.5.2. und Tabelle 5.5.2.) hauptsächlich im Bereich 50-74% und 1-24% lag und bei 18,6 % eine mittlere Anfärbung der Zellen vorlag, erhalten wir bei der Multiplikation der beiden Faktoren eine unregelmäßige Werteverteilung über den gesamten Bereich des immunreaktiven Scores (siehe Abbildung 5.5.4. und Tabelle 5.5.4.)



Nachweis	n	%
Zellfärbung x Intensität 0 x 0	6	8,6
Zellfärbung x Intensität 1 x 1	5	7,1
Zellfärbung x Intensität 1x2, 2x1	7	10
Zellfärbung x Intensität 1x3, 3x1	11	15,7
Zellfärbung x Intensität 2x2	6	8,6
Zellfärbung x Intensität 2x3, 3x2	12	17,1
Zellfärbung x Intensität 4x2	5	7,1
Zellfärbung x Intensität 3x3	15	21,5
Zellfärbung x Intensität 4x3	3	4,3
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.5.4. und
Tabelle 5.5.4.**

**Vergleich der
Zellfärbung x Intensität
der Färbung von
CCL19**

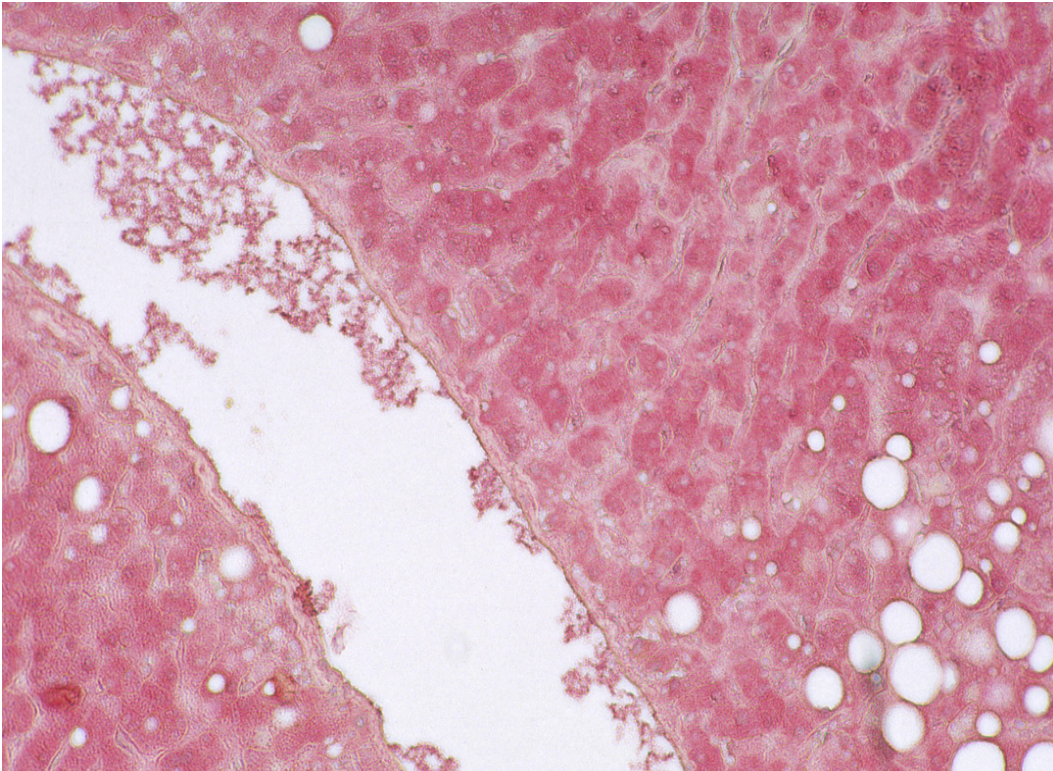


Abbildung 5.5.5. - Positivkontrolle Nachweis von CCL19, Leber

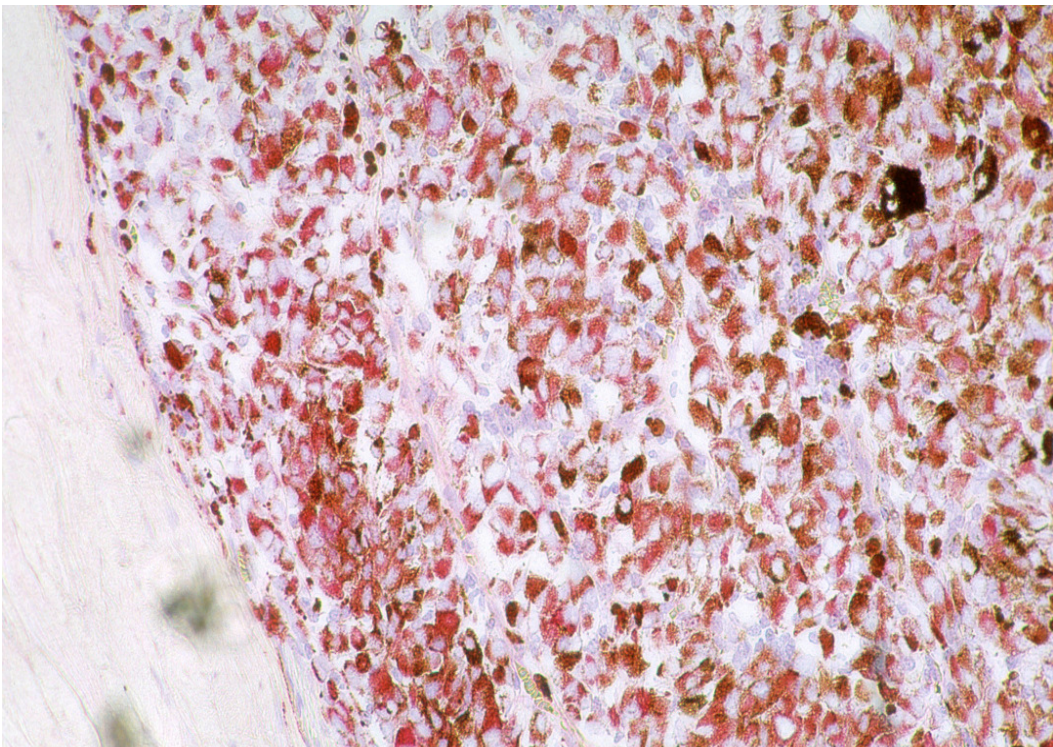


Abbildung 5.5.6. - Nachweis von CCL19, Aderhautmelanom Nr. 178-96

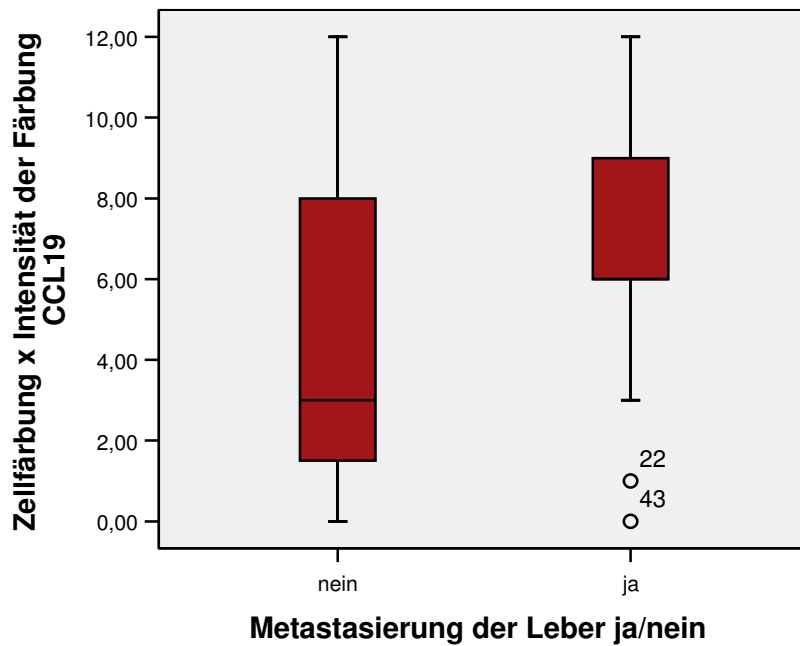


Abbildung 5.5.7. - Vergleich der Metastasierung der Leber mit dem Immunreaktiven Score von CCL19

Beim Vergleich des Immunreaktiven Scores von Patienten mit Lebermetastasierung und Patienten ohne Lebermetastasierung zeigte sich deutlicher Unterschied.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich allerdings sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.5.5. – Bestimmung der Signifikanz

CCL19 und Metastasierung	P – Wert
Chi-Quadrat	0,831
Exakter Fisher – Test	0,664

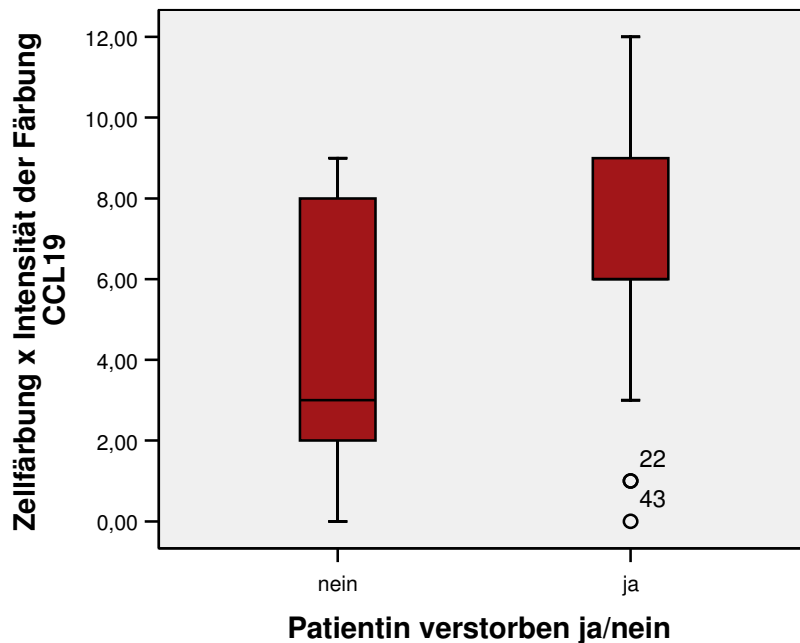


Abbildung 5.5.8. - Vergleich der Überlebensrate mit dem Immunreaktiven Score von CCL19

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten mit positiver Überlebensrate und bei Patienten mit negativer Überlebensrate. Es lässt sich ein deutlicher Unterschied in der Verteilung des Immunreaktiven Score zwischen beiden Patientengruppen feststellen.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.5.6. – Bestimmung der Signifikanz

CCL19 und Überlebensrate	P – Wert
Chi-Quadrat	0,683
Exakter Fisher – Test	0,581

5.6. Chemokinrezeptor CKR10

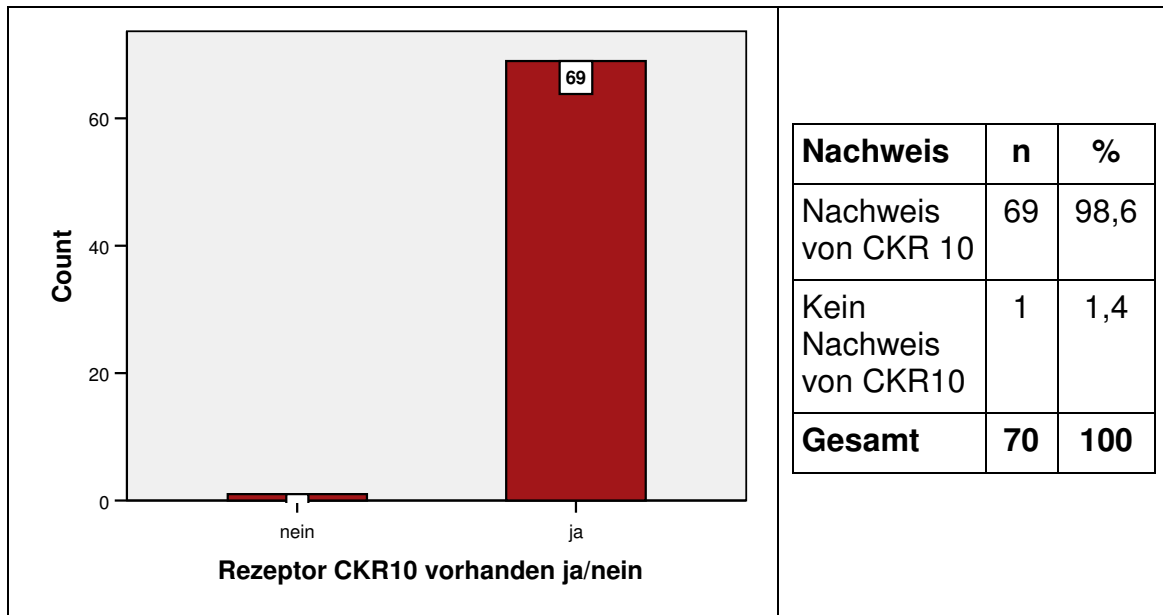
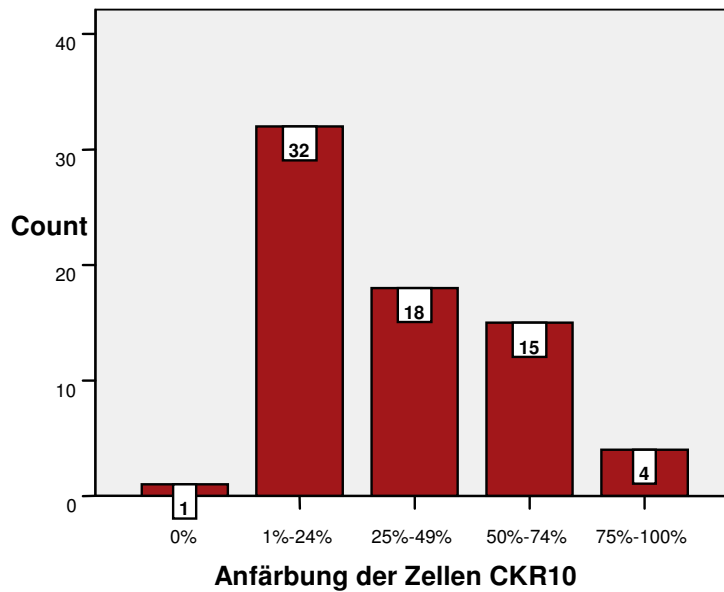


Abbildung 5.6.1. und Tabelle 5.6.1. - Nachweis der Ausprägung des Chemokinrezeptors CKR 10 auf den Aderhautmelanomzellen

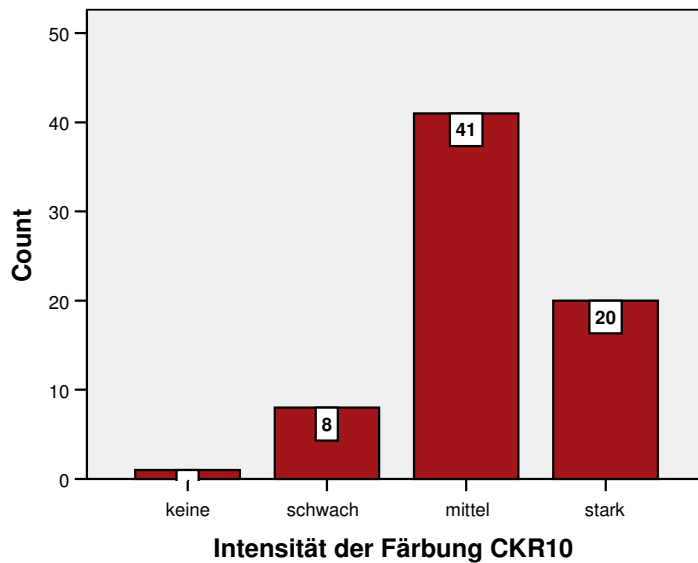
In 98,6 % der Fälle (n = 69), also bei fast allen der 70 Patienten konnte der Rezeptor CKR10 auf den Zellen der Aderhautmelanomen nachgewiesen werden.



Nachweis	n	%
Keine Anfärbung der Zellen	1	1,4
1 – 24 % Anfärbung der Zellen	32	45,7
25 – 49 % Anfärbung der Zellen	18	25,7
50 – 74 % Anfärbung der Zellen	15	21,4
75 – 100 % Anfärbung der Zellen	4	5,7
Gesamt	70	100

Abbildung 5.6.2. und Tabelle 5.6.2. Nachweis der Ausprägung der Anfärbung der Zellen mit dem Chemokin Rezeptor CKR 10

Es wird die Ausprägung der Anfärbung der Zellen gezeigt. Bei 32 der 70 Patienten (45,7%) lag die Ausprägung der Zellanfärbung der Aderhautmelanome in der Kategorie 1-24% und bei 18 der 70 Patienten (25,7%) in der Kategorie 25-49% und war damit am meisten vertreten. Bei weiteren 15 Patienten (21,4%) zeigte sich eine Anfärbung der Zellen von 50-74%. Nur zu einem geringen Anteil fanden wir keine oder eine sehr starke (75-100%) Anfärbung.

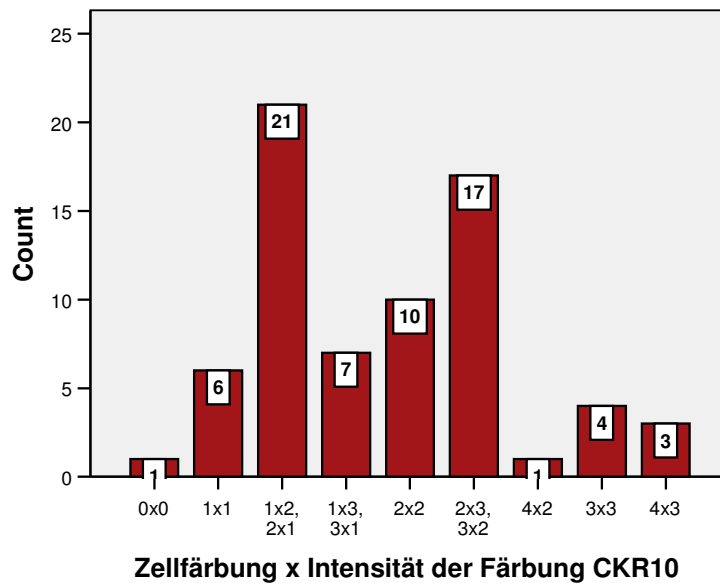


Intensität der Färbung	n	%
Keine	1	1,4
Schwache Intensität	8	11,4
Mittlere Intensität	41	58,6
Starke Intensität	20	28,5
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.6.3. und
Tabelle 5.6.3.**

**Vergleich der Intensität
keine/schwach/
mittel/stark von CKR10**

In Tabelle 5.6.3. kann man erkennen, dass die Zellen zum überwiegenden Teil (41 Patienten bzw. 58,6%) eine mittlere Intensität bei der Anfärbung aufweisen. Danach folgt mit 28,5% (n = 20) die starke Ausprägung der Färbung. Da auch die Anfärbung der Zellen (Abbildung 5.6.2. und Tabelle 5.6.2.) überwiegend im Bereich 1-24% lag (45,7%) und bei 25,7% die Anfärbung der Zellen bei 25-49% lag, erhalten wir bei der Multiplikation der beiden Faktoren eine unregelmäßige Werteverteilung des Immunreaktiven Score (siehe Abbildung 5.6.4. und Tabelle 5.6.4.).



Nachweis	n	%
Zellfärbung x Intensität 0x0	1	1,4
Zellfärbung x Intensität 1x1	6	8,6
Zellfärbung x Intensität 1 x2, 2x1	21	30
Zellfärbung x Intensität 1x3, 3x1	7	10
Zellfärbung x Intensität 2x2	10	14,3
Zellfärbung x Intensität 2x3, 3x2	17	24,3
Zellfärbung x Intensität 4x2	1	1,4
Zellfärbung x Intensität 3x3	4	5,7
Zellfärbung X Intensität 4x3	3	4,3
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.6.4. und
Tabelle 5.6.4.**

**Vergleich der
Zellfärbung x Intensität
der Färbung von
CKR10**

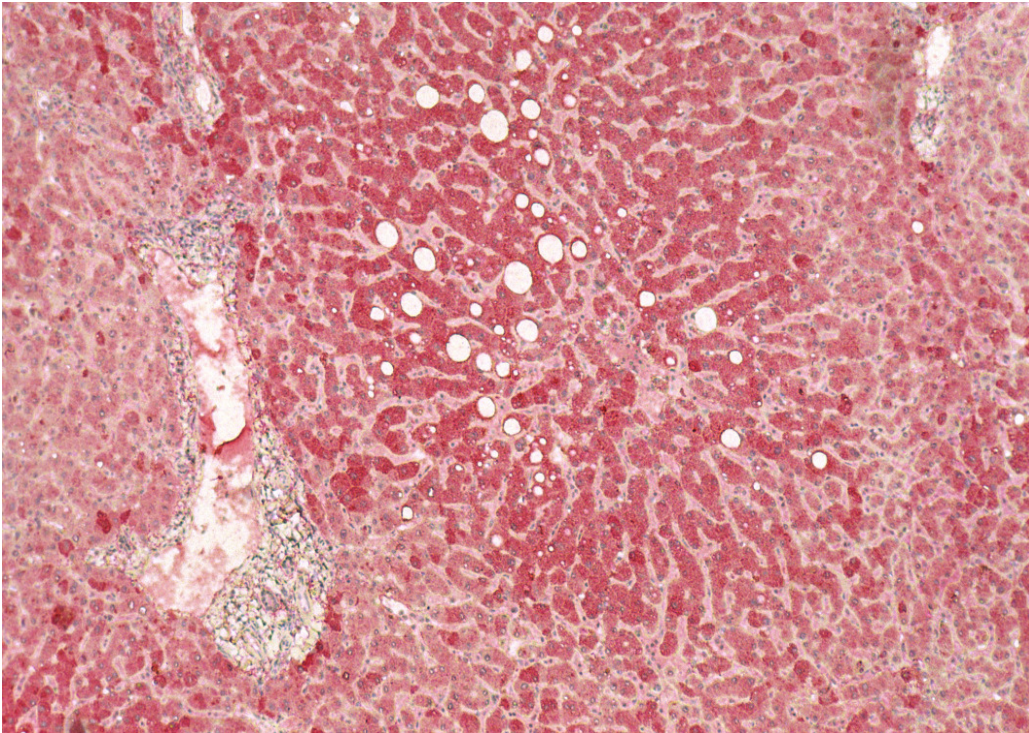


Abbildung 5.6.5. - Positivkontrolle Nachweis CKR10, Leber

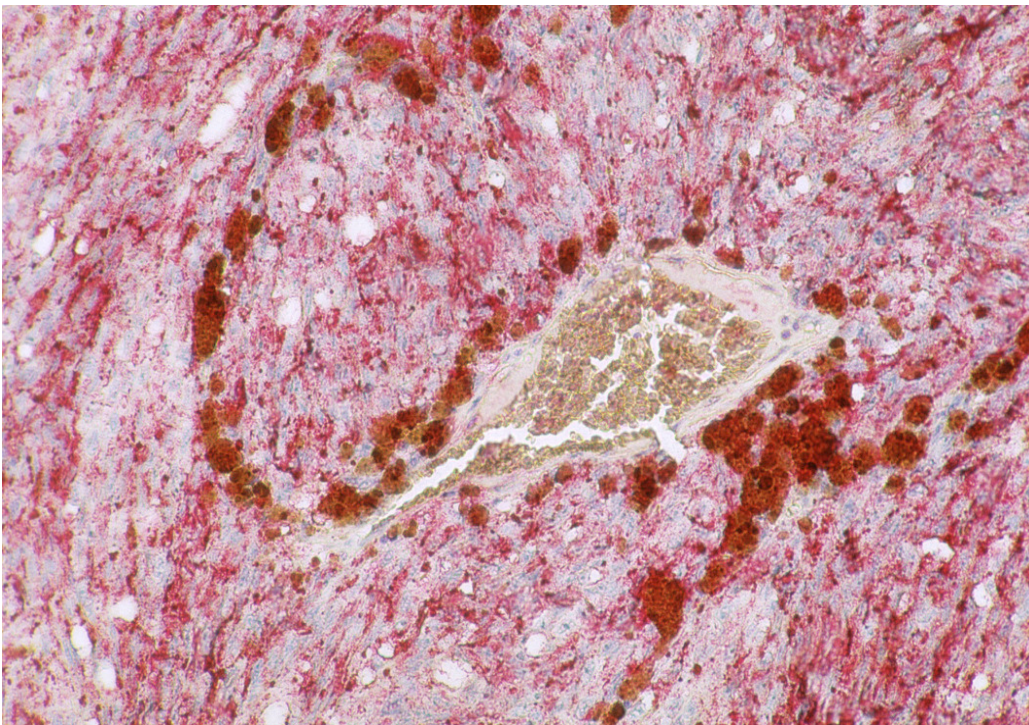


Abbildung 5.6.6. - Nachweis von CKR 10, Aderhautmelanom Nr. 18-97

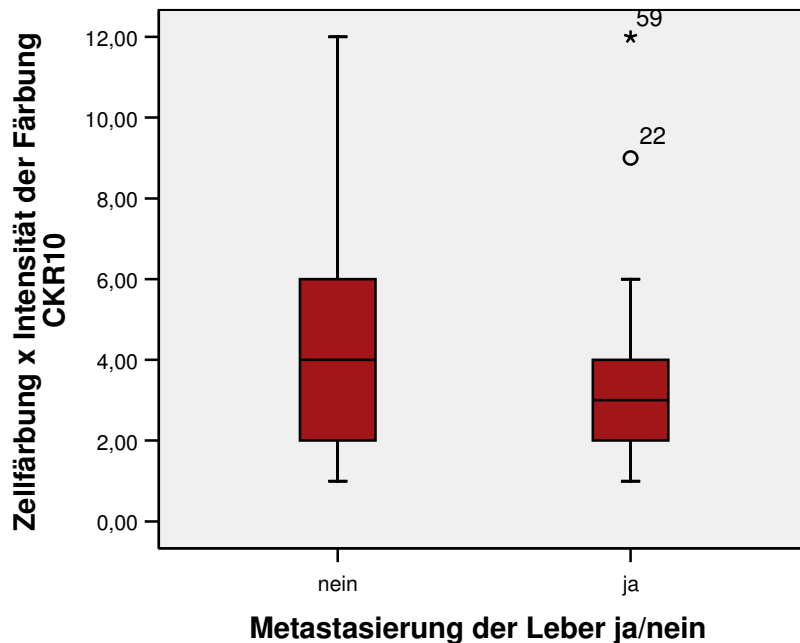


Abbildung 5.6.7. - Vergleich der Metastasierung der Leber mit dem Immunreaktiven Score von CKR10

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten welche eine Lebermetastasierung aufweisen und bei Patienten, die keine Lebermetastasierung aufweisen. Es lässt sich ein leichter Unterschied in der Verteilung des Immunreaktiven Score zwischen beiden Patientengruppen feststellen.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.6.5. – Bestimmung der Signifikanz

CKR10 und Metastasierung	P – Wert
Chi-Quadrat	0,207
Exakter Fisher – Test	0,391

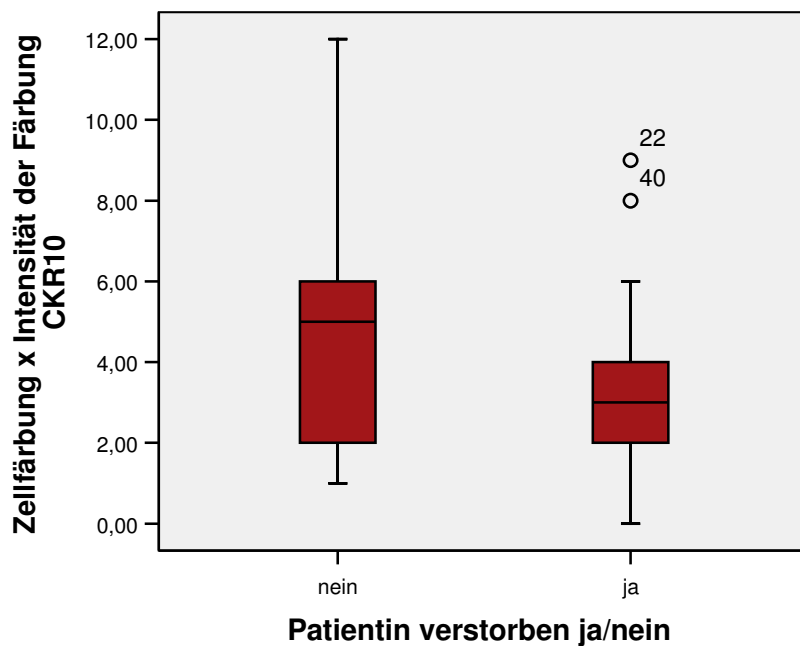


Abbildung 5.6.8. - Vergleich der Überlebensrate mit dem Immunreaktiven Score von CKR10

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten mit positiver Überlebensrate und Patienten mit negativer Überlebensrate. Auch hier lässt sich ein leichter Unterschied in der Verteilung des Immunreaktiven Score zwischen beiden Patientengruppen feststellen.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.6.6. – Bestimmung der Signifikanz

CKR10 und Überlebensrate	P – Wert
Chi-Quadrat	0,261
Exakter Fisher – Test	0,447

5.7. Chemokinligand CCL 27

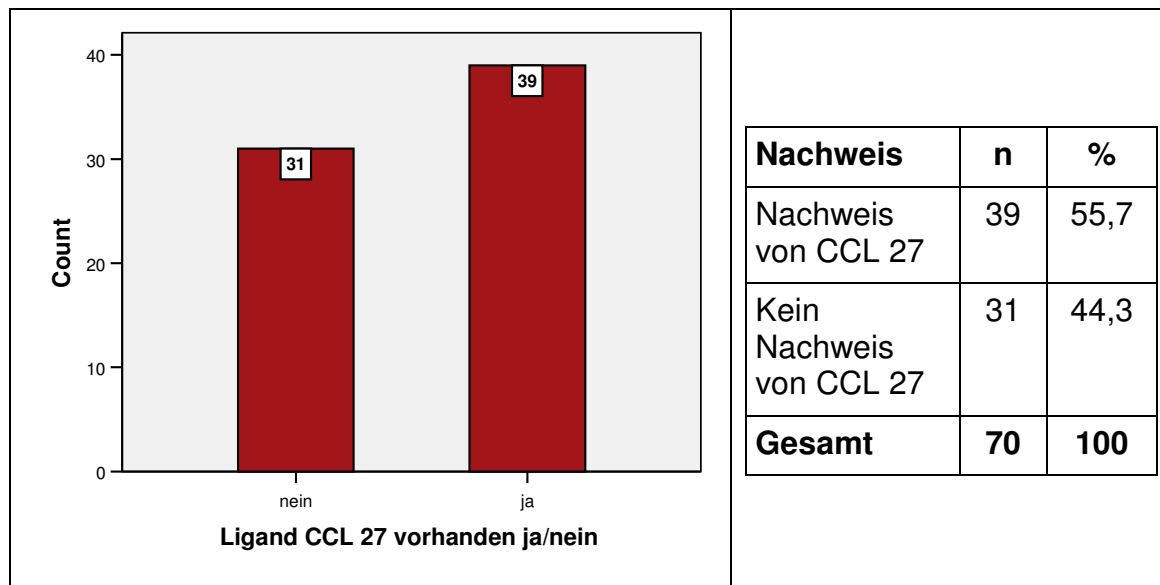
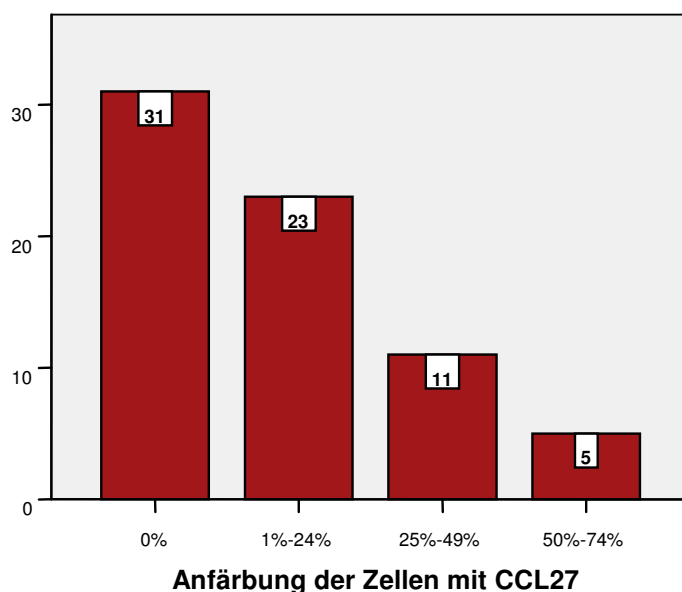


Abbildung 5.7.1. und Tabelle 5.7.1. - Nachweis der Ausprägung des Chemokinliganden CCL 27 auf den Aderhautmelanomzellen

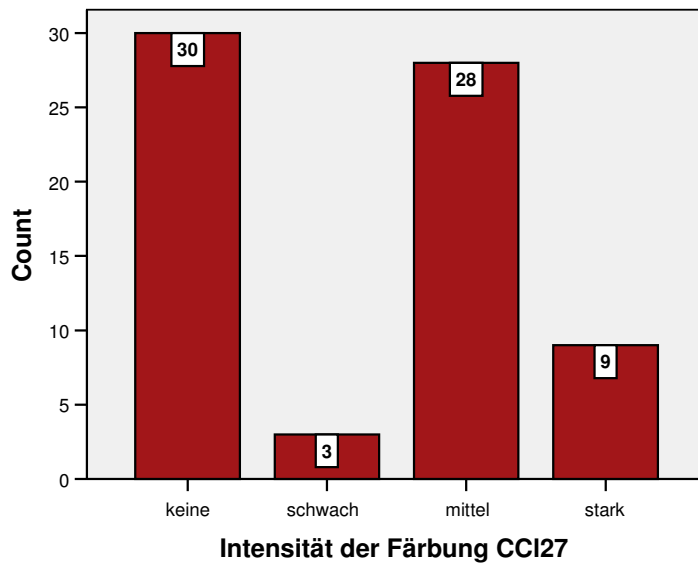
Von den untersuchten 70 Patienten konnte nur in 39 Fällen (55,7%) CCL 27 auf den Zellen der Aderhautmelanomen nachgewiesen werden. Bei den restlichen 31 Aderhautmelanomen konnte der Chemokinligand CCL27 nicht nachgewiesen werden.



Nachweis	n	%
Keine Anfärbung der Zellen	31	44,3
1 – 24 % Anfärbung der Zellen	23	32,9
25 – 49 % Anfärbung der Zellen	11	15,7
50 – 74 % Anfärbung der Zellen	5	7,1
75 – 100 % Anfärbung der Zellen	0	0
Gesamt	70	100

Abbildung 5.7.2. und Tabelle 5.7.2. - Nachweis der Ausprägung der Anfärbung der Zellen mit dem Liganden CCL 27

Es wird die Ausprägung der Zellanfärbung gezeigt. Bei 31 der 70 Patienten (44,3%) lag keine Ausprägung der Zellanfärbung der Aderhautmelanome vor und war damit am meisten vertreten. Bei weiteren 23 Patienten (32,9%) zeigte sich eine leichte Anfärbung der Zellen in der Kategorie 1-24%. Nur zu einem geringen Anteil fanden wir eine mittlere oder eine starke Anfärbung.

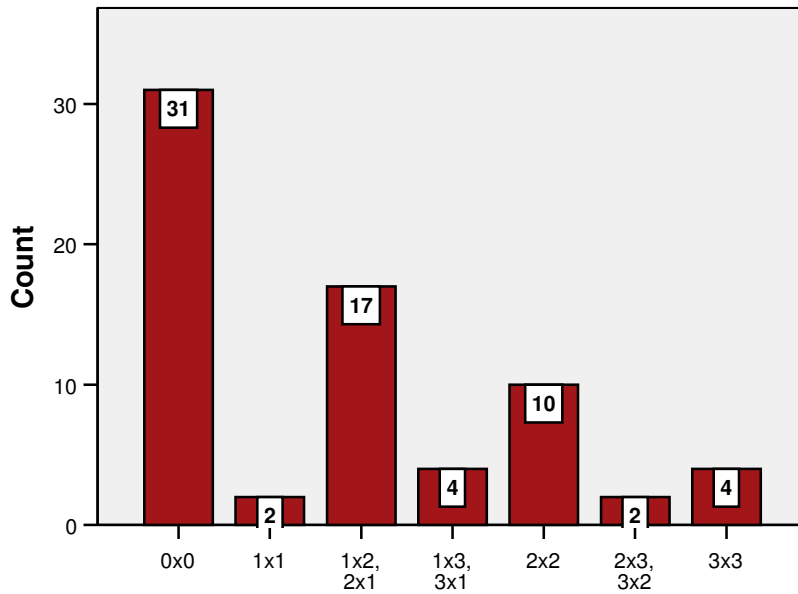


Intensität der Färbung	n	%
Keine	30	42,9
Schwache Intensität	3	4,3
Mittlere Intensität	28	40
Starke Intensität	9	12,9
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.7.3. und
Tabelle 5.7.3.**

**Vergleich der Intensität
keine/schwach/
mittel/stark von CCL27**

In Tabelle 5.7.3. kann man erkennen, dass die Zellen zum überwiegenden Teil (42,9%) eine mittlere Intensität bei der Anfärbung aufweisen. Danach folgt mit 12,9% die starke Ausprägung der Färbung. Da auch die Anfärbung der Zellen (Abbildung 5.7.2. und Tabelle 5.7.2.) überwiegend im Bereich 0 % lag (44,3%) und bei 32,9% die Anfärbung der Zellen bei 0-24% war, erhalten wir bei der Multiplikation der beiden Faktoren eine unregelmäßige Werteverteilung im Bereich des niederen Immunreaktiven Scores (siehe Abbildung 5.7.4. und Tabelle 5.7.4.)



Zellfärbung x Intensität der Färbung CCL27

Nachweis	n	%
Zellfärbung x Intensität 0 x 0	31	44,3
Zellfärbung x Intensität 1 x 1	2	2,9
Zellfärbung x Intensität 1x2, 2x1	17	24,3
Zellfärbung x Intensität 1x3, 3x1	4	5,7
Zellfärbung x Intensität 2x2	10	14,3
Zellfärbung x Intensität 2x3, 3x2	2	2,9
Zellfärbung x Intensität 3x3	4	5,7
Gesamt	70	100

**Abbildung 5.7.4. und
Tabelle 5.7.4**

**Vergleich der
Zellfärbung x Intensität
der Färbung von
CCL27**

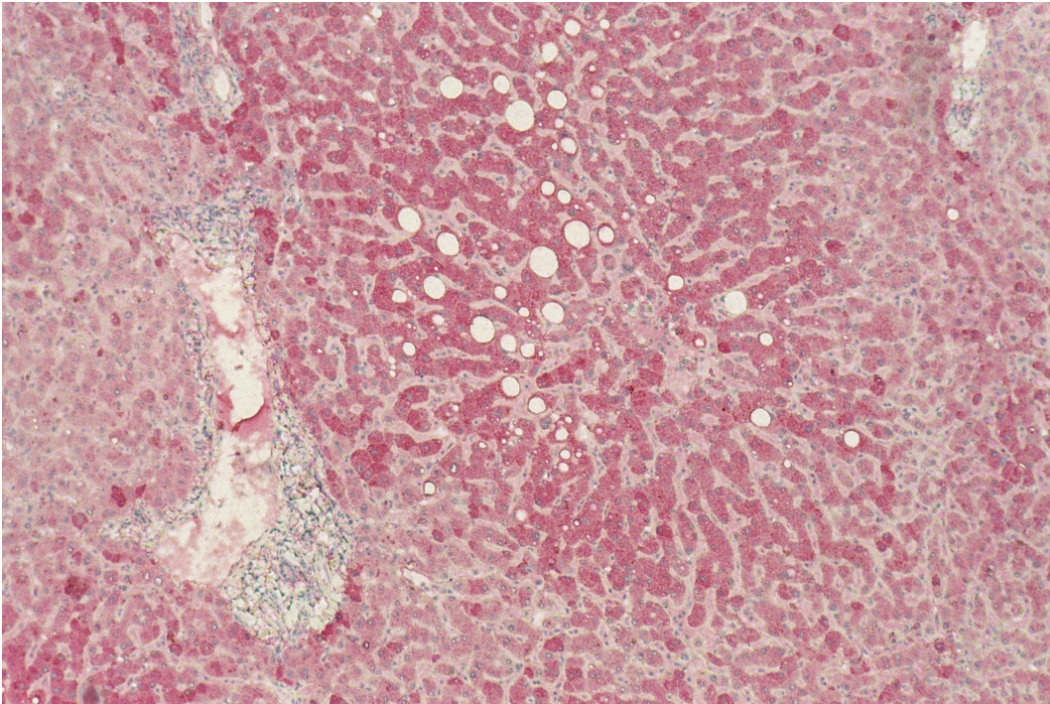


Abbildung 5.7.5. - Positivkontrolle Nachweis CCL27, Leber

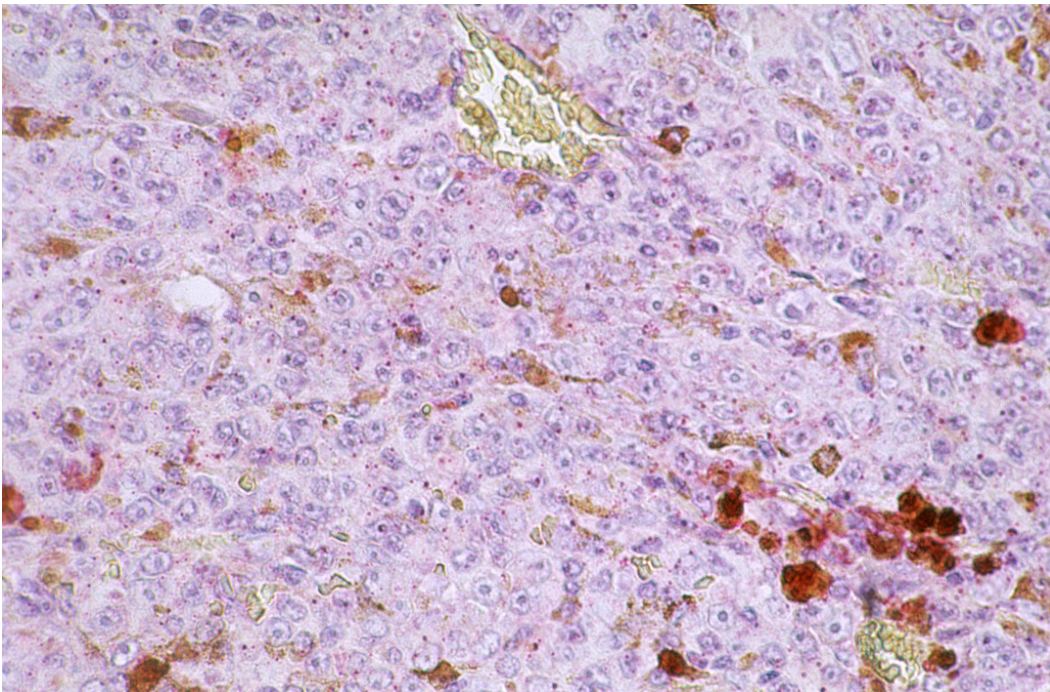


Abbildung 5.7.6. - Nachweis von CCL27, Aderhautmelanom Nr. 123-97

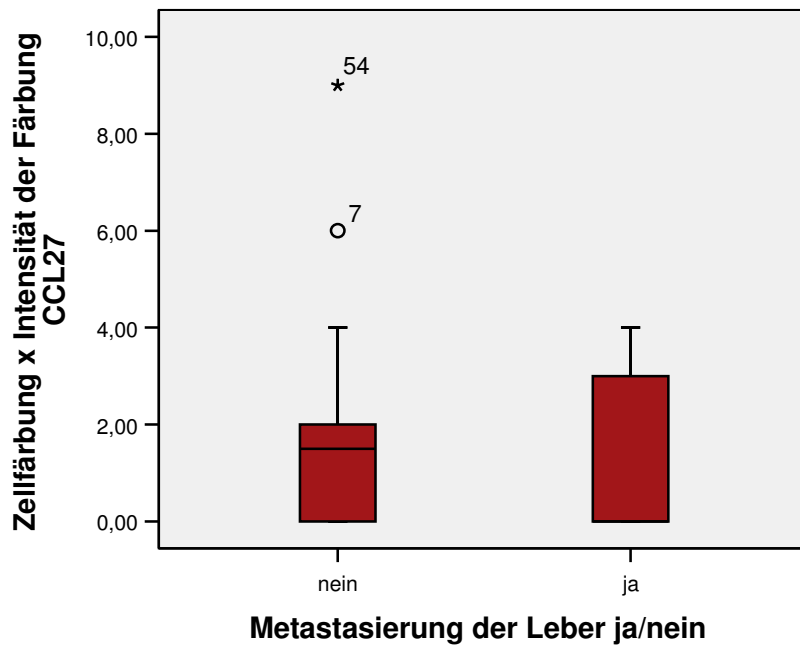


Abbildung 5.7.7. - Vergleich der Metastasierung der Leber mit dem Immunreaktiven Score von CCL27

Vergleich des Immunreaktiven Score von Patienten mit Lebermetastasierung und bei Patienten ohne Lebermetastasierung. Es lässt sich ein leichter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen feststellen.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.7.5. – Bestimmung der Signifikanz

CCL27 und Metastasierung	P – Wert
Chi-Quadrat	0,813
Exakter Fisher – Test	0,526

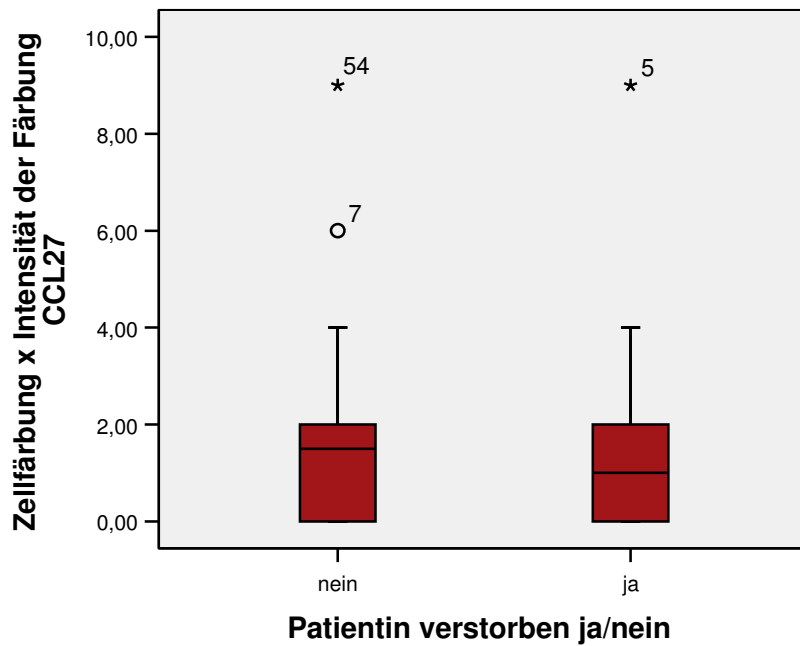


Abbildung 5.7.8. - Vergleich der Überlebensrate mit dem Immunreaktiven Score von CCL27

Vergleich des Immunreaktiven Scores bei Patienten welche eine Lebermetastasierung aufweisen und bei Patienten, die keine Lebermetastasierung aufweisen. Der immunreaktive Score war bei beiden etwa gleich.

In Bezug auf die Signifikanz ließ sich sowohl mit dem Chi-Quadrat als auch mit dem exakten Fisher-Test keine Signifikanz nachweisen.

Tabelle 5.7.6. – Bestimmung der Signifikanz

CCL27 und Überlebensrate	P – Wert
Chi-Quadrat	0,920
Exakter Fisher – Test	0,576

6 Diskussion

6.1. Allgemein

Chemokine sind eine Familie kleiner chemotaktischer Zytokine, welche an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind und eine wichtige Rolle bei Migrationsvorgängen von hämatopoetischen und anderen Zellen spielen [13, 56].

Chemokine werden auf den unterschiedlichsten Zellen exprimiert, durch die sie abhängig von der Art der Zellen der Gruppe der inflammatorischen oder der Gruppe der homöostatischen Chemokine zugeordnet werden können. Die inflammatorischen Chemokine spielen dabei eine wichtige Rolle bei Entzündungen, Infektionen, Autoimmunerkrankungen und Allergieantworten. Homöostatische Chemokine sind dagegen in lymphatischen Geweben anzutreffen und für die B- und T-Zellentwicklung von Bedeutung. Es wird auch diskutiert, dass diese Chemokine möglicherweise an der Infiltration von Lymphknoten mit hämatopoetischen Tumorzellen beteiligt sind. [7, 57, 43]

Tumorentwicklung, Tumorwachstum und Metastasierung sind die häufigsten Ursachen für Erkrankung und Tod. Sie sind multifaktorielle Prozesse, welche durch eine große Bandbreite von intrinsischen und anderen Faktoren beeinflusst wird. Eine große Rolle dabei spielt auch die Chemokin Superfamilie, von der einige Vertreter die Metastasierung unterstützen und andere die fundamentalen Ereignisse der Tumorbildung und Metastasierung inhibieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden exzidierte Aderhautmelanome in Paraffin eingebettet, geschnitten und immunhistochemisch gegen bestimmte Chemokine angefärbt, mit dem Ziel herauszufinden, welche Chemokinrezeptoren bzw. Liganden auf den Tumorzellen der untersuchten Aderhautmelanome ausgeprägt werden und ob Korrelationen zwischen der Ausprägung und der Metastasierung bzw. der 5 JÜLR bestehen.

Es wurden dazu die Chemokinrezeptoren CXCR4, CCR7, CCR10 und ihre Liganden CCL12/SDF-1, CCL21/MIP-3 β , CCL19/6 Ckine und CCL27/CTACK ausgewählt, da diese in letzteren Studien auf Hautmelanomen nachgewiesen werden konnten [53, 45, 44].

6.2. Chemokinrezeptor CXCR4 und Chemokinligand CXCL12

CXCR4 ist einer der am häufigsten untersuchten Chemokinrezeptoren. Er wird auf vielen verschiedenen Zelltypen, unter anderem auf den meisten Zellen der Hämatopoese, sowie auf vaskulären Endothelzellen, Neuronen, Mikroglia und Astrozyten ausgeprägt [11, 30, 31, 32].

In den letzten Jahren rückte CXCR4 in den Mittelpunkt der Forschung, da man herausfand, dass dieser eine wesentliche Rolle bei AIDS spielt und der nötige Co-Faktor für die CD4- vermittelte Infektion von T-Zellen bei HIV ist [46].

Chemokin CXCL12 (auch SDF-1/stromal-cell derived factor-1 genannt) ist der Ligand des Chemokinrezeptors CXCR4 ist. Es handelt sich um ein Chemokin, welchem das Aminosäure-Triplett Glutaminsäure-Leuzin-Arginin fehlt und die Ausbildung des VEGF auf Endothel Zellen bewirkt [58].

Der humane SDF1-Faktor bewirkt die Chemotaxis von T-Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten [73]. Trotzdem ist seine Ausprägung nicht nur auf die Leukozytenabstammung beschränkt. Hohe Ausprägung weist SDF1 auch in der menschlichen Bauchspeicheldrüse, Leber, Milz, Eierstock und Dünndarm auf. Niedrige Ausprägung wurden gefunden im Intestinum, Niere, Haut Skelettmuskel und dem Gehirn [44, 45, 67].

SDF1 interagiert mit dem 7-Transmembran-G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR4. Die Ausprägung von CXCR4 in T-Lymphozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten vermitteln die chemotaktische Antwort auf SDF1. CXCR4 hat eine wichtige Funktion bei der embryonalen Reifung des Immunsystems und des Kreislaufsystems, wie Experimente an SDF-1- Knock-out Mäusen zeigten, die in utero aufgrund schwerer Entwicklungsfehler

verstarben [48, 76]. Fehlt bei Mäusen SDF1 so wird auch an Herz, Hirn und bei der Hämatopoese CXCR4 nicht ausgeprägt [50].

Der Chemokinrezeptor CXCR4 wurde bereits auf verschiedenen Geweben detektiert, wie zum Beispiel Lunge, Leber, Neuroblastomen, Hautmelanomen. Muller et al. konnten 2001 anhand einer Studie zu Brustkrebs die Metastasierung durch Interaktion des Rezeptors mit seinem Liganden nachweisen [45].

In einer anderen Studie wurde kürzlich nachgewiesen [12], dass der Chemokinrezeptor CXCR 4 ebenfalls auf uvealen Melanomen ausgeprägt wird. Dazu wurden Melanomzellreihen angefärbt. In der Studie von Scala et al., in welcher nur die Anfärbung der Zellen berücksichtigt wurde, war bei 60% der Zellreihen eine positive Anfärbung vorhanden [59].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Melanomzellreihen, sondern Paraffinschnitte von Tumoren angefärbt. Der Rezeptor CXCR4 ließ sich mittels immunhistochemischer Methoden auf 69 (98,6%) von 70 untersuchten Materialschnitten nachweisen.

Dabei fand sich in 35 Fällen eine erhöhte Anfärbung (75-100%) der Zellen und in 36 Fällen eine starke Intensität der Färbung. Somit war bei der Multiplikation der Zellfärbung mit der Intensität der Färbung im Rahmen des immunreaktiven Scores der Wert 12 in 26 Fällen vertreten. Es folgte bei 12 Patienten (17,1%) ein Immunreaktiver Score von 6, bei 10 Patienten (14,3%) ein Score von 9 und bei 8 Patienten ein Score von 8. Damit lag bei den meisten Patienten der Immunreaktive Score zwischen 6-12. Allerdings fand sich kein Zusammenhang zwischen dem immunreaktiven Score und der Metastasierung der Leber oder der Überlebensrate.

Da der Chemokinligand CXCL12 bereits auf verschiedenen Geweben detektiert wurde, wie zum Beispiel Lunge, Knochenmark, Leber und Gehirn, war im Rahmen dieser Arbeit interessant, ob sich dieser Chemokinligand auch auf uvealen Melanomen nachweisen lässt.

CXCL12 war in 35,7% der Fälle (n=25) auf dem Probematerial vertreten. Die restlichen 45 untersuchten Materialproben zeigten keinen Nachweis von CXCL12 auf. Auch die Anfärbung der Zellen war eher gering, so dass man in 15 (21,4%) von 25 Fällen nur eine Anfärbung von 1 bis 24% erreichte, in weiteren 7 Fällen (10%) eine Anfärbung der Aderhautmelanomzellen von 25 bis 49%. Die Intensität der Färbung war in 19 Fällen (27,1%) schwach ausgeprägt. Die 45 (64,3%) Probematerialien, die keinen Nachweis aufwiesen, zeigten weder eine Anfärbung der Zellen noch eine Intensität der Färbung. Damit lag auch der immunreaktive Score hauptsächlich bei 0 und war somit am häufigsten vertreten. Auch hier konnten wir keinen Zusammenhang zwischen dem immunreaktiven Score und der Behandlung des Aderhautmelanoms, der Metastasierung der Leber oder der Überlebensrate feststellen.

In bisherigen Studien wurde ebenfalls versucht CXCL12 auf uvealen Zellreihen nachzuweisen. Im Ergebnis war festzustellen, dass auf keiner der untersuchten Zellreihen CXCL12 nachzuweisen war [19].

Da CXCL12 bereits auf der Leber nachgewiesen werden konnte [4], liegt die Vermutung nahe, dass vom uvealen Melanom abgeschilferte Zellen mit Rezeptorausprägung CXCR 4 an deren Oberfläche in die Blutbahn gelangen und dort mit dem Liganden auf den Zellen spezieller Zielorgane, in diesem Fall CXCL12 auf der Leber, einen Komplex bilden, welcher zur Bildung eines Sekundärtumors führt.

Da die Leber den Chemokinrezeptor CXCR4 und den Liganden CXCL12 exprimiert, wäre die Tatsache erklärt warum eine Metastasierung durch ein Aderhautmelanom in die Leber erfolgen kann, jedoch ein Lebertumor mit der Ausprägung des Rezeptors CXCR4 nicht in die Choroidea metastasieren kann.

In einer Studie wurde festgestellt, dass die Blockierung des Rezeptor-Liganden Komplexes CXCR4/CXCL12 das Tumorwachstum einschränkt indem es unabhängig vom VEGF die Angiogenese inhibiert [27, 18].

6.3. Chemokinrezeptor CCR7 und Chemokinligand CCL19

Chemokine binden an ihren Rezeptor hauptsächlich durch den N-loop, während der N-terminus der Liganden vermutlich den Rezeptor aktiviert. So besitzt CCR7 fünf Anhänge auf seiner Oberfläche, von denen vier für die Rezeptoraktivierung notwendig sind, aber alle die aktivierte Form stabilisieren. Die Bindung des Liganden spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle. CCR7 besitzt zwei Liganden, nämlich CCL21 und CCL19, welche vor allem auf lymphatischen Organen exprimiert werden. Beide haben nur eine kleine homologe Sequenz gemeinsam und besitzen eine unterschiedliche Interaktion mit CCR7 um diesen zu aktivieren.

Das maligne Melanom der Haut führt bei 15–36% der Patienten zu Metastasen, welche zum Tode führen. Dies erfolgt vor allem über lymphogene Metastasierung.

Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren das Hautmelanom im Zusammenhang mit Chemokin Rezeptoren genauer betrachtet. Dabei stellten Müller et al. bei ihrer Untersuchung mit B16 Murine Zellreihen fest, dass CCR7 auf diesen Zellen exprimiert wird. Die Melanomzellreihen wurden mit einem retroviralen Vektor versehen, welcher CCR7 DNA enthielt. Diese B16 Zellreihen wurden dann in Mausfüße eingesetzt. Das Ergebnis war eine Metastasierung in die Lymphknoten, welche 58% aller Mäuse nach drei Wochen aufwiesen. Daraufhin versuchte man die Metastasierung zu blocken. Dies gelang mit Anti – CCL21 Antikörpern.

Der Chemokinrezeptor CCR7 wird neben den Leukozyten auch auf dendritischen Zellen, B- und T-Zellen ausgebildet. Eine verstärkte Ausprägung finden wir bei Magenkarzinomen, Brustkrebs, Bronchialkarzinomen, Melanomen, Lymphomen und Leukämien. Dabei liegt die Funktion des Rezeptors in der gerichteten Migration von hämatopoetischen Zellen in die lymphatischen Organe und damit die Koordination der Immunantwort.

Es wurde vermutet, dass CCR7 eine Rolle spielt bei der Wanderung von aktivierten dendritischen Zellen aus der Peripherie zu den Lymphknoten und dort die Metastasierung bewirkt. Dies konnten Wiley et al. in ihrer Studie mit B16 Murine Melanomzellen nachweisen, in welcher es zu einer verstärkten Metastasierung in Lymphknoten bei Überexpression von CCR7 auf den Zellen kam [71].

Müller et al. zeigten, dass auf Melanom Zelllinien der Rezeptor CCR7 exprimiert wird und dass dieser einen starken Anstieg der Metastasierung von Melanomen mit Ausbreitung in die regionalen Lymphknoten verursacht [45].

Bei den in dieser Arbeit 70 untersuchten Patienten konnte der Rezeptor CCR7 bei 69 (98,6%) untersuchten Materialproben nachgewiesen werden. Die Anfärbbarkeit der Zellen war mit 29 von 70 Fällen (41,4%) in der Kategorie Anfärbung der Zellen 50 bis 74 % am höchsten. Dabei zeigte die Intensität der Färbung in 35 Fällen eine mittelstarke Ausprägung. Der immunreaktive Score war in 18 von 70 Fällen (25,7%) mit einem Wert von 6 am stärksten ausgeprägt. Daran schloss sich bei 12 Patienten (17,1%) ein Immunreaktiver Score von 8 an. Es folgte bei 10 Patienten (14,3%) ein Immunreaktiver Score von 9 und bei weiteren 9 Patienten (12,9%) ein Score von 4.

Es konnte kein direkter Zusammenhang gefunden werden zwischen dem immunreaktiven Score und der Metastasierung in die Leber oder dem immunreaktiven Score und der Überlebensrate.

Da das Aderhautmelanom hämatogen metastasiert, stellt sich hier die Frage, ob die Ausprägung des Chemokinrezeptors CCR7 zur Metastasierung führt oder ob sich um eine Coexpression mit dem Chemokinrezeptor CXCR4 handelt, wie sie schon bei Hautmelanomen nachgewiesen wurde oder ob die Ausprägung auf eine Entzündungsreaktion zurückzuführen ist. Jedoch konnte kürzlich in einer Studie von Niederkorn et al., unter Verwendung von uveal Melanomzellreihen mit Ausprägung von CXCR4 und CCR7, eine Migration von Tumorzellen zur Leber gefunden werden.

Der Ligand CCL19 gehört ebenso wie CXCL12 zu den homöostatischen Proteinen. Mit dem Liganden CCL21, welcher ebenfalls ein Ligand für CCR7 ist, agieren sie als Chemoattractants und spielen eine Rolle als Aktivatoren von Leukozyten bei akuten und chronischen Entzündungen des Immunsystems.

In der Uvea lassen sich neben den Aderhautmelanomen auch Aderhautmetastasen nachweisen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Aderhautmetastasen zu 40% bei Patienten mit Mammakarzinom und zu 29% bei Patienten mit Bronchialkarzinom zu finden sind. Bronchial- und Mammakarzinome weisen den Chemokinrezeptor CCR7 auf [45, 53].

Der zum Rezeptor CCR7 zugehörige Ligand CCL19 wurde in 67 von 70 Fällen (95,7%) auf dem Probematerial gefunden. Von dem bearbeiteten Untersuchungsmaterial wiesen 21 von 70 Patienten (30%) eine Anfärbung von 1 bis 24% und weitere 21 von 70 Patienten (30%) eine Anfärbung von 50 bis 74 % auf. Außerdem war auf 14 von 70 Schnitten (20%) eine Anfärbung der Zellen von 25 bis 49% erkennbar. Die Ausprägung der Intensität der Färbung war sich 34 von 70 Fällen (48,5%) eher stark. Im Rahmen des immunreaktiven Scores erhielten wir eine breite Verteilung der Werte,

Auch hier konnte man einen Unterschied zwischen dem immunreaktiven Score und der Metastasierung der Leber bzw. der Überlebensrate erkennen.

Der Chemokinrezeptor CCR7 und sein Ligand CCL19 sind damit erstmalig auf Aderhautmelanomen nachgewiesen worden.

Da auch die Leber den Rezeptor CCR7 und den Liganden CCL19 exprimiert, stellt sich hier die Frage, ob es durch die Ausprägung des Rezeptors CCR7 auf den Aderhautmelanomzellen zur Metastasierung des Aderhautmelanoms in die Leber kommt oder ob wie schon beschrieben CCR7 ausschließlich für die Metastasierung in die Lymphknoten verantwortlich ist und bei der hämatogenen Metastasierung des Aderhautmelanoms in die Leber keine Rolle spielt. Des Weiteren wäre eine Entzündungsreaktion eine mögliche Erklärung für die Ausprägung von CCR7.

Die Ausprägung des Liganden CCL19 auf den Aderhautmelanomzellen könnte erklären, warum Bronchial- und Mammakarzinome, welche den Rezeptor CCR7 aufweisen und lymphogen metastasieren, Aderhautmetastasen verursachen.

6.4. Chemokinrezeptor CKR10 und Chemokinligand CCL27

Der Rezeptor CKR10 wurde bis jetzt auf Melanomen der Haut nachgewiesen [44]. Simonetti et al. [60], zeigten kürzlich in einer Studie, dass der Rezeptor CKR 10 auf malignen und benignen Melanomen ausgeprägt wird. Des Weiteren kann man CKR10 auch auf Melanozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Langerhanszellen und T-Zellen finden [54].

Sein Ligand CCL27 auch CTACK (cutaneous T cell-attracting chemokine) wurde als hautspezifisches Chemokin beschrieben [44, 45], dessen Ausprägung durch inflammatorische Cytokine wie IL-1 und TNF- α) erhöht werden können [33].

Der Rezeptor CKR10 wurde hier bei 69 von 70 Patienten gefunden (98,6%). Die Anfärbung der Aderhautmelanomzellen war jedoch eher schwach, man konnte sie bei 33 Patienten (47,1%) in die Kategorie der Anfärbung der Zellen 1 bis 24% einordnen. Die Intensität der Färbung lag in 41 von 70 Fällen (58,6 %) des untersuchten Tumormaterials im Mittelbereich. Die Verteilung des immunreaktiven Scores zeigte somit eine breite Verteilung. Von den untersuchten Materialien konnte man bei 30% (n=21) einen Immunreaktiven Score von 2, bei 24,3% (n=17) einen Immunreaktiven Score von 6 und bei 14,3% (n=10) einen Immuneaktiven Score von 4 feststellen.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem immunreaktiven Score und der Metastasierung bzw. der Überlebensrate festgestellt werden.

Damit konnte der Chemokinrezeptor CKR10 erstmals auf Aderhautmelanomen nachgewiesen werden. Er wurde bis jetzt in der Literatur als Rezeptor beschrieben, welcher Lymphozyten zur Haut und zu kutanen Entzündungen dirigiert. Da er wie schon erwähnt auf benignen und malignen Melanomen zu

finden ist, stellt sich hier die Frage, ob er überhaupt mit der Metastasierung von Aderhautmelanomen in die Leber in Verbindung gebracht werden kann.

In bisherigen Studien konnte CCL27 auch CTACK genannt in ausgesprochen hoher Ausprägung auf Lymphknoten, Leber, Lunge, Knochenmark und Haut nachgewiesen werden [53]. Morales et al. [44] stellten die Behauptung, dass es sich bei CCL27/CTACK um einen hautspezifisches Chemokin handelt, welches vor allem auf Hautmelanomen ausgeprägt und durch inflammatorische Cytokine IL-1 und TNF- α in seiner Ausprägung verstärkt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig der Ligand CCL27 auf uvealen Melanomen nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine relativ gleichmäßige Verteilung zwischen vorhandener Ausprägung und Nichtausprägung des Liganden auf den Tumorzellen. Bei 39 Patienten (55,7%) konnte der Ligand nachgewiesen werden, bei 31 Patienten (44,3%) war CCL27 nicht vorhanden. Von den 39 untersuchten Tumormaterialien mit vorhandenem Nachweis von CCL27 zeigten 23 Patienten (32,9%) eine Anfärbung der Zellen von 1 bis 24%. Die Intensität der Färbung dieser Patienten zeigte mit 28 von 70 Fällen (40%) eine starke Signifikanz zur mittleren Intensität der Färbung. Ein Zusammenhang zwischen immunreaktivem Score und der Metastasierung der Leber, sowie der Überlebensrate konnte nicht erkannt werden.

Auch bei dem Liganden CCL27, welcher nur relativ gering auf den Aderhautmelanomzellen ausgeprägt wird, ist fraglich, ob dieser bei der Metastasierung in die Leber eine Rolle spielt oder nur aufgrund von inflammatorischen Cytokinen verstärkt exprimiert wurde. Es wäre dabei auch interessant, ob sich dieses Chemokin auch auf gesunden Aderhautzellen oder Aderhautmetastasen nachweisen lässt.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rezeptoren CXCR4, CCR7 und CKR10 auf Aderhautmelanomzellen ausgeprägt werden. Während CXCR4 in der Anfärbung der Zellen sowie in der Intensität der Färbung relativ stark ausgeprägt ist, weist CCR7 eine eher mittlere Anfärbung der Zellen und der Intensität auf. CKR10 zeigt zwar eine geringe Anfärbung der Zellen, aber eine mittlere Intensität der Färbung auf. Wir können damit sagen, dass CXCR4 am häufigsten und stärksten, CCR7 ebenso häufig aber weniger stark und CKR10 ebenso häufig aber am schwächsten auf Aderhautmelanomzellen ausgeprägt wird. Damit scheint das Aderhautmelanom ähnliche Ausprägungen von Chemokinrezeptoren aufzuweisen wie das Hautmelanom.

Die Liganden CXCL12, CCL19 und CCL27 sind mit unterschiedlicher Häufigkeit auf den Zellen vertreten. CXCL12 findet man nur zu ca. 35% auf den Aderhautmelanomen vertreten. Bei den vorhandenen Zellen ist die Ausprägung eher schwach. CCL19 ist sehr häufig auf Melanomen vertreten, während die Anfärbung der Zellen eher um die 50% liegt und die Intensität der Färbung sehr stark in ihrer Ausprägung ist. Der Ligand CCL27 wird nur zu 44% auf den Tumorzellen ausgeprägt. Die Anfärbung liegt dabei im mittleren Bereich.

Im Verlauf dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass die Chemokinrezeptoren sehr viel stärker auf den Aderhautmelanomzellen ausgeprägt sind, als die Chemokinliganden. Setzt man dies in Zusammenhang mit den Forschungserkenntnissen über Metastasierung und Aderhautmelanome, erklärt die Interaktion von CXCR4 und CXCL12 einen möglichen Einfluss auf die hepatische Affinität von Aderhautmelanommetastasen. Fraglich ist hierbei, ob der Rezeptor CCR7 bei der Metastasierung auch eine Rolle spielt.

Eine Signifikanz zwischen den untersuchten Rezeptoren und Liganden und der Metastasierung der Leber und der Überlebensrate konnte nicht nachgewiesen werden.

In verschiedenen Studien hat man bereits versucht die Metastasierung mit Antikörpern zu blocken. Dies gelang beispielsweise bei einer Studie mit B16 Melanomzellreihen. Interessant wäre der Versuch Chemokine an Aderhautmelanomen zu blockieren z.B. mit Anti-CCL12 Antikörpern, um so eventuell eine Metastasierung in die Leber zu vermeiden.

Des Weiteren wäre interessant, ob CCL19 auf Aderhautmetastasen gefunden werden kann und dies in Zusammenhang mit der Ausprägung des Rezeptors CCR7 auf Bronchialkarzinomen bzw. Mammakarzinomen steht.

Wie bereits erwähnt besitzt der Chemokin Rezeptor CCR7 zwei Liganden, CCL19 und CCL21. Im Rahmen dieser Doktorarbeit beschränkten wir uns auf den weniger bekannten Chemokin Liganden CCL19, welcher auf Aderhautmelanomen ausgeprägt wird. Zu ergründen wäre hierbei noch, ob sich der Ligand CCL21 ebenfalls auf den Aderhautmelanomzellen oder Aderhautmetastasen finden lässt.

8 Literaturverzeichnis

1. Baggiolini M, Dewald B, Moser B.
Interleukin-8 and related chemotactic cytokines CXC and CC chemokines.
Adv Immunol 1994; 55:97±179.
2. Baggiolini M., Dewald B, Moser B.
Human chemokines: an update. Annu Rev Immunol 1997;15:675-705.
3. Baggiolini M.
Chemokines and leukocyte traffic. Nature 1998.
4. Bartolome RA, Molina-Ortiz I, Samaniego R et al.
Activation of Vav/rho GTPase signaling by CXCL12 controls membrane-type matrix metalloproteinase-dependent melanoma cell invasion. Cancer Res. 2006; 66: 248-58
5. Bechrakis NE, Scheibenbogen C, Schmittel A, et al.
Choroid melanoma. Adjuvant therapy in high risk patients and new therapy approaches in the metastatic stage. Ophthalmologie 2002; 99(5): 333-7
6. Bechrakis NE, Bornfeld N, Zöller I, Foerster MH
Iodine 125 plaque brachytherapie versus transscleral tumor resection in the treatment of large uveal melanomas
7. Ben-Baruch A.
Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors. Clin Exp Metastasis 2008, 25: 345-356
8. Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, et al.
CXC chemokines in angiogenesis. J. Leukoc. Biol. 2000; 68:1±8.
9. Blaheta HJ, Schitteck B, Breuninger H, et al.
Detection of micrometastasis in sentinel lymph nodes of patients with primary cutaneous melanoma. Recent Results Cancer Res 2001;158:137–46.
10. Bleul CC, Farzan M, Choe H, et al.
The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. Nature 1996; 382: 829-833.
11. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, et al.
The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(5):1925-30.
12. Butcher EC, Williams M, Youngman K, et al.
Lymphocyte trafficking and regional immunity. Adv. Immunol. 1999; 72 : 209±253.

13. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, et al.
Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279: 381±384.
14. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, et al.
Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol.* 1995; 57(5):703-11. Review.
15. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, et al.
Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995 Dec; 270(5243):1811-5.
16. Collins J, Augustin A.
Augenheilkunde, Berlin, Heidelberg 1997
17. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, et al.
Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* 1997;16(23):6996-7007
18. Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, et al.
Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization and metastasis. *FASEB J* 2004;18:1240-2.
19. Di Cesare S, Marshall JC, Fernandes BF, et al.
In vitro characterization and inhibition of the CXCR4/CXCL12 chemokine axis in human uveal melanoma cell lines. *Cancer Cell Int.* 2007 14;7:17.
20. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicoi A, et al.
Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1999 188:373±386
21. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, et al.
HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272:872-877.
22. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, et al.
CCR7 coordinates the primary immature response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99: 23±33.
23. Forster R, Ohi L, Henning G.
Lessons learned from lymphocytes: CC chemokine receptor-7 involved in lymphogenic metastasis of melanoma. *JnatlCancerInst.* 2001; 93(21): 1588-9.

24. Gazitt Y.
Immunologic profiles of effector cells and peripheral blood stem cells mobilized with different Immunologic haematopoietic growth factors
Stem Cells. 2000; 18(6): 390-8. Review
25. Gong J-H, Clark-Lewis I.
Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH₂-terminal residues. J Exp Med 1995;181:631-640.
26. Grehn F.
Augenheilkunde. Berlin, Heidelberg 2003
27. Guleng B, Tateishi K, Ohta M et al.
Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. Cancer Res. 2005; 65:5864-71
28. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, et al.
A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1998; 95: 258±263.
29. Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al.
Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. J. Exp. Med. 1999; 189: 451±460.
30. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, et al.
Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. J Biol Chem. 1998; 273(7): 4282-7.
31. He J, Chen Y, Farzan M, et al.
CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. Nature. 1997; 385(6617): 645-9.
32. Hesselgesser J, Halks-Miller M, DeVecchio V, et al.
CD4-independent association between HIV-1 gp 120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. Curr Biol. 1997; 7 (2):112-21
33. Homey B, Wang W, Soto H et al.
Cutting edge: the orphan chemokine receptor G-protein-coupled receptor 2(GPR-2, CCR10) binds the skin associated chemokine CCL27(CTACK/ALP/ILC). Immunol. 2000; 164: 3465±3470.

34. Horuk R, Chitnis CE ; Darbonne WC, et al.
A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax* : the erythrocyte chemokine receptor. *Science* 1993; 261: 1182-1184.
35. Horuk R.
Chemokine receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001; 4: 313-35.
36. Kanski J.
Klinische Ophthalmologie 2003
37. Lee BC, Lee TH, Avraham S, Avraham HK
Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells. *Mol Cancer Res* 2004; 2(6): 327-38
38. Li H, Alizadeh H, Niederkorn JY
Differential expression of chemokine receptors on uveal melanoma cells and their metastases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49(2):636-43
39. Liotta LA, Kohn EC.
The microenvironment of the tumour–host interface. *Nature* 2001; 411: 3759.
40. Lommatzsch P.
Ophthalmologische Onkologie, Stuttgart 1999
41. Luo C, Pan H, Mines M, et al.
CXCL12 induces tyrosine phosphorylation of cortactin, which plays a role in CXC chemokine receptor 4-mediated extracellular signal-regulated kinase activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 2006; 281(40):30081-93. Epub 2006 Aug 11.
42. Luster AD.
Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N England J Med* 1998, 338: 436-445
43. Luther SA, Cyster JG.
Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nature Immunol* 2001; 2:102±107.
44. Morales J, Homey B, Vicari AP, et al.
CTAK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:14470±14475.
45. Muller A, Homey B, Soto H, et al.
Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50±56.

46. Murakami T, Yamamoto N.
Roles of chemokine receptors in HIV-1 infection. *Int J Hematol.* 2000; 72(4): 412-7. Review.
47. Murphy PM.
The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994;12: 593-633.
48. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al.
Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; 382: 635±638.
49. Nagasawa T.
A chemokine, SDF-1/PBSF, and its receptor, CXC chemokine receptor 4, as mediators of hematopoiesis. *Int J Hematol.* 2000; 72(4):408-11. Review.
50. Nagasawa T.
Role of chemokine SDF-1/PBSF and its receptor CXCR4 in blood vessel development. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 947: 112-5; discussion 115-6.
51. Nakano H, Mori S, Yonekawa H, et al.
A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4. *Blood* 1998; 91:2886–95.
52. Nakano H, Gunn MD.
Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. *J Immunol* 2001;166:361–9.
53. Payne AS, Cornelius LA
The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatology* 2002; 118(6): 915-22
54. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA et al.
CC Chemokine Receptor (CCR)4 and the CCR10 Ligand cutaneous T Cell-attracting Chemokine (CTACK) in Lymphocyte Trafficking to Inflamed Skin. *J Exp Med* 2001; 194:1541-1547.
55. Remmele W, Stegner HE
Vorschlag zur einheitlichen Definition eines immunreaktiven Score (IRS) für den Immunhistochemischen Östrogenrezeptor- Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologie* 1987, 8: 138-140
56. Rossi D, Zlotnik A.
The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:217-42.

57. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A.
The role of chemokine receptors in primary, effector and memory immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:593-620
58. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, et al.
Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor 1alpha. *Am J Pathol.* 1999; 154(4): 1125-35
59. Scala S, Ierano C, Ottaiano A, et al.
CXC chemokine receptor 4 is expressed in uveal malignant melanoma and correlates with epithelioid-mixed cell type. *Cancer Immunol Immunotherapy* 2007; 56(10): 1589-95
60. Simonetti O, Goteri G, Lucarini G, et al.
Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape. *Eur J Cancer.* 2006; 42(8):1181-7. Epub 2006 Apr 27.
61. Sebastiani S, Allavena P, Albanesi C, et al.
Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol* 2001; 166: 996±1002.
62. Springer TA.
Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314.
63. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, et al.
The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270: 27348±27357.
64. Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, et al.
Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 752-762.
65. Strieter RM.
Chemokines: not just leukocyte chemoattractants in the promotion of cancer. *Nat Immunol.* 2001; 2(4):285-6.
66. Suzuki G, Nakata Y, Dan Y, et al.
Loss of SDF-1 receptor expression during positive selection in the thymus. *Int Immunol.* 1998; 10(8):1049-56.
67. Tashiro K. et al.
Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993; 261: 600±603.

68. Wang JM, Deng X, Gong W, et al.
Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J. Immunol. Methods* 1998; 220: 1±17.
69. Ward SG, Westwick J.
Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem* 1998; 333:457±470.
70. Weber M, Ugucioni M, Baggiolini M, et al.
Deletion of the NH₂-terminal residue converts monocyte chemotactic protein 1 from an activator of basophil mediator release to an eosinophil chemoattractant. *J Exp Med* 1996;183:681-685.
71. Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, et al.
Expression of CC Chemokine receptor 7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1638-43
72. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, et al.
Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9233±9237.
73. Zhang C, Cui GH, Liu F, et al.
Inhibitory effect of triptolide on lymph node metastasis in patients with non-Hodgkin lymphoma by regulating SDF-1/CXCR4 axis in vitro. *Acta Pharmacol Sin.* 2006; 27(11):1438-46.
74. Zlotnik A.
Chemokines and Cancer. *Int. J. Cancer* 2006; 119: 2026–2029.
75. Zlotnik A, Yoshie O.
Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12: 121±127.
76. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, et al.
Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and cerebellar development. *Nature.* 1998; 393(6685):595-9

9 Danksagung

Mein Dank geht ganz besonders an Herrn Prof. Bechrakis für die freundliche Überlassung des Themas, die kompetente Führung und die gute Betreuung, sowie sein großes Engagement.

Mein besonderer Dank geht an Frau Karin Oberländer für die Einweisung in die Laborarbeit und die überaus große Hilfsbereitschaft in sehr vielen Bereichen.

Ferner danke ich Frau PD Dr. Sarah Coupland, sowie Frau Protz und allen anderen Mitarbeitern des Pathologielabors für die nette und hilfsbereite Unterstützung, deren kritische und inspirierende Diskussionen mir auf meinem Weg weiterhalfen.

Außerdem danke ich Frau Dr. Andrea Stroux, die mich in die Statistik eingewiesen hat.

Mein herzlicher Dank geht an meine Eltern, die mir stets mit Geduld und Zuspruch zur Seite standen und mich darin bekräftigten weiter an dieser Arbeit festzuhalten.

Zuletzt möchte ich noch meinen Freunden danken, wobei es mir ein Bedürfnis ist diese hier namentlich zu erwähnen. Herrn Johannes Purschwitz und Frau Mandana Lau möchte ich danken für ihr Engagement und Einfühlungsvermögen, Herrn Rolf und Marcel Pomplitz für die starke Unterstützung in Bereichen der Software.

Anmerkung:

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.