

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE BEDEUTUNG DER CHEMOKINREZEPTOREN CCR7 UND CXCR4 SOWIE
DES CCR7-LIGANDEN CCL21 FÜR DIE AUSBREITUNG DES DUKTALEN
ADENOKARZINOMS DES PANKREAS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
SUNNA FRANK
aus Heide

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Sipos

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ungefroren

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2010

Zum Druck genehmigt: 26.03.2010

gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi (Vorsitzender des Promotionsausschusses)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das duktales Pankreaskarzinom	1
1.2. Das Chemokin-/Chemokinrezeptorsystem	3
1.3. Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 und ihre Liganden	4
2. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe	6
3. Zielsetzung der Arbeit	9
4. Material und Methoden	10
4.1. Untersuchungsgut	10
4.2. Verwendete Chemikalien und Substanzen	12
4.3. Immunhistochemie	13
4.4. Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten	15
4.5. Statistische Auswertung	16
5. Ergebnisse	18
5.1. CCR7 wird in humanen Pankreaskarzinomen exprimiert und ist assoziiert mit lymphatischer Ausbreitung	18
5.2. CCL21 ist in tumor-assoziierten Lymphgefäßen hochreguliert	21
5.3. CXCR4 wird in duktales Pankreaskarzinomen exprimiert und zeigt eine Assoziation mit dem klinischen Tumorstadium	24
6. Diskussion	28
7. Zusammenfassung	34
8. Literaturverzeichnis	36
9. Danksagung	44
10. Lebenslauf	45

Abkürzungsverzeichnis

ECM	Extrazelluläre Matrix
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
mRNA	messenger ribonucleic acid
PCR	polymerase chain reaction
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
SDF-1	stromal derived factor 1
TMD	Transmembrandomäne
UICC	Union internationale contre le cancer
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

1.1. Das duktales Pankreaskarzinom

Das duktales Pankreaskarzinom ist einer der aggressivsten Tumoren der Welt. Seine Inzidenz hat sich in den letzten 40 Jahren mehr als verdoppelt. Sie beträgt in Europa heute etwa 8 bis 12/100000/Jahr. Nach dem kolorektalen Karzinom ist es der zweithäufigste Tumor des Gastrointestinaltrakts und stellt in Europa und Nordamerika zudem die fünfthäufigste tumorbedingte Todesursache dar. Ungefähr 5 % aller tumorbedingten Todesfälle werden durch ein Pankreaskarzinom verursacht. Dabei ist die Häufigkeit des duktales Pankreaskarzinoms abhängig von Herkunft und Geschlecht. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind die Patienten durchschnittlich 72 Jahre alt. Als weitere Risikofaktoren für die Entwicklung eines PDACs gelten Nikotinabusus, Diabetes und chronische Pankreatitiden (<http://www.cancer.org>). Während die Erkrankung jedoch bis vor 20 Jahren hauptsächlich Männer betraf, hat sich die Inzidenz inzwischen auf bis zu 1,3:1,0 (m:w) verschoben (Michaud, 2002; Yeo et al, 2002; Lee, 1999).

Für die erkrankten Patienten gibt es bis heute keine zufrieden stellende Therapie, zum einen, weil das Karzinom durch ein ausgeprägtes lokal invasives Wachstum und ein frühzeitiges lymphogenes wie auch hämatogenes Metastasierungspotential charakterisiert ist (Rothenberg et al, 1996; Wanebo und Vezeridis, 1996; Warshaw und Fernandez-Del Costillo, 1992), zum anderen, weil der Tumor durch fehlende Frühsymptome erst spät entdeckt wird. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist die Erkrankung nur bei etwa 20 % der Patienten auf die Bauchspeicheldrüse beschränkt, bei 40 % ist die Tumorerkrankung schon lokal fortgeschritten und weitere 40 % weisen bereits Metastasen auf (Brand, 2001; Brand und Tempero, 1998). Metastasen finden sich primär hauptsächlich in der Leber (66 %) und in regionären Lymphknoten (22 %). Später werden Metastasen in der Lunge, der Nebenniere, im ZNS, in der Haut, in entfernten Lymphknotengruppen und im Knochen diagnostiziert. Bisher fehlen zur Erkennung der Krankheit in einem frühen Stadium geeignete diagnostische Methoden.

Auch effektive Therapieansätze, um die Prognose der Patienten zu verbessern, konnten bis zum heutigen Tage nicht entwickelt werden. Aufgrund der insuffizienten Diagnose- und Therapieansätze sowie der Aggressivität der Erkrankung weist das duktales Pankreaskarzinom eine der höchsten Mortalitätsraten im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen auf. So liegt

die durchschnittliche Fünf-Jahres-Überlebensrate immer noch bei nur 4 bis 5 % (<http://www.cancer.org>; Landis et al, 1999; Rothenberg et al, 1996) und die mediane Überlebenszeit im metastasierten Stadium nur bei fünf Monaten (Hedberg et al, 1998). Die kurative Behandlung des duktales Pankreaskarzinoms besteht in einer radikalen operativen Resektion (Whipple Operation, Linksresektion oder totale Resektion des Pankreas), wobei eine Operation nur in 10 bis 20 % der Fälle durchführbar ist und eine R0-Situation (komplette Tumorfreiheit) davon wiederum in nur 50 % der Fälle erreicht wird. Pankreaskarzinome sind kaum für Radio-Chemotherapie zugänglich, da die Tumorzellen wenig sensibel gegenüber Strahlen und verschiedenen Chemotherapeutika sind. Neuere Studien ergaben jedoch, dass die 10 % der Patienten, die frühzeitig mit Resektion und adjuvanter Chemotherapie behandelt werden, immerhin eine bessere 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 21 % haben (Neoptolemos et al, 2004).

Etwa 80-90 % aller Pankreaskarzinome leiten sich vom exokrinen Anteil des Pankreas ab und weisen einen duktales Phänotyp auf. In 70 % der Fälle ist der Tumor im Pankreaskopf lokalisiert (Klöppel et al, 2000). Morphologisch zeichnet sich das duktales Pankreaskarzinom durch Ausbildung von Drüsenlumina, Muzinproduktion und eine ausgeprägte desmoplastische Stromareaktion aus.

Aufgrund des hohen Metastasierungspotentials des Tumors in regionäre Lymphknoten wurden Untersuchungen zur intratumoralen Lymphgefäßdichte durchgeführt. Hier stellte sich heraus, dass, anders als bei anderen Tumoren, keine erhöhte Lymphgefäßdichte intratumoral vorliegt, sondern, im Gegenteil, eher eine geringere Anzahl. Somit konnte kein Zusammenhang zwischen Lymphgefäßdichte und lymphogener Progression gefunden werden (Sipos et al, 2005). Es muss folglich andere Wege geben, die dem Tumor erlauben, Anschluss an das Lymphgefäßsystem zu erhalten. Diese Mechanismen sind bis heute weitgehend ungeklärt.

Vor mehr als 100 Jahren stellte Paget die Hypothese vom „seed and soil“ auf. Aus seiner Erfahrung mit Brustkrebspatientinnen ergab sich seine Vermutung, dass Karzinome bevorzugt in Organe oder Regionen metastasieren, die das Wachstum von Krebszellen unterstützen bzw. nähren (Paget, 1889). James Ewing entgegnete später, dass der Blutstrom vom Primärtumor weg vollständig das Metastasierungsmuster von Tumoren erklären würde. Seine „mechanische“ Hypothese besagt, dass die meisten Metastasen im ersten „drainierenden“

Organ entstehen (Reynolds, 1998). Keines dieser zwei Modelle kann als absolut korrekt angesehen werden, da Ausnahmen zu beiden in Form von klinischen Beispielen existieren.

Wegen dieser Unzulänglichkeiten wird bis heute weiter nach Mechanismen gesucht, die die bevorzugte Metastasierung von Tumoren in bestimmte Organe erklären würden. Unter anderem formte sich die Hypothese, dass Tumorzellen Systeme missbrauchen könnten, die normalerweise von Immunzellen benutzt werden, um den Weg zum Lymphknoten und zu Orten der Entzündung zu finden. Diese Prozesse laufen sehr selektiv ab, so dass zum Beispiel nur bestimmte Zellen die Blutbahn verlassen können, um ins Gewebe zu gelangen. Man entdeckte das Chemokin-/Chemokinrezeptor-System, das eine wichtige Rolle in der zielgerichteten Bewegung von Lymphozyten, dendritischen Zellen und Granulozyten spielt (Cyster, 1999). Die Vermutung wurde wach, dass Tumorzellen eben diesen Mechanismus ausnutzen könnten, um Anschluss ans Lymphgefäßsystem zu erlangen.

1.2. Das Chemokin-/Chemokinrezeptor-System

Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die Signale von der Zelloberfläche ins Zellinnere übertragen. Sie werden auf verschiedensten Zelltypen exprimiert. Hauptsächlich findet man sie auf hämatopoetischen Zellen, jedoch auch auf Endothel- und Epithelzellen sowie auf Neuronen (Olson und Ley, 2002; Rossi und Zlotnik, 2000).

Aufgrund der Struktur ihrer Liganden, der Chemokine, werden Chemokinrezeptoren in vier Gruppen, die C-, CC-, CXC- und CX3C-Rezeptoren, eingeteilt. Sie werden benannt nach der Anordnung der ersten beiden von vier charakteristischen Cysteinresten, die durch Ausbildung von zwei Disulfidbrücken für ihre tertiäre Struktur verantwortlich sind. Chemokinrezeptoren besitzen wie alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sieben Transmembrandomänen (TMD) mit helikaler Anordnung der Aminosäuren, einen extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus) und einen intrazellulären Carboxyterminus (C-Terminus) (**Abb. 1**). Spezifisch für die Chemokinrezeptoren ist die hochkonservierte Disulfidbrücke zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife und ein DRY-Motiv (Asp-Arg-Tyr) auf der zytoplasmatischen Seite der dritten TMD (Murphy, 1994).

Die Chemokinrezeptoren können affinitätsspezifisch verschiedene Chemokine binden und erfüllen zahlreiche Aufgaben in der Immunregulation. Sie steuern die Migration immunkompetenter Zellen sowie die Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe. Außerdem sind sie an der Regulierung der Tumor-Angiogenese beteiligt (Rossi und Zlotnik, 2000) und wirken als Wachstumsfaktorrezeptoren. Des Weiteren spielen zum Beispiel bei der Infektion von T-Zellen und Makrophagen mit dem human immunodeficiency virus (HIV) die Rezeptoren CCR5 und CXCR4 neben dem CD4-Molekül eine Rolle als notwendige Korezeptoren (Deng et al, 1996; Dragic et al, 1996).

Der Weg einer dendritischen Zelle wird wesentlich vom Chemokin-/Chemokinrezeptorsystem gesteuert. So exprimieren Lymphendothelzellen sowie Sinuswandzellen im Lymphknoten in hohem Maße Chemokine, wie zum Beispiel CCL21, während in dendritischen Zellen der zugehörige Rezeptor CCR7 im Falle einer Aktivierung hochreguliert wird (Martin-Fontecha et al, 2003; Hirao et al, 2000). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Chemokinrezeptoren auch in vielen malignen Tumoren vermehrt exprimiert werden, so z. B. auf Melanomzellen, Hodgkinzellen und Mammakarzinomzellen (Mori et al 2005; Höpken et al, 2002; Müller et al, 2001).

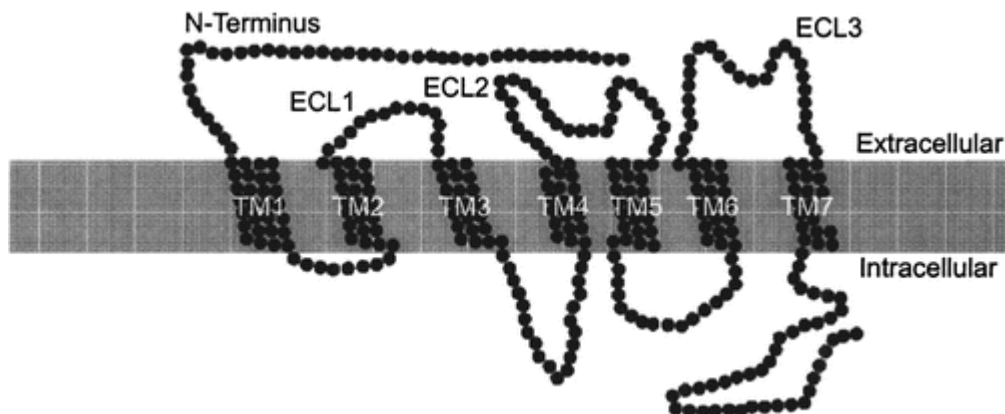


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Chemokinrezeptors mit 7 Transmembrandomänen. Zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife befinden sich die hochkonservierten Disulfidbrücken (Fernandez et Lolis, 2002).

1.3. Die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 und ihre Liganden

Bei der Arbeit für diese Dissertation lag die Konzentration auf zwei der bis heute über 20 bekannten Chemokine und ihren Rezeptoren, CXCR4 und CCR7. Beide Rezeptoren gehören

in die Gruppe der Chemokine, die für das sogenannte „homing“ von Lymphozyten zuständig sind.

Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird auf Leukozyten exprimiert, man findet jedoch auch in verschiedenen Geweben, wie zum Beispiel im Herzen, in der Leber, im Darm oder im Gehirn eine hohe Transkriptionsaktivität. Das Gen für CXCR4 wurde auf Chromosom 2q in der Nähe von Genorten weiterer CXC-Rezeptoren gefunden (Federspiel et al, 1993). Der Ligand von CXCR4 ist SDF-1 (stromal derived factor 1). Effekte einer Aktivierung des Rezeptors sind zum Beispiel die Beeinflussung der Transkription von Genen, die auf die Migration Einfluss nehmen (Busillo et al, 2007; Chinni et al, 2006). Auf diese Weise kann auch die Überlebensfähigkeit und das Wachstum der Zelle beeinflusst werden (Barbieri et al, 2006; Barbero et al, 2003).

Wie auch CCR7 ist der Rezeptor auf zahlreichen verschiedenen Tumorzellen detektiert worden und es sind Zusammenhänge mit dem Metastasierungspotential des jeweiligen Tumors gefunden worden. So exprimieren z.B. Mammakarzinomzellen in erhöhtem Maße den Chemokinrezeptor CXCR4, während sein einziger Ligand SDF-1 in den Organen der bevorzugten Metastasierung dieses Tumors gefunden wird (Müller et al, 2001). Diese Entdeckung hat dazu geführt, dass bis heute in zahlreichen in vitro, in vivo und vereinzelt bereits auch in klinischen Studien CXCR4-Inhibitoren eingesetzt werden, um ihre Wirkung auf das Metastasierungspotential und das Wachstum an sich von Tumoren zu überprüfen. So konnte zum Beispiel durch Einsatz von AMD3100 oder Peptiden wie T22 das Metastasierungspotential von Ovarialkarzinomzellen (AMD3100) (Kajiyama et al, 2008) und Melanomzellen (T22) (Murakami et al, 2002) gesenkt werden. Mit TN14003 konnte in einem orthotopischen Modell eines HNO-Tumors sowohl das Wachstum des Primärtumors durch Störung der Tumorangiogenese und das Ausbilden von Lungenmetastasen gehemmt werden (Yoon et al, 2007).

Der Chemokinrezeptor CCR7 wird ebenfalls hauptsächlich auf Leukozyten exprimiert. Wie auch bei CXCR4 besteht seine Aufgabe vor allem im homing, das heißt, die gerichtete Migration hämatopoetischer Zellen in lymphatische Organe zu steuern. Er ist damit wesentlich an der Koordination der Entwicklung der adaptiven Immunantwort beteiligt.

Verschiedene Leukozyten-Populationen benötigen die Hilfe von CCR7, um über die Blut- und Lymphbahn in lymphatische Organe einwandern zu können. Damit T-Zellen und dendritische Zellen im lymphatischen Gewebe mit anderen Leukozyten interagieren können, werden sie über CCR7 in der T-Zellzone (periphere Lymphknoten und Peyersche Plaques) oder in der periarteriellen lymphatischen Scheide (PALS) der Milz positioniert (Breitfeld et al, 2000; Förster et al, 1999; Sallusto et al, 1999a; Sallusto et al, 1999b).

In verschiedenen Tumoren wird CCR7 stark hochreguliert, so z.B. auf Melanomzellen (Müller et al, 2001), Magenkarzinomzellen (Mashino et al, 2002), Brustkrebszellen (Müller et al, 2001), Hodgkinzellen (Höpken et al, 2002) und Lymphomzellen (z.B. auf Tumorzellen der chronisch lymphatischen Leukämie) (Till et al, 2002). Er bindet die Chemokine CCL19 oder CCL21 mit gleicher Affinität und kann nach Ligandenbindung die Kinasen FAK, ERK, PKB und JAK 2 in verschiedenen Zelllinien aktivieren (Stein et al, 2002; Adachi et al, 2001; Tilton et al, 2000; Sullivan et al, 1999; Yoshida et al, 1998).

2. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe

Grundlage dieser Arbeit ist die Untersuchung der Expression von Chemokinrezeptoren im duktalem Pankreaskarzinom. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurden 12 Pankreaskarzinom-Zelllinien mittels PCR in Hinblick auf die Expression von Chemokinrezeptoren untersucht. Die PCR-Analysen ergaben, dass in Pankreaskarzinom-Zelllinien die mRNA zahlreicher Chemokinrezeptoren in verschiedenem Maß exprimiert wird (**Abb. 2**). Fast alle Zelllinien zeigten eine hohe Expression der Rezeptoren CXCR4, CXCR5, CCR6 und CCR7. Aus diesem Grund konzentrierten wir uns in den folgenden Untersuchungen auf diese Rezeptoren und im Speziellen auf CXCR4 und CCR7.

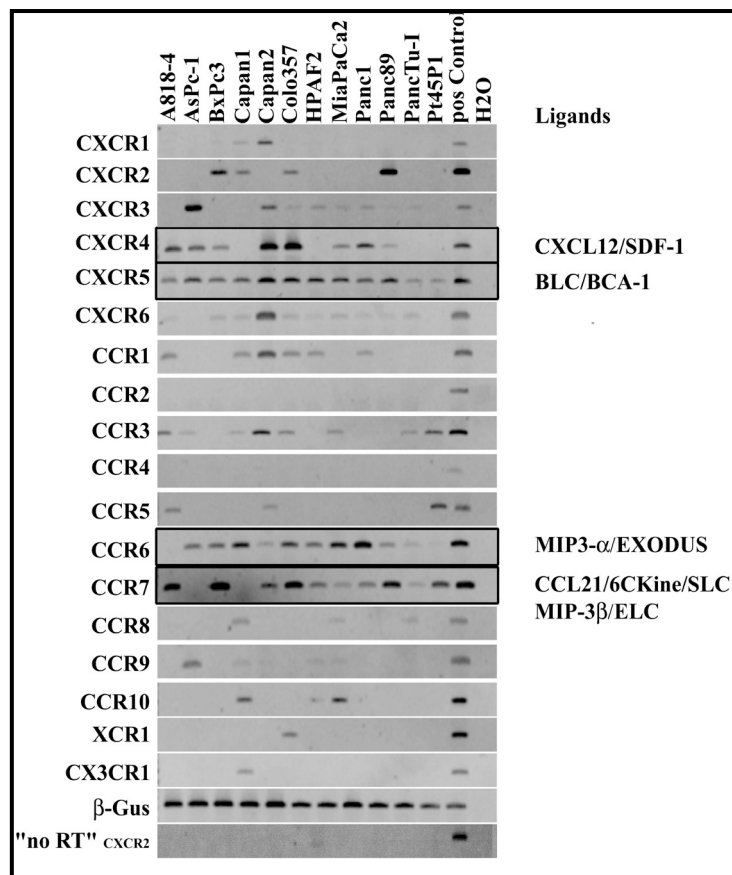


Abb. 2: Die Abbildung zeigt die PCR-Analyse von 12 Pankreaskarzinom-Zelllinien. In fast allen Zelllinien findet sich eine Expression von CXCR4, CXCR5, CCR6 und CCR7.

FACS-Analysen deckten auf, dass nur geringe Mengen von CCR7 auf der Oberfläche von PDAC-Zelllinien exprimiert werden, wenn diese als anhaftende Monolayer-Kulturen gezüchtet wurden. Wenn die Zelllinien jedoch als dreidimensionale Sphäroide auf Agar-Platten kultiviert wurden, erfolgte in 7 von 11 Zelllinien eine signifikante Hochregulation von CCR7 auf der Zelloberfläche (Grenzwert: 20% positive Zellen) (**Abb. 3 und 4**).

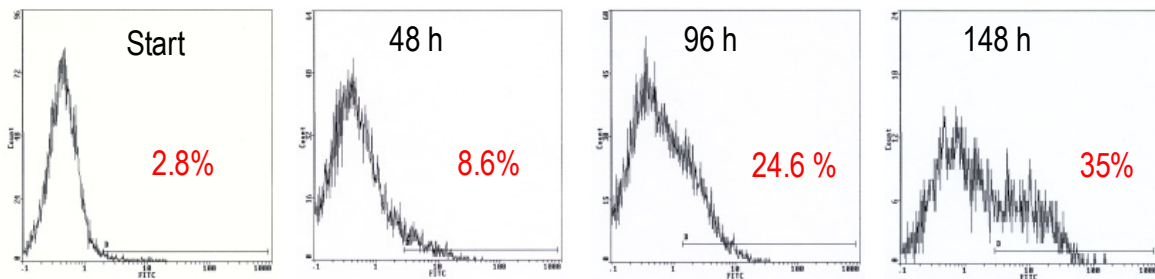


Abb. 3: CCR7-Hochregulation in der Pankreaskarzinom-Zelllinie Colo357 in der Sphäroid-Kultur.

Vergleich Monolayer/Sphäroid-Kultur CCR 7

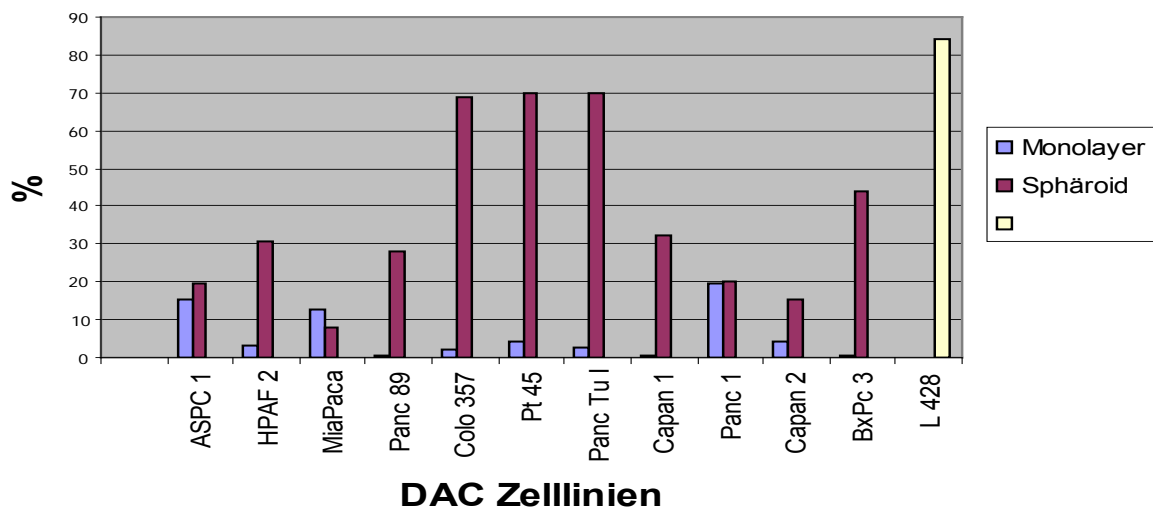


Abb. 4: Vergleich zwischen der CCR7-Expression in Pankreaskarzinom-Zelllinien bei Anzuchtung als Monolayer und als Sphäroid-Kultur.

3. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Dissertation ist die Beantwortung folgender Fragen zur Expression von Chemokinrezeptoren im duktalem Pankreaskarzinom.

1. Können die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 in PDACs immunhistochemisch nachgewiesen werden?
2. Korreliert die Expression von CCR7 und CXCR4 mit Tumoreigenschaften wie lymphatischer Metastasierung bzw. Progression der PDACs?
3. In welchen Zellen wird der Ligand von CCR7 im normalen und im erkrankten Pankreas exprimiert?

4. Material und Methoden

4.1. Untersuchungsgut

Es wurde formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe von insgesamt 126 Patienten mit duktalem Pankreaskarzinom aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des UKSH und vom Universitätsklinikum Heidelberg ausgewertet. Für die Analyse der CXCR4-Expression wurden nur 96 Fälle genutzt, die am Institut für Pathologie des UKSH zur Verfügung standen. Bei den Untersuchungen zu CCR7 wurden zusätzlich 10 Fälle aus Kiel mit massiver Lymphgefäßinvasion sowie 20 nodal-negative Fälle aus Heidelberg einbezogen.

Zwei oder drei Paraffinblöcke sowie, soweit vorhanden, Lymphknotenmetastasen wurden mithilfe eines Zeiss PrimoStar mikroskopisch untersucht. Da in den meisten Fällen eine ausgedehnte Lymphadenektomie stattgefunden hatte, betrug die Anzahl untersuchter Lymphknoten durchschnittlich 22 (Standardabweichung 10, Spanne von 3-45). Das Vorhandensein einer Lymphgefäßinvasion wurde anhand einer immunhistochemischen Färbung mit einem anti-Podoplanin-Antikörper überprüft.

Tabelle 1 fasst die wichtigsten klinisch-pathologischen Daten der Patienten zusammen. Eine Log-rank Analyse dieser Serie deckte signifikante Unterschiede zwischen der Überlebenszeit von Patienten verschiedener UICC-Stadien, Lymphknoten-positiven und Lymphknoten-negativen Fällen, sowie zwischen gut- bis mäßig und schlecht differenzierten Tumoren auf, was darauf hinweist, dass unsere Serie ein repräsentatives Kollektiv von Pankreaskarzinomen darstellt (Neoptolemos et al, 2004; Sohn et al, 2000). Als Kontrollgewebe wurden 10 formalinfixierte, paraffin-eingebettete normale Pankreata ohne histologische Auffälligkeiten genutzt, die aufgrund von Erkrankungen anderer Organe (z.B. Kolon-, Magen-, Gallengangskarzinome) reseziert worden waren.

Tab. 1. Patienten- und Tumordaten CCR7 (n=126) / CXCR4 (n=96)

Alter (Median, Jahre)		63.36 (SD 9.46, range 39-85)
Geschlecht	männlich:	58 / 44
	weiblich:	68 / 52
T-Stadium ^a	T1:	1 / 1
	T2:	4 / 4
	T3:	99 / 69
	T4:	20 / 19
N-Stadium ^a	N0:	50 / 30
	N1:	76 / 66
Lymphgefäßinvasion	L0:	74 / 54
	L1low ^b :	31 / 30
	L1high ^b :	16 / 7
Resektionsstatus ^a	R0:	77 / 62
	R1:	39 / 26
	R2:	2 / 2
	Rx:	8 / 6
UICC Stadium ^a	Stadium I:	2 / 2
	Stadium II:	43 / 23
	Stadium III:	58 / 49
	Stadium IVa:	18 / 18
	Stadium IVb:	3 / 2
Grad ^c	Grad 1:	15 / 13
	Grad 2:	68 / 54
	Grad 3:	43 / 29
Überleben		
CCR7 (Median, Monate, n= 112 ^e)	lebt (n=32):	17,5 ^d (SD 14,38, range 2-48)
	gestorben (n=67):	11 ^d (SD 12,86, range 4-68)
	postoperativer Tod ^f (n=13)	2 ^d (SD 0,87, range 0-3)
CXCR4 (Median, Monate, n= 89 ^e)	lebt (n=18)	20 ^d (SD 15,28, range 3-48)
	gestorben (n=61)	11 ^d (SD 13,28, range 4-68)
	postoperativer Tod ^f (n=10)	1,5 ^d (SD 0,97, range 0-3)

^a UICC TNM Klassifikation 1997, ^b L1low: bis 2 Lymphgefäße, L1high 3 oder mehr Lymphgefäße beinhalten Tumorzellen, ^c WHO Klassifikation, ^d Median, ^e zu 14, bzw. 7 Patienten lagen keine Überlebensdaten vor, ^f Tod innerhalb von 3 Monaten nach dem operativen Eingriff

4.2. Verwendete Chemikalien, Substanzen und Puffer

Anti-Goat Alexa Fluor 546, Molecular Probes

Anti-Mouse Alexa Fluor 488, Molecular Probes

Avidin/Biotin Blocking Kit von Vector Lab, SP-2001

BSA von Serva, 11926

CCR7-Antikörper (rabbit polyclonal) von abcam, ab 12953

CXCR4-Antikörper (rabbit polyclonal) von Acris, SP 4006 P

EDTA (Titriplex) von Merck, 1.08418.1000

Ethanol von Roth, K928.1

Glycin von Roth, 3908.2

Hämalaun von Merck, 1.09249.0500

Methanol von J.T.Baker, 8045

Milchpulver von ROTH, T-145.1

Monoklonaler Anti-Podoplanin-Antikörper von Signet Laboratories, D2-40

Natrium-Borohydrid von Sigma, S-9125

Natriumchlorid von J.T. Baker, 0278

Objektträger von Menzel-Gläser Super Frost^R Plus, J1800AMNZ

PBS von Biochrom AG, L182-10

Peroxidase-Substratkit von Vector Lab, SK-4100

Pertex von Medite, PER 40000

Polyklonaler anti-CCL21-Antikörper (Ziege) von R&D Systems, AF366

ProLong anti-fade mounting Medium mit DAPI von Molecular Probes, P36931

Roti-Immunoblock von Roth, T144.1

Sudanschwarz B von Roth, 0292.1

TBS, Roti^R-Stock 10x TBS von Roth, 1060.1

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat von Merck, 1.06448.0500

TRIZMA-Base (TRIS) von Sigma, T1503

TRIZMA-HCl (TRIS) von Sigma, T3253

Tween20 von Roth, 9127.1

Vectastain rabbit IgG-ABC-Elite-Kit von Vector Lab, PK-6101

Wasserstoffperoxid 30%, Perhydrol von Merck, 1.07210.0250

Xylol von Roth, 9713.1

TRIS-Puffer:

9 g TRIS

68,5 g TRIS-HCl

87,8 g NaCl

ad 10 l aqua dest.

TEC-Stammlösung 10-fach:

2,5 g TRIS-Base

5 g EDTA (Titriplex)

3,2 g Tri-Natrium Citrate

ad 1 l aqua dest. PH 7,8 einstellen mit NaOH oder Citrate

4.3. Immunhistochemie

Pankreaskarzinomschnitte wurden für die Färbung mit den Antikörpern gegen CXCR4 und CCR7 wie folgt behandelt:

3-5 µm dicke Paraffinschnitte wurden auf Objektträger (Menzel-Gläser Super Frost^R Plus) aufgebracht und über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C getrocknet. Danach wurden sie zur Entparaffinierung zunächst für 2 x 15 Minuten in Xylol verbracht. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe (100 % EtOH - 96 % EtOH - 70 % EtOH - aqua dest).

Die Objektträger wurden daraufhin im Dampfkochtopf für 3 Minuten in TEC-Puffer (pH 7,8) behandelt. Hierfür wurde der Puffer zunächst zum Kochen gebracht, die Schnitte wurden hinzugefügt und der Topf vom Herd genommen. Nach 3 Minuten folgte eine aufsteigende Alkoholreihe von destilliertem Wasser bis zu 2 prozentigem MetOH/H₂O₂. Hier verblieben die Schnitte zum Peroxidase-Blocking für 15 Minuten. Danach wurde wiederum eine absteigende Alkoholreihe von 96 %igem EtOH bis zum destillierten Wasser durchgeführt. Es folgten 2 kurze Waschschrte mit TRIS-Puffer.

Mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit von Vector Lab (SP-2001) wurden die Schnitte für jeweils 15 Minuten inkubiert. Nach jedem Blocken folgten 2 Waschschrte mit TRIS-Puffer und die Objektträger wurden geputzt.

Im nächsten Schritt wurde mit 4 % Milchpulver (ROTH, T-145.1) mit Normalserum (Ziege) (15 µl/ml) (Vectastain rabbit IgG-ABC-Elite-Kit, PK-6101, Vector Lab) für 20 Minuten geblockt. Die Schnitte wurden abgeklopft und geputzt und nachfolgend mit dem jeweiligen Primärantikörper in 2 % Milchpulver inkubiert. Der Antikörper gegen CXCR4 (SP 4006 P, Acris, rabbit polyclonal) wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet und für 45 Minuten inkubiert, der Antikörper gegen CCR7 (ab 12953, abcam, rabbit polyclonal) in einer Konzentration von 10 µg/ml. Hier wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Positivkontrollen dienten Schnitte von Lymphknoten (CCR7) und Colonkarzinomen (CXCR4). Nach der Inkubation wurden die Schnitte 2 x gewaschen und geputzt.

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Vectastain Kit) erfolgte in 2 % Milchpulver in einer Verdünnung von 5 µl Sekundärantikörper je ml für 30 Minuten. Es folgten wiederum 2 Waschschrte und das Putzen der Objektträger. Gleichzeitig mit dem Sekundärantikörper wurde der Avidin/Biotin-Komplex (Vectastain Kit) angesetzt und für 30 Minuten stehen gelassen. Es wurde hierfür 2 % Milchpulver (10 µl/ml) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte hier für 30 Minuten.

Nach 2 weiteren Waschschrten und dem Putzen der Objektträger wurden die Schnitte mit DAB für 7 Minuten inkubiert (Peroxidase-Substratkit, Vector Lab, SK-4100). Die Konzentration betrug hier je 20 µl/ml von Puffer, DAB und Hydrogen-Peroxidase in destilliertem Wasser. Es folgte ein Waschschrte mit destilliertem Wasser.

Für die Kerngegenfärbung wurde Hämalaun (Merck, Best-Nr. 1.09249.0500) 1:4 verdünnt und die Schnitte darin für 2-5 Minuten inkubiert. Unter fließend heißem Leitungswasser wurde gebläut und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen.

Abschließend folgte noch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol. Eingedeckt wurde mit Pertex.

Ausgewertet wurden die Schnitte an einem Zeiss PrimoStar, indem die Expression von CCR7 und CXCR4 in den Tumorzellen prozentual beurteilt wurde (keine, wenig <10%, mäßig 11-50%, stark >50%).

4.4. Immunfluoreszenzfärbung an Paraffinschnitten

Gewebeschnitte von 10 normalen Pankreata, 13 Fällen von chronischer Pankreatitis und 22 PDACs wurden zunächst entparaffiniert und danach im Dampfdruckkochtopf mit TEC-Puffer demaskiert. Nach 2 x 5-minütigem Waschen mit PBS wurden sie für 30 Minuten in 1% Natrium-Borohydrid in PBS inkubiert, um die Autofluoreszenz zu reduzieren.

Nach erneutem Waschen (4 x in PBS) wurden sie zunächst 2 Minuten in 20 % Ethanol, danach 2 Minuten in 70 % Ethanol und dann für 10 Minuten mit 1% Sudanschwarz B (Sigma, Taufkirchen) in 70 % Ethanol gefärbt. Daran anschließend erfolgte eine Klärung mit 70 % Ethanol, bis keine Farbwolken mehr abgingen. Noch einmal 2 Minuten in 20 % Ethanol, dann 2 x 5 Minuten in TBS waschen.

Unspezifische Bindestellen wurden mit Blockierungs-Puffer mit 0,1% BSA und 0,2% Glycin in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend erfolgte noch eine Inkubation mit Roti-Immunoblock (Verdünnung 1:10) in TBS für 30-60 Minuten.

Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte über Nacht in TBS. Folgende Primärantikörper-Verdünnungen wurden verwendet: monoklonaler anti-Podoplanin Antikörper (10µg/ml, D2-40, Signet Laboratories, Dedham, MA, USA) und polyklonaler anti-CCL21-Antikörper (Ziege) (10µg/ml, AF366, R&D Systems).

Nach gründlichem Waschen mit TBS-T (TBS-0,1% Tween20) für 2 x 5 Minuten und in TBS 3 x 10 Minuten wurden die Sekundärantikörper für 1h bei 37°C inkubiert (anti-goat Alexa Fluor 546 1:1000, anti-mouse Alexa Fluor 488 1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Hiernach erfolgte ein erneuter Waschschriff wie nach der Primärantikörper-Inkubation.

Die Schnitte wurden mit ProLong anti-fade mounting Medium mit DAPI (Molecular Probes) aufgezogen. Fotos wurden mit einem Zeiss Axioplan 2 Imaging Fluoreszenz Mikroskop (Carl Zeiss Jena, Jena, mit einer CCD-Kamera) mit Hilfe der VisiView Software 1.3 (Visitron Systems, Puchheim) angefertigt.

Auf jedem Schnitt wurden 9 bis 13 (Vergrößerung x 200) Bereiche, die eine hohe Anzahl von Podoplanin-positiven Lymphgefäßen aufwiesen (sog. „hot spots“) auf eine CCL21-

Expression in den lymphatischen Endothelzellen untersucht. Die Aufnahmen von roten (CCL21) und grünen (Lymphgefäße) Farbkanälen wurden einzeln und überlagert betrachtet, um Artefakte (z.B. Autofluoreszenz) und CCL21-Expression in nicht-endothelialen Zellen (z.B. in Makrophagen) aus der Quantifizierung auszuschließen. Dann wurde das Verhältnis zwischen der Fläche der roten und grünen Signale geschätzt und wurde prozentual festgehalten. Insgesamt wurden 467 Fotos analysiert (90 von normalen Pankreata, 236 von PDACs und 141 von chronischen Pankreatitiden), die 2951 Lymphgefäße beinhalteten.

Als Kontrolle für diese semiquantitative Methode wurden 30 Fotografien mit der Scion Image Software version beta 3b (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) quantitativ analysiert. Grüne und rote Signale wurden separat ausgewertet, indem eine Trennung per „look up table“ erfolgte.

Bevor die positiven Areale ausgewählt wurden, wurde die Hintergrund-Autofluoreszenz manuell eliminiert (z.B. von Erythrozyten und Kollagen). Die Software berechnete die Oberfläche der roten und grünen Bereiche und das Ergebnis wurde in Pixeln festgehalten. Die Beziehung zwischen den roten und grünen Signalen wurde mit Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corp. Seattle, WA, USA) in Prozent ausgedrückt. In den wenigen Fällen, wo die Fläche der roten Signale (CCL21) größer als diejenige der grünen Signale war, wurde der Wert auf 100% festgelegt.

4.5. Statistische Auswertung

Zur Beurteilung der Chemokinrezeptorexpression in den Karzinomen erfolgte eine Gradeinteilung von 0-3. Hierbei war der Prozentsatz der Zellen ausschlaggebend, der auf den Schnittpräparaten angefärbt wurde. Eine fehlende Expression ohne Anfärbung von Karzinomzellen wurde mit 0 bewertet. Die Anfärbung von bis zu 10 % aller Zellen wurde mit 1 bewertet, waren 11-50 % der Zellen angefärbt, vergaben wir den Grad 2 und bei mehr als 50 % den Grad 3.

Eingeteilt wurden die Karzinome nach dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen in N0 und N1. Außerdem erfolgte eine Unterscheidung zwischen Tumoren mit und ohne Lymphgefäßinvasion. Das pathologische sowie das klinische Stadium (pT1-pT4, bzw. cT1-

cT4) wurde ebenfalls bei der Auswertung berücksichtigt. Die Unterscheidung zwischen beiden wurde gemacht, da in einigen Fällen klinisch bereits eine Tumordinfiltration der Mesenterialwurzel/großer Gefäße bestand, die dem Pathologen nicht bekannt war und so zur Vergabe eines abweichenden Tumorstadiums führte.

Für das UICC-Stadium wurde die Einteilung von 1997 benutzt. Stadium I entsprechen T1 oder T2-Karzinome ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Stadium II beinhaltet T3-Karzinome ohne Metastasen, Stadium III T1, T2 oder T3 mit Lymphknotenmetastasen, aber ohne Fernmetastasen. Als Stadium IVa wurden T4-Karzinome mit oder ohne Lymphknotenmetastasen, jedoch auf jeden Fall ohne Fernmetastasen eingruppiert. Stadium IVb entspricht Karzinomen jedes T-Stadiums mit Fernmetastasen.

Die Auswertung erfolgte verblindet. Der Auswerter kannte nicht die Stadien und den Lymphknotenstatus der verschiedenen Fälle.

Nach der Beurteilung aller Schnittpräparate wurde der Zusammenhang zwischen der CCR7-, bzw. CXCR4-Expression und den klinisch-pathologischen Daten mit Hilfe des Chi²-Tests auf Signifikanz getestet.

Die CCL21-Expression in den verschiedenen Entitäten wurde anhand des Mann-Whitney-U-Tests und des Kruskal-Wallis H Tests analysiert.

Eine Auswertung bezüglich der Überlebenszeiten wurde mit einer Kaplan-Meyer-Kurve erstellt, indem ein log-rank Test durchgeführt wurde.

Als signifikant wurden Ergebnisse angesehen, die einen p-Wert <0,05 hatten. Im Falle multipler Vergleiche wurde der p-Wert nach Bonferroni modifiziert. Alle statistischen Tests wurden mit SPSS 10.1 Software (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1. CCR7 wird in humanen Pankreaskarzinomen exprimiert und ist assoziiert mit lymphatischer Ausbreitung

Immunhistochemisch wurde CCR7 hauptsächlich in Tumorzellen exprimiert (**Abb. 5**). Weiterhin stellten sich einige mononukleäre Entzündungszellen mit viel Zytoplasma sowie ein Teil der Lymphozyten positiv dar. Lymphknoten mit reaktiven Veränderungen dienten als Positivkontrolle. Sie zeigten unregelmäßig verteilt CCR7-positive Zellen in der T-Zell-Zone (**Abb. 6**). Die Verteilung dieser Zellen entsprach der von aktivierten T-Lymphozyten und dendritischen Zellen, die bekanntermaßen CCR7-positiv sind. In manchen Schnitten färbten sich im peritumoralem Gewebe teilweise Inselzellen an. Epithelzellen von normalen Gängen wurden nicht angefärbt.

15% (19/126) der PDACs wiesen eine starke CCR7-Expression auf, 31% (39/126) eine mäßige und 37% (46/126) eine geringe. In 17% (22/126) der Fälle konnte CCR7 in den Tumorzellen nicht nachgewiesen werden.

Um eventuell vorliegende Zusammenhänge zwischen der CCR7-Expression im Tumor und seiner lymphatischen Ausbreitung finden zu können, wurden die Karzinome dichotom aufgeteilt in eine **nicht- oder wenig**-exprimierende und eine **mäßig- oder stark**-exprimierende Gruppe (**Tab. 2a**). Die Auswertung ergab, dass Karzinome, die CCR7 in mäßigem oder starkem Ausmaß exprimieren, Lymphgefäße signifikant häufiger infiltrieren als Karzinome, die nur wenig oder sogar gar kein CCR7 exprimieren (Chi²-Test, p=0,005). In ähnlicher Weise exprimierte eine signifikant größere Anzahl von PDACs **mit** Lymphknotenmetastasen mäßig bis stark CCR7 als Fälle **ohne** Lymphknotenmetastasen. Dieser Zusammenhang war allerdings nur grenzwertig signifikant (Chi²-Test, p=0,037).

Zusätzlich interessierte uns, ob bei **vollständig fehlender** CCR7-Expression in Karzinomen die Fähigkeit, Anschluss an das Lymphgefäßsystem zu erlangen, verloren geht. Für diese Untersuchung verglichen wir das Vorhandensein von Lymphgefäßinvasion einerseits und das Auftreten von Lymphknotenmetastasen andererseits in Karzinomen **ohne** CCR7-Expression im Gegensatz zu Karzinomen **mit** CCR7-Expression (**Tab. 2b**). Eine statistische Analyse ergab, dass ein positiver Zusammenhang besteht zwischen CCR7-Expression und

Lymphgefäßinvasion (Chi²-Test, p=0,013), dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (Chi²-Test, p=0,002) und der Anzahl von positiven Lymphknoten (Chi²-Test, p=0,003). Hervorzuheben ist, dass es kein PDAC ohne CCR7-Expression gab, das eine massive Lymphgefäßinvasion (3 oder mehr infiltrierte Gefäße pro Schnitt) oder Metastasen in mehr als 3 Lymphknoten zeigte.

Keine Signifikanz ergab die Untersuchung der CCR7-Expression in Bezug auf das Tumorstadium (Chi²-Test, p=0,552, bzw. p=0,723), das UICC-Stadium (Chi²-Test, p=0,456, bzw. p=0,083) oder die Überlebenszeit nach Diagnose (log-rank-Analyse, p=0,55).

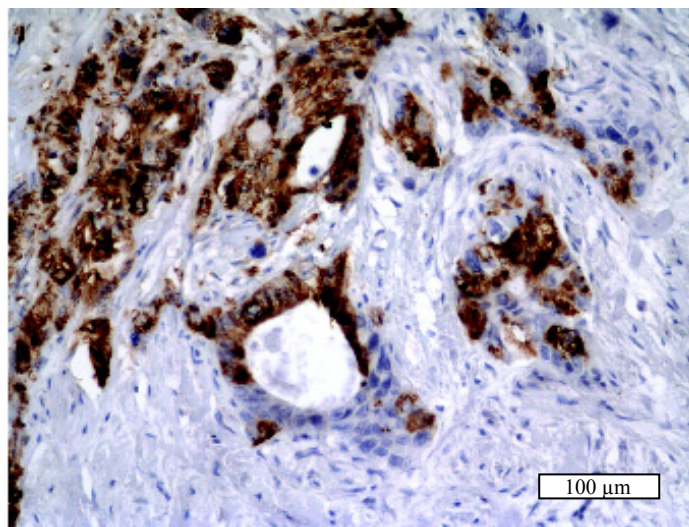


Abb. 5: CCR7-Immunfärbung im humanen Pankreaskarzinom. Starke, überwiegend zytoplasmatische Expression in den Tumorzellen (x400).

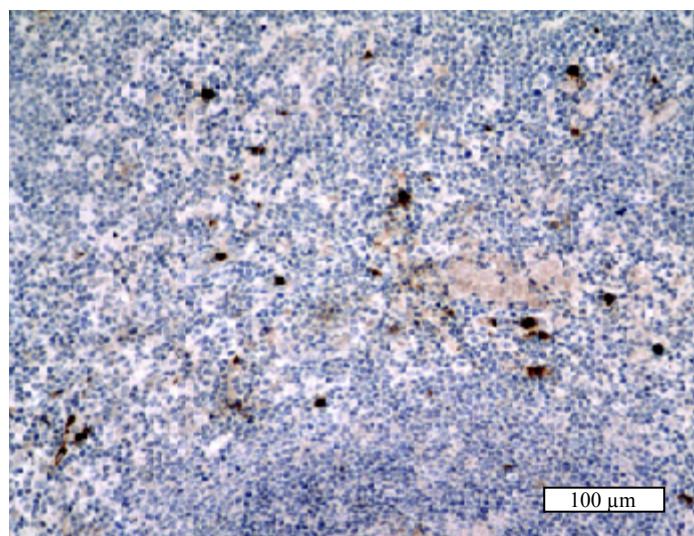


Abb. 6: CCR7-Immunfärbung in einem reaktiven Lymphknoten als Kontrollgewebe. In der T-Zell-Zone sieht man vereinzelt CCR7-positive Zellen, entsprechend T-Lymphozyten und dendritischen Zellen (x400).

Tab. 2: Beziehung zwischen CCR7-Expression und lymphatischer Ausbreitung in humanen PDACs

CCR7 Expression	a)		pWert ^a	b)		pWert ^a
	Keine oder geringe	Mäßige oder starke		Keine	Geringe bis starke	
Lymphgefäßinvasion						
Nicht nachweisbar	46	28		18	56	
Gering-Mäßig	14	17		2	29	
Massiv ^b	3	13	0,005	0	16	0,013
Lymphknotenmetastasen ^c						
Nicht vorhanden	30	20		15	35	
Vorhanden	33	38	0,037	5	66	0,002
Anzahl der positiven Lymphknoten ^c						
0	31	20		15	36	
1-3	21	22		5	38	
>3	10	16	0,161	0	26	0,003
Tumorstadium						
1	1	0		0	1	
2	3	1		0	4	
3	51	48		19	80	
4	12	8	0,552	3	17	0,723
UICC ^d nach pT-Stadium						
I	2	0		0	2	
II	25	18		13	30	
III	28	30		6	52	
IVa	11	7		2	16	
IVb	1	2	0,456	1	2	0,083
UICC ^d nach cT-Stadium						
I	3	0		0	3	
II	25	15		12	28	
III	23	28		6	45	
IVa	15	12		3	24	
IVb	1	1	0,25	1	1	0,085

^a Chi² Test, wenn nicht anders angegeben^b 3 oder mehr Lymphgefäße enthalten Tumorzellen^c 5 Fälle, die nur eine kontinuierliche Ausbreitung in Lymphknoten zeigten, wurden ausgeschlossen.^d UICC 1997

5.2. CCL21 ist in tumor-assoziierten Lymphgefäßen hochreguliert

In Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen (mit anti-CD34, LYVE-1 und CCL21-Antikörpern) konnte gezeigt werden, dass CCL21 selektiv in Lymphgefäßen und nicht in Blutgefäßen der normalen Haut exprimiert wird (**Abb. 7**).

Eine ähnliche Verteilung wie in der Haut konnte in normalem Pankreasgewebe nachgewiesen werden, wo CCL21 nur in dünnwandigen, offenen, Podoplanin-positiven Gefäßen entlang von größeren Gefäßen, Pankreasgängen und Nerven detektiert werden konnte. Die Endothelzellen dieser Lymphgefäße waren flach und zeigten nur eine geringe bis mäßige, überwiegend perinukleär liegende Positivität für CCL21 (**Abb. 8**). Im normalen Pankreas war der Anteil von CCL21-positiven Lymphgefäßen im Vergleich zu den Podoplanin-Signalen 25,78% (Standardabweichung 11,73; Spanne 10,22-46,55).

Im Gegensatz dazu konnten in intratumoralen und peritumoralen Lymphgefäßen in Pankreaskarzinomen hohe CCL21/Podoplanin-Verhältnisse (durchschnittlich 56,91%, Standardabweichung 18,67, Spanne 16,49-90,43) nachgewiesen werden. Außerdem fand sich eine signifikante Hochregulation im Vergleich zu Lymphgefäßen in normalem Pankreasgewebe ($p < 0,001$, Mann-Whitney U Test). Kein Unterschied ($p = 1$, Mann-Whitney U Test) konnte zwischen CCL21/Podoplanin-Verhältnissen in N0-PDACs ohne Lymphgefäßinvasion (durchschnittlich 54,33%, Standardabweichung 23,21, Spanne 16,49-90,43) und N1-PDACs mit massiver Lymphgefäßinvasion (durchschnittlich 59,09%, Standardabweichung 11,59, Spanne 44,93-86,34) gefunden werden.

Die Endothelzellen in tumor-assoziierten Lymphgefäßen stellten sich vergrößert dar und enthielten stärkere CCL21-Signale im gesamten Zytoplasma als Endothelzellen in normalen Pankreata (**Abb. 9**).

Eine ebenfalls starke CCL21-Expression lag in Lymphgefäß-Endothelzellen chronischer Alkohol-Pankreatitiden vor (durchschnittlich 57,83 %, Standardabweichung 21,82, Spanne 28,75-96,17) (**Abb. 10**). Diese wurden untersucht, da sich uns die Frage gestellt hatte, ob die CCL21-Erhöhung tumorspezifisch ist oder doch möglicherweise mit der Stromareaktion in Verbindung steht, die in chronischen alkoholischen Pankreatitiden derjenigen in Karzinomen sehr ähnelt.

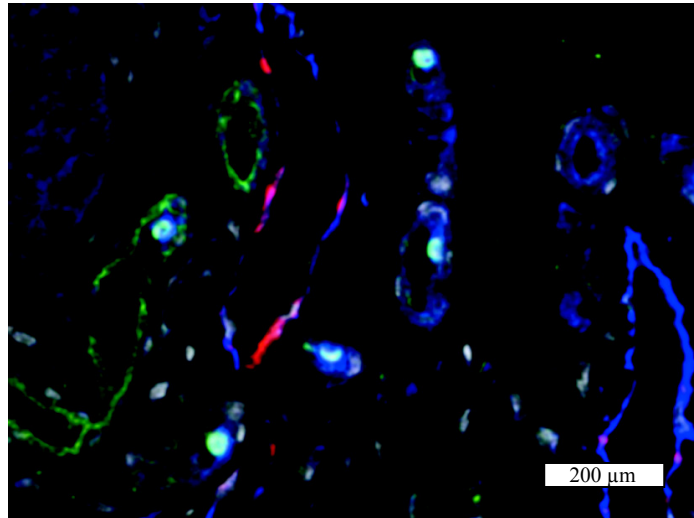


Abb. 7: Dreifach-Färbung von Blutgefäßen (CD34, grün), Lymphgefäßen (LYVE-1, blau) und CCL21 (rot) in normaler Haut. CCL21 wird ausschließlich in lymphatischen Endothelzellen exprimiert (x200).

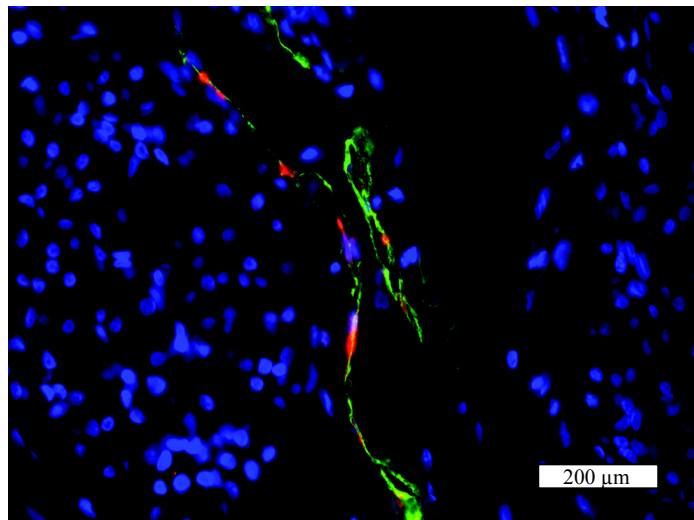


Abb. 8: Doppel-Immunfluoreszenzfärbung (grün Podoplanin, rot CCL21) im normalen Pankreas. Zu erkennen sind flache lymphatische Endothelzellen und eine schwache, überwiegend perinukleäre Expression von CCL21 (x200, overlay, DAPI counterstain).

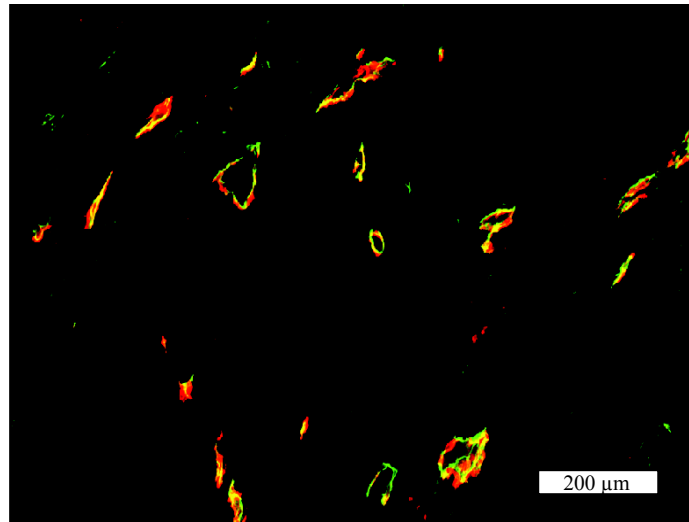


Abb. 9: Im Gegensatz zur schwachen, überwiegend perinukleären Expression von CCL21 und den flachen Endothelzellen im normalen Pankreas ist das Endothel der Lymphgefäße peritumoral geschwollen und zeigt eine starke CCL21-Expression (grün Podoplanin, rot und gelb CCL21) (x200).

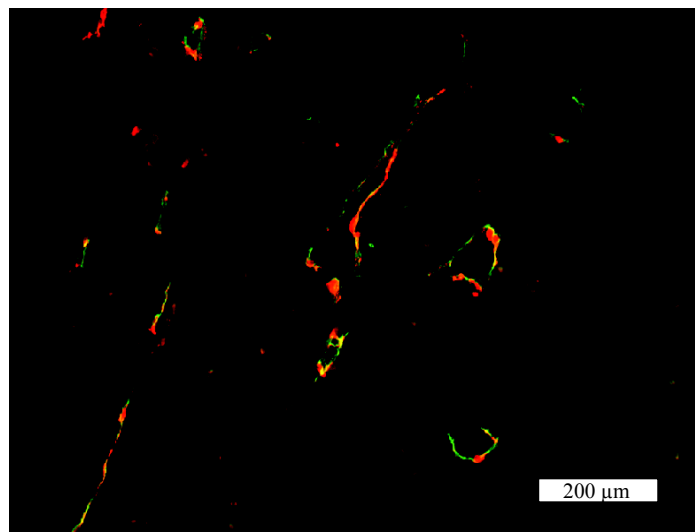
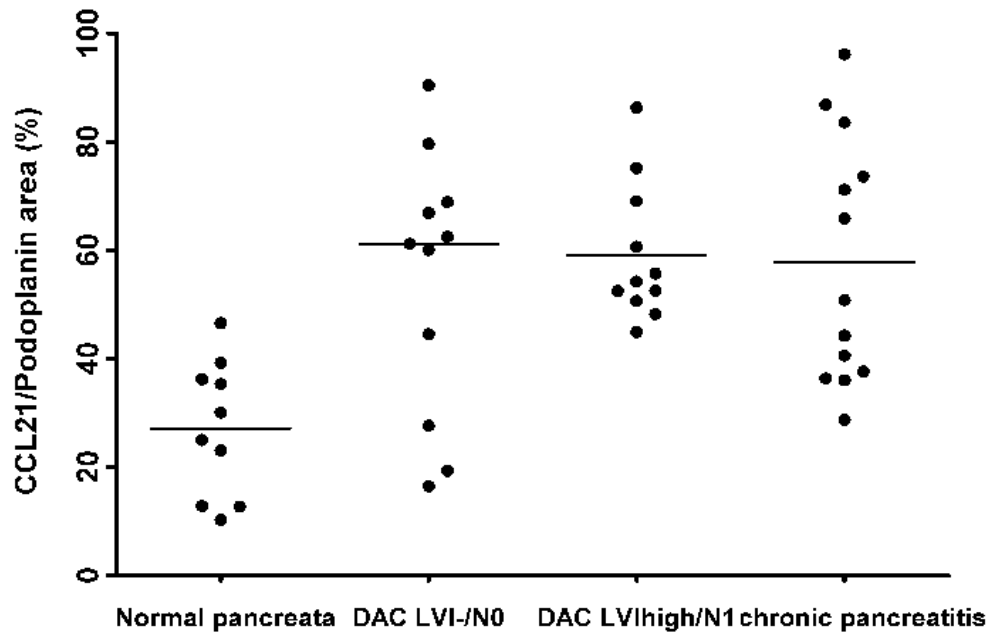


Abb. 10: Ähnlich wie im Karzinom zeigen auch Lymphgefäße in der chronischen Pankreatitis geschwollene Endothelien und eine starke CCL21-Expression (grün Podoplanin, rot und gelb CCL21) (x200).

Diagramm 1: Expression von CCL21 in Lymphgefäßen normaler Pankreata, im PDAC ohne Lymphgefäßinvasion und ohne Lymphknotenmetastasen, bzw. mit starker Lymphgefäßinvasion und mit Lymphknotenmetastasen, sowie in der chronischen Pankreatitis.



5.3. CXCR4 wird in duktalem Pankreaskarzinomen exprimiert und zeigt eine Assoziation mit dem klinischen Tumorstadium

Wie CCR7 wurde auch CXCR4 hauptsächlich in Tumorzellen exprimiert (**Abb. 11 und 12**). Für die Untersuchungen wurde in diesem Fall eine Serie von 96 Fällen aus dem Institut für Pathologie in Kiel genutzt. 22% (21/96) der PDACs wiesen eine starke CXCR4-Expression auf, 33% (32/96) eine mäßige und 28% (27/96) eine geringe. In 17% (16/96) der Fälle konnte CXCR4 in den Tumorzellen nicht nachgewiesen werden.

Auch hier wurden die Karzinome zunächst dichotom aufgeteilt in eine **nicht- oder wenig-**exprimierende und eine **mäßig- oder stark-**exprimierende Gruppe (**Tab. 4a**). Dabei zeigte sich, dass Karzinome, die CXCR4 in mäßigem oder starkem Ausmaß exprimieren, Lymphgefäße nicht signifikant häufiger infiltrieren als Karzinome, die nur wenig oder sogar gar kein CXCR4 exprimieren (Chi²-Test, p=0,345).

Ebensowenig konnte ein positiver statistischer Zusammenhang nachgewiesen werden, wenn PDACs **mit** Lymphknotenmetastasen mit PDACs **ohne** Lymphknotenmetastasen verglichen wurden (Chi²-Test, p=0,489).

Auch hier interessierte uns, ob eventuell bei **vollständig fehlender** CXCR4-Expression in Karzinomen die Fähigkeit, Anschluss an das Lymphgefäßsystem zu erlangen, verloren geht. Wieder verglichen wir das Vorhandensein von Lymphgefäßinvasion einerseits und das Auftreten von Lymphknotenmetastasen andererseits in Karzinomen **ohne** CXCR4-Expression im Gegensatz zu Karzinomen **mit** CXCR4-Expression. Eine statistische Analyse ergab, dass auch hier kein positiver Zusammenhang besteht zwischen CXCR4-Expression und Lymphgefäßinvasion (Chi²-Test, p=0,325), dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (Chi²-Test, p=0,237) und der Anzahl von positiven Lymphknoten (Chi²-Test, p=0,423).

Auch keine Signifikanz ergab die Untersuchung der CXCR4-Expression in Bezug auf das pathologisch bestimmte Tumorstadium (pT-Stadium), wobei sich beim Vergleich von dichotom (keine oder wenig versus mäßig oder starke Expression) aufgeteilten Tumoren jedoch zumindest eine Tendenz erkennen ließ (Chi²-Test, p=0,066). Wurde zum Vergleich das klinische Stadium (cT-Stadium) genutzt, konnte bei dichotomer Aufteilung tatsächlich ein signifikanter Unterschied gezeigt werden (Chi²-Test, p=0,033).

Eine Tendenz war ebenfalls zu erkennen zwischen den dichotom aufgeteilten Tumoren und den nach dem klinischen Stadium ermittelten UICC-Stadien (Chi²-Test, p=0,137).

Eine log-rank-Analyse zur Untersuchung der Überlebenszeit nach Diagnose ergab weder ein signifikantes Ergebnis, wenn die Fälle mit keiner oder wenig mit denen mit mäßig oder viel CXCR4-Expression verglichen wurden, noch, wenn Fälle ohne und mit CXCR4-Expression verglichen wurden (log-rank-Analyse, p=0,763, bzw. p=0,372).

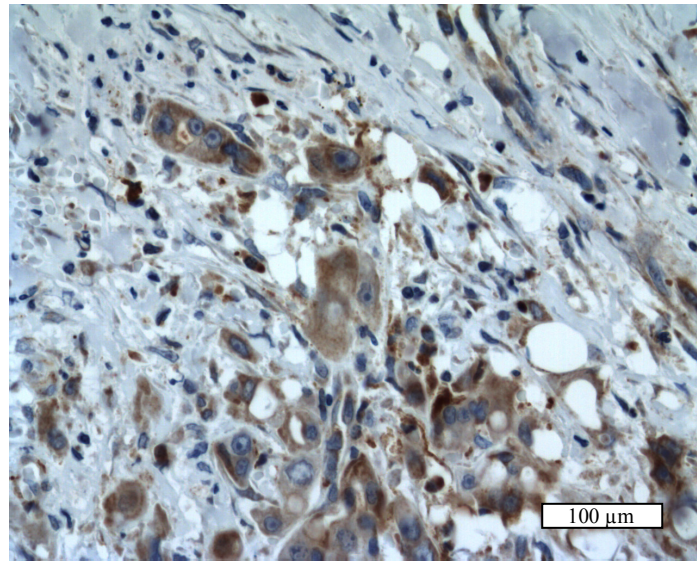


Abb. 11: Starke CXCR4-Expression in Tumorzellen und in Lymphozyten (x400).

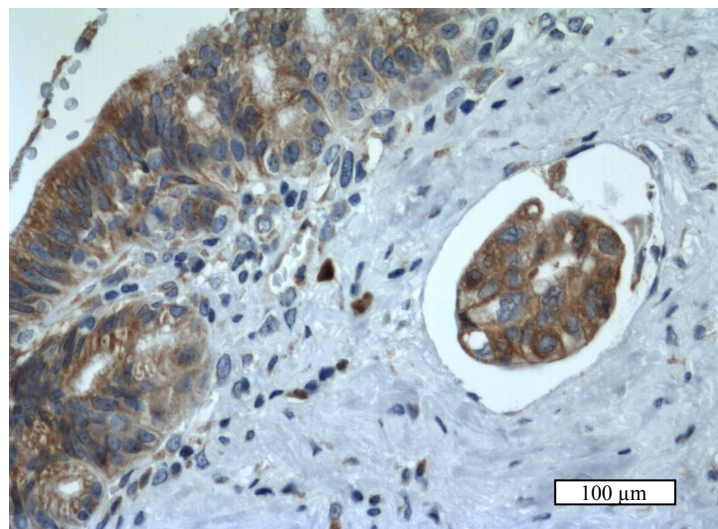


Abb. 12: Lymphangiosis carcinomatosa im Pankreaskarzinom. CXCR4-positive Tumorzellen im Lymphgefäß (x400).

Tab. 4: Beziehung zwischen CXCR4-Expression und lymphatischer Ausbreitung in humanen PDACs.

CXCR4 Expression	a)		pWert ^a	b)		pWert ^a
	Keine oder geringe	Mäßige oder starke		Keine	Geringe bis starke	
Lymphgefäßinvasion						
Nicht nachweisbar	25	29		7	47	
Gering-Mäßig	15	16		8	23	
Massiv ^b	1	5	0,345	1	5	0,325
Lymphknotenmetastasen ^c						
Nicht vorhanden	15	15		3	27	
Vorhanden	28	38	0,489	13	53	0,237
Anzahl der positiven Lymphknoten ^c						
0	16	15		3	28	
1-3	19	24		9	34	
>3	7	14	0,428	4	17	0,423
Tumorstadium (pT)						
1	0	1		0	1	
2	4	0		1	3	
3	33	37		13	57	
4	6	13	0,066	2	17	0,784
Tumorstadium (cT)						
1	0	1		0	1	
2	4	0		1	3	
3	30	31		12	49	
4	8	19	0,033	3	24	0,719
UICC ^d nach pT-Stadium						
I	1	1		0	2	
II	12	11		3	20	
III	24	25		11	38	
IVa	5	13		2	16	
IVb	1	1	0,565	0	2	0,637
UICC ^d nach cT-Stadium						
I	2	1		0	3	
II	11	9		3	17	
III	21	21		10	32	
IVa	7	20		3	24	
IVb	1	0	0,137	0	1	0,576

^a Chi² Test, wenn nicht anders angegeben ^b 3 oder mehr Lymphgefäße enthalten Tumorzellen ^c 5 Fälle, die nur eine kontinuierliche Ausbreitung in Lymphknoten zeigten, wurden ausgeschlossen. ^d UICC 1997

6. Diskussion

In den hier durchgeführten Untersuchungen sowie in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass 10 von 12, bzw. 8 von 12 gut charakterisierten PDAC-Zelllinien, die ein breites Spektrum an Pankreaskarzinomzellen repräsentieren, mRNA von CCR7, bzw. CXCR4 exprimieren. FACS-Analysen deckten auf, dass nur geringe Mengen von CCR7 auf der Oberfläche von PDAC-Zelllinien exprimiert werden, wenn diese als anhaftende Monolayer-Kulturen gezüchtet wurden. Wenn die Zelllinien jedoch als dreidimensionale Sphäroide auf Agar-Platten kultiviert wurden, erfolgte in 7 von 11 Zelllinien eine signifikante Hochregulation von CCR7 auf der Zelloberfläche.

Außerdem ergab die Auswertung einer großen Anzahl von humanen PDACs, dass CCR7 in zahlreichen Tumoren vorhanden ist und die Ausprägung dieser Eigenschaft mit dem Vorhandensein von Lymphgefäßinvasion und Lymphknotenmetastasen korreliert. Weiterhin wird die Expression von CCL21 im Vergleich zu Lymphgefäßen in normalem Pankreasgewebe in peritumoralen und intratumoralen Lymphgefäßen signifikant hochreguliert.

Immunhistochemisch wurde eine große Serie von Pankreaskarzinomen untersucht. Das duktales Pankreaskarzinom ist einer der aggressivsten Tumoren des Menschen. Die meisten dieser Karzinome wachsen explosionsartig und verursachen erst in späten Stadien Symptome. Aus diesem Grund sind PDACs meist inoperabel. Und selbst wenn sie chirurgisch entfernt werden können, ist der Tumor meistens bereits über die Pankreasgrenzen hinausgewachsen und hat in Lymphknoten gestreut. Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen stellt einen negativen prognostischen Faktor für den Patienten nach Resektion dar (Neoptolemos et al, 2004). Dieser negative Effekt wird wahrscheinlich durch noch vorhandene Tumorzellen im peripankreatischen Binde-/Fettgewebe oder in Lymphgewebe verursacht. Die Tumorreste führen zu einem Rezidiv, auch wenn eine extensive Lymphadenektomie durchgeführt wurde.

Die Untersuchung der CCR7-Expression in der vorliegenden Schnittserie wies darauf hin, dass CCR7 signifikant die Lymphgefäßinvasion und Lymphknotenmetastasierung beeinflusst. Bemerkenswerterweise wurde diese Tatsache am deutlichsten, wenn Pankreaskarzinome ohne CCR7-Expression mit allen anderen Tumoren verglichen wurden, einschließlich derer, die nur wenig CCR7 exprimierten. Kein PDAC, das komplett negativ für CCR7 war, zeigte eine massive Lymphgefäßinvasion oder hatte in mehr als drei Lymphknoten gestreut. Dieser

Befund weist darauf hin, dass Abwesenheit von CCR7 die Fähigkeit der Karzinomzellen herabsetzt, in Lymphgefäße einzuwandern und dass damit die Lymphknotenmetastasierung in PDACs verringert wird. Ähnliche Ergebnisse wurden von Nakata et al (2008) publiziert. In deren Untersuchungen ergab sich, dass eine CCR7-Hochregulation einen negativen prognostischen Effekt auf das Überleben der Patienten hatte.

Andererseits gibt es einige PDACs mit Lymphknotenmetastasen, die kein oder wenig CCR7 exprimieren, so dass CCR7 offensichtlich nicht der einzige Faktor ist, der zu einer Lymphknotenmetastasierung führt. Dies ist plausibel, wenn man bedenkt, dass das PDAC ein extrem schnell wachsender aggressiver Tumor ist und die lymphatischen Wege zu den Lymphknoten kurz sind, da die peripankreatischen Lymphknoten hauptsächlich sehr nah an den eigentlichen Organgrenzen liegen. Die kurze Distanz zwischen Tumor und Lymphknoten könnte den passiven Transport von Tumorzellen über die Lymphflüssigkeit erleichtern. Trotz dieser Tatsache kann jedoch gesagt werden, dass CCR7 die lymphatische Ausbreitung des PDACs fördert.

Der Vergleich der CCR7-Expression in Bezug auf Tumoren aus verschiedenen Tumorstadien erbrachte keinen signifikanten Unterschied, ebensowenig wie Vergleiche verschiedener UICC-Stadien und der Überlebenszeit nach Resektion. Wie bereits oben erwähnt, liegt dies wahrscheinlich zum einen daran, dass noch andere Mechanismen die Entstehung von Lymphknotenmetastasen beeinflussen und zum anderen daran, dass nur wenige Tumoren niedriger T-Stadien in der Untersuchung zur Verfügung standen. Dies liegt wiederum daran, dass das Pankreaskarzinom erst in späten Stadien entdeckt wird. Es lagen also überwiegend T3- und T4-Karzinome im Kollektiv vor. Sollten in Zukunft diagnostische Methoden zur Früherkennung des PDAC existieren und damit mehr Karzinome niedriger Tumorstadien reseziert werden, wäre es möglich, dass sich ein anderes Ergebnis ergibt.

CCL21 wird ausschließlich in hochendothelialen postkapillären Venulen im Lymphknoten, in Stromazellen in sekundären lymphatischen Organen und in Lymphgefäßen in zahlreichen Organen exprimiert (Gunn et al, 1998). Die Untersuchung zur Frage, ob CCL21 auch in PDACs exprimiert wird, ergab, dass es hier ausschließlich in Lymphgefäßen zu finden ist und dass sich das Endothel von tumorassoziierten Lymphgefäßen im Gegensatz zu den flachen Endothelien von Lymphgefäßen in normalem Pankreasgewebe, wo CCL21 nur gering bis

mäßig exprimiert wird, geschwollen darstellt und starke CCL21-Signale zeigt. Wenn man bedenkt, dass CCR7 in PDAC-Zellen funktionell aktiv ist und die Migration der Tumorzellen fördert, ist anzunehmen, dass die Überexpression von CCL21 in tumorassoziierten Lymphgefäßen noch zusätzlich die Einwanderung von Tumorzellen unterstützt.

Die Frage, ob die Hochregulation der Expression von CCL21 in Lymphgefäßen mit dem Vorhandensein von Tumorgewebe in Beziehung steht, wurde angegangen, indem Fälle von chronischen alkoholischen Pankreatitiden untersucht wurden, in denen die zellulären Komponenten denen im peritumoralen Pankreasgewebe entsprechen. Es zeigte sich, dass die CCL21-Expression auch in intra- und peripankreatischen Lymphgefäßen von Pankreatitis-Patienten erhöht ist.

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die CCL21-Expression in Lymphgefäßen in vivo von Faktoren, die in aktivierten dendritischen Zellen produziert werden oder durch Behandlung mit entzündungsstimulierenden Zytokinen wie TNF-alpha und Oncostatin M hochreguliert werden kann (Sugaya et al, 2006; Martin-Fontecha et al, 2003). Diese Ergebnisse machen es um so wahrscheinlicher, dass die CCL21-Expression in entzündetem Gewebe über Zytokine reguliert wird.

Ko-Kultur-Experimente mit LECs und Fibroblasten wiesen außerdem darauf hin, dass CCL21 nicht von Fibroblasten über parakrine Stimulation beeinflusst wird (nicht publizierte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe).

Eine anti-TNFalpha-Therapie konnte in einem Mausmodell wesentlich das Wachstum von PDACs und auch die Ausbildung von Lebermetastasen reduzieren (Egberts et al, 2008), was ein weiterer wichtiger Hinweis darauf ist, dass Zytokine im Rahmen einer Entzündungsreaktion das Tumorwachstum unterstützen.

Bei der Untersuchung von CXCR4 im duktalem Pankreaskarzinom konnte festgestellt werden, dass auch dieser Rezeptor häufig exprimiert wird. In 83 % der untersuchten Fälle konnte mindestens eine geringe Expression nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zur Expression von CCR7 ergibt sich jedoch kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Maß der Lymphgefäßinvasion und der lymphatischen Ausbreitung. Ebenso wenig korreliert das Überleben nach Diagnose mit dem Maß der CXCR4-Expression. Eine identische Beobachtung machten auch Wehler et al (2006). Während bei unseren Untersuchungen ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden konnte zwischen der CXCR4-Expression und dem klinischen Tumorstadium (cT) (in einzelnen Fällen unterschied sich das pathologische vom klinischen Stadium, da hier klinischerseits eine Tumordinfiltration der Mesenterialwurzel oder großer Gefäße bestand, die pathologisch nicht nachgewiesen wurde und zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auch nicht bekannt war), jedoch nur eine Tendenz bei der Verwendung des klinischen UICC-Stadiums, war bei Wehler et al eine Signifikanz bei fortgeschrittenen UICC-Stadien zu sehen und ein Trend bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (T3 oder T4). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten möglicherweise durch eine abweichende Einteilung der Tumoren in verschiedene Gruppen entstanden sein.

Mehrere Arbeitsgruppen kamen ebenfalls zu dem Erkenntnis, dass CXCR4 in PDACs exprimiert wird. Neben Wehler et al konnten auch Koshiba et al (2000) in 71,2 % ihrer immungefärbten Schnitte CXCR4 detektieren.

Studien an anderen Malignomen des Menschen, wie zum Beispiel am kolorektalen Karzinom, Mammakarzinom oder malignen Melanom, ergaben, dass eine vermehrte Expression von CXCR4 zu früherer lymphogener und hämatogener Metastasierung führt (Kim et al, 2006; Schimanski et al, 2005; Müller et al, 2001). Eine Untersuchung eines eventuellen Zusammenhangs zwischen dem Ausmaß der CXCR4-Expression im Primärtumor und dem Vorliegen von Fernmetastasen ist beim Pankreaskarzinom nicht ohne Weiteres möglich, da eine Resektion des Tumors nur in Stadien ohne Fernmetastasen und aufgrund der fehlenden Frühsymptome fast nie in einem niedrigen Tumorstadium erfolgt. Die Gruppe um Thomas Wehler (2006) konnte 13 Fälle untersuchen, in denen Gewebe vom Primärtumor vorlag, obwohl bereits Fernmetastasen bestanden und stellte einen Trend fest, dass bei stärkerer CXCR4-Expression eine höhere Tendenz zur hämatogenen Metastasierung besteht.

Thomas et al überprüften 2008 die Anwesenheit von CXCR4 und SDF-1 in Vorläuferläsionen des Pankreaskarzinoms, den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Sie konnten

nachweisen, dass sowohl im Mausmodell als auch in menschlichem Gewebe die Expression von CXCR4 von normalem Gewebe zu PanIN 3-Läsionen zunimmt.

Marchesi et al (2004) konnten bei der Untersuchung von Zelllinien und humanen Krebszellen, die von Operationspräparaten gewonnen wurden, einen Nachweis von CXCR4-mRNA in 6 von 11 Zelllinien erbringen. Hierbei fiel auf, dass Zelllinien, die von metastatischen Läsionen stammten, eine höhere Expression aufwiesen als solche, die von Primärtumoren gewonnen worden waren.

Eine in vitro-Studie von Mori et al (2004) zeigte, dass die SDF-1/CXCR4-Achse womöglich eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas spielt, indem sie Einfluss nimmt auf die Fähigkeit zur Migration und Invasion der Tumorzellen. Zu einem ähnlichen Ergebnis führten Untersuchungen anhand von Zelllinien, in denen die SDF-1/CXCR4-Achse unterbrochen wurde und danach die Expression von Genen untersucht wurde, die vom Wnt/beta-Catenin pathway aktiviert werden. Es konnte eine wesentlich niedrigere Expression gezeigt werden, was ein Hinweis darauf ist, dass CXCR4 auf den Wnt pathway Einfluss nimmt und ein Blocken von CXCR4 eine Tumorprogression vermindern könnte (Wang et al, 2008).

Einen interessanten Ansatz für zukünftige Untersuchungen lieferten Kochetkova et al (2009), die anhand einer Brustkrebszelllinie zeigen konnten, dass eine funktionelle Expression von CXCR4 und auch CCR7 zu einer Anoikis-Resistenz der Tumorzellen führt, was bedeutet, dass die Überlebensfähigkeit der Zellen nach Auslösen der Zellen aus der zellulären und ECM-Umgebung verbessert wird.

Saur et al (2005) konnten außerdem anhand eines Maus-Modells zeigen, dass eine Expression von CXCR4 in Tumorzellen ein dramatisch erhöhtes Metastasierungspotential derselben bewirkt. Untersuchungen an Krebs-Stammzellen von humanen Pankreaskarzinomen ergaben weiterhin, dass zwar das kanzerogene Potential bei CXCR4-**negativen** Stammzellen erhalten bleibt, dass jedoch nur CXCR4-**positive** Stammzellen die Fähigkeit besitzen, Fernmetastasen auszubilden (Hermann et al, 2007).

2009 konnten Maréchal et al anhand von Tissue Microarrays zeigen, dass die CXCR4-Expression in Pankreaskarzinomen einen unabhängigen negativen Prognose-Faktor in Bezug

auf die Überlebenszeit der Patienten nach erfolgter R0-Resektion darstellt. Anders als bei unseren Ergebnissen stellte sich dort außerdem ein Zusammenhang mit dem Risiko der Lymphknotenmetastasierung heraus.

SDF-1 als Ligand von CXCR4 wird hauptsächlich in typischen „homing-Organen“, wie der Lunge, im Knochenmark, in der Leber und im Lymphknoten exprimiert (Phillips et al, 2003; Uchida et al, 2003). Hier sind auch die meisten Metastasen des PDACs zu finden, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die Tumorzellen durch die Expression von CXCR4 die Fähigkeit erlangen, in diese Organe zu metastasieren.

CXCR4 wird also in Pankreaskarzinomen exprimiert, was in mehreren Untersuchungen glaubhaft belegt wurde. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass dieser Chemokinrezeptor eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Migration von Pankreaskarzinomzellen, und damit bei der Tumorprogression, spielt. Es existieren bereits einige relevante experimentelle Daten, die dies weiter untermauern. CXCR4 ist damit auf jeden Fall ein potentielles Target, an dem möglicherweise angesetzt werden kann, eine metastatische Ausbreitung des PDACs zu verhindern. Hinsichtlich dieser Vermutung werden bereits verschiedene Inhibitoren in präklinischen Studien getestet.

7. Zusammenfassung

Das duktales Pankreaskarzinom ist bis heute ein nahezu unheilbarer Tumor, da Frühsymptome nicht auftreten und das Karzinom deshalb erst in hohen Tumorstadien entdeckt wird. Das Chemokin-Chemokinrezeptor-System konnte in zahlreichen malignen Erkrankungen mitverantwortlich gemacht werden für eine Tumorprogression und metastatische Ausbreitung der Tumoren.

Nachdem in Voruntersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe CXCR4- und CCR7-mRNA in zahlreichen Zelllinien duktaler Adenokarzinome des Pankreas nachgewiesen werden konnte, stellte sich uns die Frage, ob in vivo ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Expression dieser Rezeptoren und dem malignen Verhalten des Tumors besteht.

Anhand eines großen Patientenkollektivs aus dem Institut für Pathologie in Kiel und von der Universitätsklinik Heidelberg konnte durch Auswertung von Tumorgewebe und, wenn vorhanden, metastatischer Lymphknoten gezeigt werden, dass sowohl CCR7 als auch CXCR4 eine Rolle bei der Progression des Pankreaskarzinoms spielen. Karzinome, die CCR7 in mäßigem oder starkem Ausmaß exprimieren, infiltrieren Lymphgefäße signifikant häufiger als Karzinome, die nur wenig oder sogar gar kein CCR7 exprimieren. In ähnlicher Weise exprimiert eine signifikant größere Anzahl von PDACs **mit** Lymphknotenmetastasen mäßig bis stark CCR7 als Fälle **ohne** Lymphknotenmetastasen. Dieser Zusammenhang ist allerdings nur grenzwertig signifikant. Ein positiver Zusammenhang besteht zwischen CCR7-Expression und Lymphgefäßinvasion, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und der Anzahl von positiven Lymphknoten, wenn Fälle **vollständig ohne** CCR7-Expression mit denjenigen **mit** CCR7-Expression verglichen werden. Hervorzuheben ist, dass es kein PDAC **ohne** CCR7-Expression gibt, das eine massive Lymphgefäßinvasion (3 oder mehr infiltrierte Gefäße pro Schnitt) oder Metastasen in mehr als 3 Lymphknoten zeigt.

CCL21, der Ligand von CCR7, wird in tumor-assoziierten Lymphgefäßen hochreguliert, was möglicherweise die lymphatische Progression der PDAC weiter fördert. Diese Hochregulation wird vermutlich durch die karzinom-assoziierte chronische Entzündung ausgelöst, da wir eine Überexpression von CCL21 auch in Lymphgefäßen chronischer alkoholischer Pankreatitiden feststellen konnten.

Die Untersuchung der CXCR4-Expression in Bezug auf das pathologisch bestimmte Tumorstadium (pT-Stadium) ergab keine Signifikanz, wobei sich beim Vergleich von dichotom (keine/wenig versus mäßig/starke Expression) aufgeteilten Tumoren jedoch zumindest eine Tendenz erkennen ließ. Wurde zum Vergleich das klinische Stadium (cT-Stadium) genutzt, konnte bei dichotomer Aufteilung ein signifikanter Unterschied in der CXCR4-Expression festgestellt werden zwischen Tumoren niedriger und hoher Tumorstadien. Eine Tendenz war ebenfalls zu erkennen zwischen den dichotom aufgeteilten Tumoren und den nach dem klinischen Stadium ermittelten UICC-Stadien.

Letztendlich lässt sich aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen schlussfolgern, dass die Expression von CCR7 die lymphatische Ausbreitung des duktales Adenokarzinoms des Pankreas und CXCR4 das lokale Wachstum des Tumors fördert.

8. Literaturverzeichnis

- Adachi S, Kuwata T, Miyaike M, Iwata M. Induction of CCR7 expression in thymocytes requires both ERK signal and Ca²⁺ signal. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 1188-1193
- Barbero S, Bonavia R, Bajetto A, et al. Stromal cell derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1 / 2 and Akt. *Cancer Res* 2003; 63:1969-1974
- Barbieri F, Bajetto A, Porcile C, et al. CXC receptor and chemokine expression in human meningioma: SDF1/CXCR4 signaling activates ERK1/2 and stimulates meningioma cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1090:332-343
- Brand RE. The diagnosis of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7(4): 287-297
- Brand RE, Tempero MA. Pancreatic cancer. *Curr Opin Oncol* 1998; 10(4): 362-366
- Breitfeld D, Ohl L, Kremmer E, Ellwart J, Sallusto F, Lipp M, Förster R. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 2000 Dec 4; 192(11):1545-1552
- Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768:952-963
- Chinni SR, Sivalogan S, Dong Z, et al. CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12. *Prostate* 2006; 66:32-48
- Cyster JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 1999; 286(5447):2098-2102

- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littmann DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996 Jun 20; 381(6584):661-666
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996 Jun 20; 381(6584):667-673
- Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2008; 68:1443-1450
- Federspiel B, Melhado IG, Duncan AMV, Delancy A, Schappert K, Clark-Lewis I, Jirik FR. Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment receptor isolated from human spleen. *Genomics* 1993; 16:707-712
- Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharm Tox* 2002 April; Vol 42:469-499
- Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999 Oct 1;99(1):23-33
- Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naïve T lymphocytes. *Proc Natl Acad USA* 1998; 95:258-263
- Hedberg M, Borgstrom A, Genell S, Janzon L. Survival following pancreatic carcinoma: a follow-up study of all cases recorded in Malmo, Sweden, 1977-1991. *Br J Surg* 1998; 85(12):1641-1644

- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 2007 Sept; 1:313-323
- Hirao M, Onai N, Hiroishi K, Watkins SC, Matsushima K, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. CC chemokine receptor-7 on dendritic cells is induced after interaction with apoptotic tumor cells: critical role in migration from the tumor site to draining lymph nodes. *Cancer Res.* 2000 Apr 15; 60(8):2209-2217
- Höpken UE, Foss HD, Meyer D, Hinz M, Leder K, Stein H, Lipp M. Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant Hodgkin disease correlates with distinct dissemination of neoplastic cells in lymphoid organs. *Blood* 2002 Feb 15; 99(4):1109-1116
- Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Involvement of SDF-1alpha/CXCR4 axis in the enhanced peritoneal metastasis of epithelial ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 122:91-99
- Kim J, Mori T, Chen SL, Amersi FF, Martinez SR, Kuo C, Turner RR, Ye X, Bilchik AJ, Morton DL, Hoon DSB. Chemokine receptor CXCR4 in patients with melanoma and colorectal cancer liver metastases and the association with disease outcome. *Ann Surg.* 2006 Jul; 244(1):113-120
- Klöppel G, Hruban RH, Longnecker DS, Adler G, Kern SE, Partanen TJ. Ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Pathology and Genetics of the Digestive System. WHO classification of Tumours.* Edited by Hamilton SR, Aaltonen LA. Lyon, IARC Press, pp. 221-230
- Kochetkova M, Kumar S, McColl SR. Chemokine receptors CXCR4 and CCR7 promote metastasis by preventing anoikis in cancer cells. *Cell Death and Differentiation* 2009 Jan; 1-10 (advance online publication)

- Koshihara T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* 2000 Sep; 6(9):3530-3535
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*, 1999; 49(1):8-31
- Lee KK. Carcinoma of the pancreas. *Curr Treat Options Gastroenterol* 1999; 2(3):227-237
- Marchesi F, Monti P, Leone BE, Zerbi A, Vecchi A, Piemonti L, Mantovani A, Allavena P. Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. *Cancer Res*. 2004 Nov 15; 64:8420-8427
- Maréchal R, Demetter P, Nagy N, Berton A, Decaestecker C, Polus M, Closset J, Déviere J, Salmon I, Van Laethem JL. High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2009 May 5; 100(9): 1444-1451. Epub 2009 April 7.
- Martin-Fontecha A, Sebastiani S, Höpken UE, Ugucioni M, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med*. 2003 Aug 18; 198(4):615-621
- Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M. Expression of the Chemokine Receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2002 May 15; 62(10):2937-2941
- Michaud DS. The epidemiology of pancreatic, gallbladder, and other biliary tract cancers. *Gastrointest Endosc* 2002; 56(6 Suppl):S195-200
- Mori T, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Ito D, Kami K, Masui T, Fujimoto K, Tamamura H, Hiramatsu K, Fujii N, Imamura M. *Mol Cancer Ther*. 2004 Jan; 3(1):29-37

- Mori T, Kim J, Yamano T, Takeuchi H, Huang S, Umetani N, Koyanagi K, Hoon DS. Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. *Cancer Res.* 2005 Mar 1; 65(5):1800-1807
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001 Mar 1; 410(6824):50-56
- Murakami T, Maki W, Cardones AR, et al. Expression of CXC chemokine receptor-4 enhances the pulmonary metastatic potential of murine B16 melanoma cells. *Cancer Res* 2002; 62:7328-7334
- Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:593-633
- Nakata B, Fukunaga S, Noda E, Amano R, Yamada N, Hirakawa K. Chemokine receptor CCR7 expression correlates with lymph node metastasis in pancreatic cancer. *Oncology* 2008 ; 74:69-75
- Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, Bassi C, Dunn JA, Hickey H, Beger H, Fernandez-Cruz L, Dervenis C, Lacaine F, Falconi M, Pederzoli P, Pap A, Spooner D, Kerr DJ, Büchler MW. European Study Group for Pancreatic Cancer. A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(12):1200-1210
- Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002; 283:R7-R28
- Paget SL. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889; 1:571
- Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167:1676-1686

- Reynolds T. Why tumors travel to certain sites still puzzles researchers. *JNCI* 1998; 90(7):491-493
- Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000 ; 18:217-242
- Rothenberg ML, Abbruzzese JL, Moore M, Portenoy RK, Robertson JM, Wanebo HJ. A rationale for expanding the endpoints for clinical trials in advanced pancreatic carcinoma. *Cancer* 1996; 78(3):627-632
- Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999a; 401: 708-712
- Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Förster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 1999b; 29: 1617-1625
- Saur D, Seidler B, Schneider G, Algul H, Beck R, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Schmid RM. CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2005; 129:1237-1250
- Schimanski CC, Schwald S, Simiantonaki N, Jayasinghe C, Gönner U, Wilsberg V, Junginger T, Berger MR, Galle PR, Moehler M. Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar 1; 11(5) :1743-1750
- Sipos B, Kojima M, Tiemann K, Klapper W, Kruse ML, Kalthoff H, Schniewind B, Tepel J, Weich H, Kerjaschki D, Klöppel G. Lymphatic spread of ductal pancreatic adenocarcinoma is independent of lymphangiogenesis. *J Pathol* 2005; 207:301-312
- Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Koniaris L, Kaushal S, Abrams RA, et al. Resected adenocarcinoma of the pancreas – 616 patients: results, outcomes and prognostic indicators. *J Gastrointest Surg* 2000; 4:567-579

- Stein JV, Soriano SF, M'Rini C, Nombela-Arrieta C, Gonzales De Buitrago G, Rodriguez-Frade JM, Mellado M, Girard JP, Martinez AC. CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 2002; 101: 38-44
- Sugaya M, Fang L, Cardones AR, Kakinuma T, Jaber SH, Blauvelt A, et al. Oncostatin M enhances CCL21 expression by microvascular endothelial cells and increases the efficiency of dendritic cell trafficking to lymph nodes. *J Immunol* 2006; 177:7665-7672
- Sullivan SK, McGrath DA, Grigoriadis D, Bacon KB. Pharmacological and signaling analysis of human chemokine receptor CCR7 stably expressed in HEK-293 cells: high-affinity binding of recombinant ligands MIP-3beta and SLC stimulates multiple signaling cascades. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 685-690
- Till KJ, Lin K, Zuzel M, Cawley JC. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 2002 April 15; 99(8):2977-2984
- Tilton B, Ho L, Oberlin E, Loetscher P, Baleux F, Clark-Lewis I, Thelen M. Signal transduction by CXC chemokine receptor 4. Stromal cell-derived factor 1 stimulates prolonged protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase 2 activation in T lymphocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 313-324
- Thomas RM, Kim J, Revelo-Penafiel MP, Angel R, Dawson DW, Lowy AM. The chemokine receptor CXCR4 is expressed in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gut* 2008 Nov; 57(11):1555-1560
- Uchida D, Begum NM, Almofti A, Nakashiro K, Kawamata H, Tateishi Y, Hamakawa H, Yoshida H, Sato M. Possible role of stromal-cell-derived factor-1/CXCR4 signaling on lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res*. 2003; 290:289-302
- Wanebo HJ, Vezeridis MP. Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge. *Cancer* 1996; 78(3): 580-591

- Wang Z, Ma Q, Liu Q, Yu H, Zhao L, Shen S, Yao J. Blockade of SDF-1/CXCR4 signalling inhibits pancreatic cancer progression *in vitro* via inactivation of canonical Wnt pathway. *British J of Cancer*. 2008; 99:1695-1703
- Warshaw AL, Fernandez-Del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 1992; 326(7): 455-465
- Wehler T, Wolfert F, Schimanski CC, Gockel I, Herr W, Biesterfeld S, Seifert JK, Adwan H, Berger MR, Junginger T, Galle PR, Moehler M. Strong expression of chemokine receptor CXCR4 by pancreatic cancer correlates with advanced disease. *Oncol Rep*. 2006 Dec; 16(6):1159-1164
- Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Goggins M, Canto MI, Abrams RA, Laheru D, Jaffee EM, Hidalgo M, Yeo CJ. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* 2002; 26(4):176-237
- Yoon Y, Liang Z, Zhang X, et al. CXC chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. *Cancer Res* 2007; 67:7518-7524
- Yoshida R, Nagira M, Kitaura M, Imagawa N, Imai T, Yoshie O. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem* 1998; 273: 7118-7122

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Klöppel (Direktor des Institutes für Pathologie des UKSH Campus Kiel bis April 2009) für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung der wissenschaftlichen Infrastruktur sowie für die freundliche und stets hilfsbereite Unterstützung. Die Voraussetzungen für die Durchführung dieser Arbeit wurden erst durch seine jahrelange Archivierung duktaler Pankreaskarzinome geschaffen.

Prof. Dr. Bence Sipos danke ich herzlich für die Entwicklung des Themas und die sehr gute Betreuung über den gesamten Zeitraum.

Danke an Dr. Bergmann vom Universitätsklinikum in Heidelberg für die freundliche Bereitstellung zusätzlicher Pankreaskarzinom-Fälle.

Herzlichen Dank an Jan Sperveslage für die fachliche Hilfe, vor allem auf dem Gebiet der Immunfluoreszenz.

Danke an Sabine Roggenbrodt und Harald Boigs für das Anfertigen der immunhistochemischen Färbungen.

Ein ganz ganz herzliches Dankeschön geht auch an Dagmar Schmöe, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

10. Lebenslauf

Name: Sunna Frank
Geburtstag: 24. Oktober 1977 in Heide
Dienstanschrift: UKSH Campus Kiel
Institut für Pathologie
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 14
24105 Kiel
Derzeitige Tätigkeit: Assistenzärztin für Pathologie seit März 2005

Schulbildung:

1984-1988 Grundschule Süderholm
1988-1994 Gymnasium Heide-Ost
1994-1995 Mount Tabor High School, Winston-Salem, NC, USA
1995-1997 Gymnasium Heide-Ost
1997 Abitur

Studium:

1997-2003 Philipps-Universität Marburg (WS 97/98 Biologie, ab SS 98 Humanmedizin)
2003-2004 Praktisches Jahr Christian-Albrechts-Universität Kiel
Dezember 2004 Erteilung der Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang:

Anstellung seit März 2005 am Institut für Pathologie am UKSH Campus Kiel als Ärztin in der Weiterbildung

Forschungsprojekte:

Mitarbeit am EU-Projekt „Novel molecular diagnostic tools for the prevention and the diagnosis of pancreatic cancer“ (MolDiagPaCa)

Veröffentlichungen:

Sipos B, Frank S, Gress T, Hahn S, Klöppel G. Pancreatic intraepithelial neoplasia revisited and updated. *Pancreatology*. 2009;9(1-2):45-54.

Eingereicht beim Journal of Pathology: Sperveslage J, Frank S et al. Lack of CCR7 expression is rate limiting for lymphatic spread of pancreatic ductal adenocarcinoma.

