

Aus der Klinik für Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
Direktor: Prof. Dr. med. Kunzendorf  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**MODIFIZIERTE CCR7-LIGANDEN ALS THERAPIEOPTION  
MALIGNER TUMORE IN VIVO**

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

vorgelegt von  
**KATRIN STARKE**  
aus **Kiel**

**Kiel 2012**

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Stefan Krautwald

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Schütze

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2013

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 24. Oktober 2012

gez. Prof. Dr. med. Ulrich Kunzendorf  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

## ABKÜRZUNGEN

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Hintergrund</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Der Chemokinrezeptor CCR7 und seine endogenen Liganden .....	1
1.1.2 Taxonomie des Chemokin-Chemokinrezeptor-Systems.....	2
1.1.3 Chemokinrezeptoren als Zielstruktur für die Tumorthherapie .....	3
1.1.4 Chemokin-Analoga .....	4
1.1.5 Vorarbeiten .....	5
<b>1.2 Fragestellung</b> .....	<b>6</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>7</b>
2.1.1 Laborgeräte .....	7
2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Plastik- und Glaswaren.....	8
2.1.3 Medien, Reagenzien und Chemikalien .....	9
2.1.4 Kits.....	11
2.1.5 Zelllinien .....	11
2.1.6 Mäuse.....	13
2.1.7 Antikörper .....	14
2.1.8 Rekombinante CCR7-Liganden.....	14
2.1.8.1 Fusionsproteine CCL19-IgG und CCL21-IgG auf Basis der endogenen Chemokine.....	14
2.1.8.2 Fusionsproteine $\Delta 6$ -CCL19-IgG und $\Delta 4$ -CCL21-IgG auf Basis der Chemokin- Analoga.....	15
2.1.9 Software .....	16
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.2.1 Zellkultur.....	17
2.2.2 Produktion von CCL19-IgG .....	17
2.2.2.1 CCL19-IgG Überstandsgewinnung mit stabil-transfiziertem CHO Klon .....	18
2.2.2.2 Aufreinigung von CCL19-IgG.....	18
2.2.2.3 Messung der Proteinkonzentration .....	19
2.2.3 Tiermodelle .....	20
2.2.3.1 Injektion von Tumoren .....	20
2.2.3.2 Bestimmung der TumorgroÙe.....	20
2.2.3.3 Biolumineszenz-Imaging .....	20
2.2.4 Durchflusszytometrische Testung des Bindungsvermögen an CCR7 .....	21
2.2.4.1 Prinzip der zytometrischen Detektion über Ligand-CCR7 Bindung.....	22
2.2.4.2 Probenvorbereitung.....	22
2.2.5 Proliferationsassay .....	23
2.2.5.1 Prinzip des BrdU-Proliferationsassays .....	23
2.2.5.2 Probenvorbereitung.....	23
2.2.5.3 Messung der Proliferation.....	23
2.2.5.4 Auswertung des Proliferationsassays.....	24

2.2.6 Primäre T-Zellen in vitro .....	24
2.2.6.1 Isolierung von primären T-Zellen aus Mäusen .....	24
2.2.6.2 Primäre T-Zellen im Proliferationsassay .....	26
2.2.7 Chemotaxis Zellmigrationstest .....	26
2.2.8 Messung von Ca <sup>2+</sup> -Flux .....	27
2.2.9 Proteinnachweis über SDS-PAGE und Western Blot.....	28
2.2.9.1 Herstellung von Zelllysaten .....	28
2.2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.2.9.3 Western Blot-Analyse .....	30
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Charakterisierung von B16 und LLC Tumoren in vitro .....</b>	<b>32</b>
3.1.1 B16 Tumorzellen .....	32
3.1.2 LLC Tumorzellen.....	33
<b>3.2 Tierversuche mit B16 Tumoren.....</b>	<b>34</b>
3.2.1 Intraperitoneale vs. subkutane Applikation von Tumorzellen.....	34
3.2.2 B16 Tumorzellzahlfindung im Tiermodell .....	35
3.2.3 In vivo CCL19-IgG-Behandlung von B16 Tumoren in Mäusen .....	36
3.2.4 Ex vivo Untersuchung der eingesetzten B16 Tumorzellen.....	37
<b>3.3 Tierversuche mit LLC Tumoren .....</b>	<b>39</b>
3.3.1 LLC Tumorzellzahlfindung im Tiermodell .....	39
3.3.2 In vivo CCL19-IgG-Behandlung von LLC Tumoren in Mäusen .....	40
3.3.3 Ex vivo Untersuchung der eingesetzten LLC Tumorzellen.....	41
<b>3.4 Untersuchung der CCR7-Liganden Δ4-CCL21-IgG und Δ6-CCL19-IgG.....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Proliferationshemmung vermittelt durch die CCR7-Liganden.....	43
3.4.2 Bindungsvermögen der CCR7-Liganden.....	44
3.4.2 Bindungsvermögen der CCR7-Liganden.....	44
3.4.3 Induktion von Chemotaxis und Ca <sup>2+</sup> -Flux durch CCR7-Liganden .....	45
3.4.4 Induktion von p44/42 MAPK Aktivität durch Δ4-CCL21-IgG.....	46
<b>4 DISKUSSION.....</b>	<b>47</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>53</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>55</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	

## Abkürzungen

ATCC	American Tissue Culture Collection
Aqua dest.	aqua destillata
BrdU	Bromdesoxyuridin
CCRL2	chemokine (CC motif) receptor-like 2; auch CRAM genannt
CCX-CKR	chemocentryx chemokine receptor
CRAM	chemokine receptor on activated macrophages; auch CCRL2 genannt
D6	chemokine-binding protein D6
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
FBS	fetal bovine serum
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	green fluorescence protein
GPCR	G protein-coupled receptor
hIgG	humanes Immunglobulin G
HRP	horse radish peroxidase
i.p.	intraperitoneal
MACS	magnetic-activated cell sorting
MAPK	mitogen-activated protein (MAP) kinase
mCCL19	muriner Chemokin (CC Motiv) Ligand 19
NHL	non-Hodgkin lymphoma
NSCLC	non-small-cell lung cancer
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
rlu	relative luminescence unit(s)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	real time PCR
S.	Seite
s.c.	subcutaneous
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	Tris-buffered saline
vs.	versus
w/v	weight per volume

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

### 1.1.1 Der Chemokinrezeptor CCR7 und seine endogenen Liganden

Der CC-Chemokinrezeptor 7 (CCR7) spielt eine Schlüsselrolle in der adaptiven Immunantwort und hat überdies eine Bedeutung im Verhalten vieler maligner Tumore. Zum einen trägt CCR7 zur Initiation und Modulation der Immunantwort bei, indem durch den Rezeptor sowohl Immunzellen zu den lymphatischen Organen geleitet werden („Homing“) als auch ihre Interaktionen dort CCR7-gesteuert sind (Förster et al., 2008). Insbesondere erfolgt die Antigen-spezifische Aktivierung von bestimmten T-Zell-Untergruppen (u.a. naiven T-Zellen und zentralen Gedächtnis-T-Zellen) durch dendritische Zellen in Lymphknoten CCR7-abhängig, indem CCR7 die Kolokalisation von dendritischen Zellen und T-Zellen unterstützt (Sanchez-Sanchez et al., 2006; Förster et al., 2008). Zum anderen zeigen Studien, dass CCR7 von vielen malignen Zellen exprimiert wird (malignes Melanom, NSCLC, NHL, Kolon-, Magenkarzinom, vgl. Übersicht in Balkwill, 2012) und darüber hinaus eine Korrelation zwischen CCR7-Expression und lymphatischer Metastasierung besteht (u.a. Wiley et al., 2001; Raman et al., 2007; Ueda et al., 2010). Bei einigen gastrointestinalen (Mashino et al., 2002; Günther et al., 2005) und lymphatischen Erkrankungen (Yang et al., 2011) sowie beim Mammakarzinom (Cabioglu et al., 2005) und malignem Melanom (Takeuchi et al., 2004) wurde das Ausmaß der CCR7-Expression als Biomarker für eine ungünstige Prognose beschrieben.

CCR7 gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und erhält ein Signal durch Bindung von CCL19 oder CCL21. Diese beiden Chemokine stellen die einzigen natürlichen Liganden von CCR7 dar. Chemokine sind chemotaktisch aktive Zytokine, welche die Migration von Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile und basophile Granulozyten, Mastzellen, NK-Zellen) aus dem Blut ins Gewebe und im Gewebe lenken (Lolis und Murphy, 2007). Eine Chemokin-Rezeptorbindung bewirkt generell die Chemotaxis zu Arealen mit höheren Chemokin-Konzentrationen (Olson und Ley, 2002). Chemokine können außerdem weitere Aufgaben wahrnehmen, die für sie spezifisch sind: u.a. sind Chemokine bei der Leukozytenentwicklung, der Organogenese, der Angiogenese, dem Tumorstromwachstum und der Metastasierung aktiv (Olson und Ley, 2002). Insgesamt sind etwa 50 verschiedene Chemokine bekannt, die von diversen Immunzellen und Gewebezellen sezerniert werden und 19 unterschiedliche Chemokinrezeptoren ansprechen.

Die beiden CCR7-Liganden werden konstitutiv von verschiedenen Zellen exprimiert. So werden sie vor allem von fibroblastischen Retikulumzellen in den T-Zell-reichen Arealen sezerniert (Luther et al., 2002; Fang und Hwang, 2009). Per Transzytose gelangen die Chemokine zur luminalen Oberfläche der hochendothelialen Venolen (HEV) (Förster et al., 2008). Zusätzlich wird CCL19 von reifen dendritischen Zellen exprimiert, während CCL21 von afferenten lymphatischen Endothelzellen sowie in der Maus (aber nicht im Menschen) auch von HEV produziert wird (vgl. Sanchez-Sanchez et al., 2006). Während CCL19 von vornherein in löslicher Phase vorliegt, kann CCL21 aufgrund seines langen C-terminalen Endes, das zwölf basische Aminosäurenreste enthält, besonders gut von Glykosaminoglykanen (GAGs) und anderen Molekülen der extrazellulären Matrix gebunden werden (Förster et al., 2008). Schumann et al. (2010) berichten, dass dendritische Zellen in der Lage sind, die verankernden Reste zu trunkieren und so CCL21 in die lösliche Phase zu überführen. Lösliches CCL21 zeigte funktionelle Ähnlichkeit mit CCL19: beide induzierten Chemotaxis, aber CCL21 verlor die Fähigkeit der Integrinaktivierung in dendritischen Zellen. Hier zeigt sich, dass die Aktivierung von Chemokinrezeptoren über das traditionelle Agonist-Rezeptor Paradigma hinausreicht und auch die Interaktion zwischen GAGs und Chemokinen eine wichtige Rolle spielt (Lolis und Murphy, 2007). Neben der Integrinaktivierung kann die Chemokin-GAG-Interaktion auch die Oligomerisierung von Chemokinen bewirken, wodurch die Chemokin-Konzentration lokal angehoben werden kann (Lolis und Murphy, 2007). Trotz solcher Aggregationen interagieren Chemokine generell als Monomere mit ihrem Rezeptor (Clark-Lewis et al., 1995; Baggiolini et al., 1997).

### **1.1.2 Taxonomie des Chemokin-Chemokinrezeptor-Systems**

Chemokine sind stark basische, kleine Proteine aus 70 bis 125 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von meist 6 bis 14 kDa (Olson und Ley, 2002). Obwohl Chemokine generell nur wenig Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz zeigen, ähneln sie sich auffällig in ihrer tertiären Struktur (Clark-Lewis et al., 1995; Murphy et al., 2000). Anhand der Anzahl und Anordnung von konservierten Cysteinen am N-Terminus werden Chemokine vier Familien (CC, CXC, CX<sub>3</sub>C, XC) zugeordnet (Murphy et al., 2000). CC-, CXC- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine enthalten vier konservierte Cysteine in ihrer Sequenz, die Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dritten sowie dem zweiten und vierten Cystein bilden. Bei den CC-Chemokinen stehen die ersten beiden Cysteine nebeneinander, bei den CXC-Chemokinen sind diese durch eine Aminosäure voneinander getrennt, bei der CX<sub>3</sub>C-Familie durch drei Aminosäuren, wobei diese Familie allerdings nur ein Mitglied kennt, das entsprechend als erster (und einzi-

ger) Ligand CX<sub>3</sub>CL1 genannt wird. Im Gegensatz dazu haben die XC-Chemokine nur zwei statt vier konservierte Cysteine, die dem zweiten und vierten Cystein der anderen Chemokinfamilien entsprechen. Da jeder Chemokinrezeptor ausschließlich Mitglieder einer bestimmten Chemokinfamilie bindet, bestimmt die Klassifikation der Chemokine auch die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren. Der Name eines Rezeptors, wie z.B. CCR7, setzt sich aus dem CC für die Chemokinfamilie und einem R für Rezeptor sowie einer fortlaufenden Nummerierung zusammen.

### **1.1.3 Chemokinrezeptoren als Zielstruktur für die Tumortherapie**

Chemokine spielen eine bedeutende Rolle in mehreren Aspekten der Tumorprogression (Raman et al., 2007; Ruffini et al., 2007). Tumorzellen exprimieren Chemokinrezeptoren, die ihre Proliferation, ihre Angiogenese und ihr Überleben unterhalten sowie ihre Metastasierung in spezifische Organe oder Lymphbahnen fördern können (Ruffini et al., 2007). Sowohl die Stromazellen, welche die Tumore umgeben, als auch die Tumorzellen selbst produzieren Chemokine, die durch parakrine oder autokrine Mechanismen das Tumorstadium vorantreiben (Raman et al., 2007).

In der Literatur werden besonders die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7 als mögliche „Targets“ zur Verhinderung von Metastasen hervorgehoben. So können sowohl CXCR4 als auch CCR7 eine Actinpolymerisierung und Pseudopodienformation vermitteln und nachfolgend chemotaktische und invasive Zellantworten induzieren (Müller et al., 2001). Aber während das Chemokin-Rezeptor-Paar CXCL12-CXCR4 generell mit der Fernmetastasierung von Tumoren assoziiert ist, scheint das Chemokin-Rezeptor-Paar CCL21-CCR7 insbesondere die lymphatische Metastasierung zu bahnen (Raman et al., 2007).

In zahlreichen Veröffentlichungen der letzten Jahre wurden vor allem CXCR4-Antagonisten als eine aussichtsreiche Behandlungsstrategie gegen Tumore angesehen (u.a. Kakinuma und Hwang 2006; Cronin et al., 2010; Righi et al., 2011). Der Einsatz dieser Antagonisten könnte diverse Vorteile, die sich Tumorzellen durch Hochregulation ihrer CXCR4-Expression verschaffen, neutralisieren. Beispielsweise können CXCR4<sup>+</sup> Bronchialkarzinomzellen die konstitutive Sekretion von CXCL12 durch Stromazellen in die Mikroumgebung des Tumors für sich ausnutzen (Burger et al., 2011). Die Aktivierung von CXCR4 induziert Zellmigration und Adhäsion an die Stromazellen, was wiederum Wachstums- und Resistenzsignale an die Tumorzellen weitergibt. Burger et al. (2011) waren in der Lage, mit CXCR4-Antagonisten die CXCR4-vermittelte Adhäsion der Tumorzellen an die Stromazellen zu stören. Mit Plerixafor (AMD3100) ist sogar ein CXCR4-Antagonist, der die Bindung von

CXCL12 an CXCR4 verhindert, auf dem Markt erhältlich. Bislang ist dieses Medikament allerdings lediglich zur Stammzellmobilisierung und nicht zur Tumorthherapie zugelassen.

Es existieren bisher nur wenige Veröffentlichungen bezüglich CCR7 als konkreten Behandlungsansatz bei Krebserkrankungen. Jedoch konnten kürzlich Lanati et al. (2010) ein natürlich vorkommendes menschliches Protein identifizieren, das CCL21 mit hoher Affinität bindet und so inaktiviert. Lanati et al. (2010) fusionierten dieses Protein mit einem humanen IgG1-Fc Teil. Dieses Chemotrap-1 genannte Fusionsprotein konnte *in vitro* die chemotaktische Aktivität der endogenen CCR7-Liganden hemmen. Auch *in vivo* zeigte Chemotrap-1 einen Effekt auf in Mäuse injizierte CCR7<sup>+</sup> Melanomzellen (B16 und A375). Tumore, die mit dem Chemotrap-1 Expressionsvektor transfiziert waren, entwickelten weniger lymphatische Metastasen und eine Tumormorphologie, die keine Beeinflussung durch einen artifiziell aufgebauten CCL21-Gradienten (implantierte CCL21-sezernierende Zellen) aufwies.

### 1.1.4 Chemokin-Analoga

Aufgrund der prominenten Rolle von Chemokinen besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von Therapeutika, die bestimmte Chemokinwirkungen modulieren bzw. blockieren. Die vorrangige Rezeptorbindungsdomäne aller Chemokine liegt in der Nähe des N-Terminus, und Antagonisten können durch gezielte Veränderungen in dieser Region geschaffen werden (Baggiolini et al., 1997). In zahlreichen Arbeiten (u.a. Gong und Clark-Lewis, 1995; Baggiolini et al., 1997; Sasaki et al., 2003) ist die Verwendung von N-terminal trunkeerten oder modifizierten Chemokin-Analoga, die als Rezeptor-Antagonisten wirken, beschrieben. Die Generierung solcher Moleküle beruht auf dem Prinzip der gerichteten Mutagenese, die mittels rekombinanter DNA eine gezielte Veränderung der DNA ermöglicht, wie beispielsweise den gezielten Austausch einzelner Nukleinbasen eines Gens.

Im Falle der CC-Chemokine liegen die Regionen für die Rezeptoraktivierung (biologische Wirkung) und die Rezeptorbindung voneinander getrennt innerhalb des zehn Aminosäurenreste umfassenden N-Terminus, wodurch Ligand-Analoga identifiziert werden konnten, die zwar binden, aber nicht den Rezeptor aktivieren (Clark-Lewis et al., 1995). Sasaki et al. (2003) untersuchten die antagonistischen Eigenschaften von verschiedenen murinen CCL21-Analoga. Es zeigte sich, dass eine N-terminale Trunkierung von mehr als vier Aminosäuren CCL21-Analoga erzeugte, die keine Chemotaxis und keinen Ca<sup>2+</sup>-Flux nach Bindung an CCR7 induzierten und damit als Antagonisten fungierten.

Im Sequenzvergleich zwischen humanem CCL19 und CCL21 zeigt sich, dass beide Chemokine zwar nur eine 25 %ige Übereinstimmung besitzen, sie aber trotzdem eine im Ausmaß

vergleichbare Aktivierung von CCR7 auslösen (Ott et al., 2006). Ott et al. (2006) substituieren die ersten sechs N-terminalen Aminosäuren von humanem CCL19 gegen die Aminosäuren von CCL21 und berichten, dass dieser chimäre Ligand weiterhin zu einer Rezeptoraktivierung (GTP- $\gamma$ S Bindungsassay) mit der gleichen Potenz wie die endogenen Liganden führte und auch Chemotaxis induzierte. Außerdem resultierte die sukzessive Trunkierung des N-Terminus von CCL19 in einer geminderten Affinität gegenüber CCR7.

### 1.1.5 Vorarbeiten

Krautwald et al. (2004) konnten zeigen, dass CCL19 wie auch CCL21 in relativ hohen Konzentrationen (2,5  $\mu$ M) die Proliferation CCR7-positiver Zellen – in diesem Fall HuT-78 Zellen und primärer T-Zellen – in vitro inhibierte. Die Fusionsproteine, CCL19-IgG und CCL21-IgG, bestehend aus einem murinen CCR7-Liganden und dem Fc-Teil eines humanen Immunglobulins G, übten ebenfalls den gleichen proliferationshemmenden Effekt aus. Außerdem zeigten die Fusionsproteine ähnliche Rezeptoraffinität sowie grundsätzlich die gleiche biologische Aktivität wie rekombinantes CCL19 und CCL21 (Ziegler et al., 2007). Diese Fusionsproteine wurden von der Arbeitsgruppe entwickelt, da sie gegenüber den rekombinanten Liganden CCL19 und CCL21 einige Vorteile bieten:

(1) Eine Fusion mit einem Fc-Teil resultiert in einer deutlichen Verlängerung der biologischen Halbwertszeit (von Minuten auf Tage, Krautwald et al., 2004). Dagegen können kleine Proteine wie rekombinantes mCCL19 (9 kDa, 83 Aminosäuren) rasch eliminiert werden.

(2) Das Vorhandensein eines (humanen) IgG-Anteils schafft erleichterte Bedingungen für die Proteinaufreinigung (Fusionsproteinherstellung) und für die Immunfärbung in der Durchflusszytometrie. Zusätzlich ermöglicht es prinzipiell eine bessere Detektierbarkeit im Tier.

Beide Fusionsproteine CCL19-IgG und CCL21-IgG demonstrieren generell die gleiche Wirksamkeit bezüglich der getesteten Eigenschaften, wie beispielsweise Signaltransduktion (Aktivierung von MAP Kinasen p44/42 (ERK1/2)) und Chemotaxis. Anhand von CCL19-IgG wurde der CCR7-vermittelte Effekt der Proliferationshemmung weitergehend untersucht. In Vorarbeiten und im Rahmen einer parallel durchgeführten Promotionsarbeit (S. Schott, bisher unveröffentlicht) zeigte sich, dass CCL19-IgG die Proliferation CCR7-positiver Tumorzellen in vitro supprimierte.

Jedoch gibt es zumindest einen Aspekt, der einer Tumorthherapie mit CCL19-IgG entgegen steht: CCL19-IgG wirkte im Mausmodell immunsuppressiv und konnte so in vivo die Rejektion allogener Nieren- und Herztransplantate unterdrücken (Ziegler et al., 2006). Es fand eine deutliche Suppression der Immunantwort durch Störung der T-Zell-Migration statt,

was einen großen Nachteil im Rahmen der Behandlung von Malignomen darstellen könnte. Aus diesem Grund wurden in der Arbeitsgruppe parallel zwei CCR7-Ligand-Analoga entwickelt, um möglicherweise einen differenziellen Antagonismus auszunutzen, der unter Beibehaltung des Proliferationshemmeffektes sonstige CCR7-vermittelte Signale antagonisiert. Diese CCR7-Ligand-Analoga sind die Fusionsproteine  $\Delta 6$ -CCL19-IgG und  $\Delta 4$ -CCL21-IgG, wobei bei  $\Delta 6$ -CCL19-IgG der CCL19-Anteil N-terminal um sechs Aminosäuren und bei  $\Delta 4$ -CCL21-IgG der CCL21-Anteil um vier Aminosäuren trunziert wurde.

## 1.2 Fragestellung

Die zielgerichtete Rekrutierung von Leukozyten ist ein komplexer, fein justierter Prozess, der eine zentrale Bedeutung sowohl unter homöostatischen als auch pathologischen Gesichtspunkten einnimmt. Die als Chemotaxis bezeichnete Wanderung dieser Zellen wird letztlich durch den Aufbau eines Chemokingradienten gesteuert. Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine, die an korrespondierende Rezeptoren binden und unter Beteiligung zahlreicher Proteine verschiedene intrazelluläre Signalwege initiieren. Viele Tumore exprimieren Chemokinrezeptoren und setzen diese zur Proliferation und Metastasierung ein. Hierfür nutzen speziell lymphogen metastasierende Tumore (Melanome, Mammakarzinome etc.) den Chemokinrezeptor CCR7 und seine endogenen Liganden CCL19 und CCL21.

Durch den Einsatz eines von der Arbeitsgruppe generierten CCL19-IgG Fusionsproteins soll im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob die zuvor in vitro beobachtete proliferationshemmende Eigenschaft dieses Moleküls auch zur Therapie CCR7-exprimierender Tumore verwendet werden kann. Dafür soll im Tiermodell mit syngenem Tumoren untersucht werden, ob eine Behandlung mit CCL19-IgG auch in vivo ein Tumorwachstum verlangsamen oder gar verhindern kann.

Da sich die Fragestellung dieser Arbeit bei Verwendung des CCR7-Agonisten CCL19-IgG mitunter nicht positiv beantworten lässt oder auch um die Wirkung auf Ligandenebene zu optimieren, wurde zusätzlich ein alternatives Konzept auf Basis von Chemokin-Antagonisten entworfen. So sollen im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich neue – ebenfalls in der Arbeitsgruppe entworfene – Moleküle untersucht werden, die unter der Zielsetzung generiert wurden, durch selektive Rezeptorblockade eine Proliferationshemmung zu induzieren ohne dabei die immunmodulierenden Eigenschaften des natürlichen Chemokins aufzuweisen. Unterschiedliche N-terminal modifizierte CCR7-Liganden ( $\Delta 6$ -CCL19-IgG,  $\Delta 4$ -CCL21-IgG) sollen innerhalb der vorliegenden Arbeit zunächst in vitro genauer charakterisiert und optional für eine Anwendung im Tiermodell analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

**Tabelle 1: Laborgeräte**

<b>Gerät</b>	<b>Modell, Hersteller</b>
Analysenwaage	CP 124S-OCE, Sartorius, Göttingen
Absauggerät	VACUSAFE, Integra Biosciences, Schweiz
Blot-Kammer	Semi Phor, Hoefer Pharmacia Biotech, USA
CCD-Kamera zur Biolumineszenz	NightOWL LB 983, Berthold Technologies, Bad Wildbad
CO <sub>2</sub> -Inkubator	HERAcell 240, Thermo Electron Corp./Heraeus, USA
Durchlichtmikroskop	Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Göttingen
Durchflusszytometer	Coulter Epics XL, Beckmann Coulter, Krefeld
Gelelektrophorese-Set für SDS-PAGE	Mighty Small II SE 260 Mini Vertical Electrophoresis System, Hoefer Dual Gel Caster, Amersham Biosciences, UK
Gelelektrophorese-Spannungsquelle	Mighty Slim SX250 Power Supply, Hoefer Pharmacia Biotech, USA
Luminometer	Luminescence Victor light 1420, Perkin Elmer, USA
Magnetsäulenständer	QuadroMACS Separator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Messschieber	Digital Caliper within 300 mm, Neiko Stainless Steel
Magnetrührer	IKA RH Basic 2 IKAMAG®, IKA Werke, Staufen
Mikrotiterplatten-Lesegeräte	Infinite 200 PRO, Tecan, Crailsheim
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Research 10 µl, 100 µl, 1000 µl, Eppendorf, Hamburg
Pipette, 8-Kanal	Research Pro 1200 µl, Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	Easypet, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	SevenEasy, Mettler-Toledo, Gießen
Photometer	Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences/GE Healthcare, UK
Präzisionswaage	CP 4202 S, Sartorius, Göttingen
Röntgenfilmentwickler	Curix 60, Agfa, Belgien
Sterilwerkbank	HERAsafe, Thermo Electron Corp./Heraeus, USA

Temperierbarer Schüttelinkubator	Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge für Zellkultur	Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Trockenschrank E28, Binder, Tuttlingen
Vortex-Gerät	Reax Control, Heidolph Instruments, Schwabach
Wippschüttler	ProBlot™ Rocker 25D, Labnet, USA

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien, Plastik- und Glaswaren

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien, Plastik- und Glaswaren**

<b>Verbrauchsmaterial, Sonstiges</b>	<b>Details, Bezugsquelle</b>
Chromatographie-Papier	Blot Paper, GE Healthcare, UK
Durchflusszytometer-Röhrchen	Tube 5 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Film für Chemilumineszenz Detektion (Radiographie)	Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare, UK
Amicon-Filterröhrchen	Amicon Ultra 15 ml Centrifugal Filters, Membran NMWL, 10 kDa, Millipore, Schwalbach
Filtersäule	Econo-Column, Bio-Rad Laboratories, München
Gewebekulturflaschen (30 ml, 175 cm <sup>2</sup> )	550 ml, 30 ml Arbeitsvol., CellStar Tissue Culture Flasks, Greiner Bio-One, Solingen
Gewebekulturflaschen (50 ml, 175 cm <sup>2</sup> )	650 ml, 50 ml Arbeitsvol., grüne Belüftungskappe, Tissue Culture Flasks, Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturpetrischalen	Cell Culture Dish 100 mm, BD Falcon, Heidelberg
Insulineinmalspritzen mit integrierter Kanüle	Omnican® 40, B Braun, Melsungen
Spritzen	Spritzen 10 ml, 50 ml, BD Discardit, Heidelberg
Kanülen	25G x 5/8"-Nadel, 0,50 x 16 mm, BD Microlance, Heidelberg
Küvetten	Einmal-Küvetten, 1,5 ml halbmikro, Brand, Wertheim
Magnetsäule für Zellseparation	MACS LS Säule, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Migrationsplatten	Transwell, 24-Loch Zellmigrationsplatte, Inserts mit 5 µm Porengröße, Corning Costar, Bodenheim
Mikrotiterplatte (96-Loch), schwarzer Boden	96-well Microplate, black, Greiner Bio-One, Solingen
Nitrocellulose Membran	Hybond ECL Nitrocellulose Membran, Amersham/GE Healthcare, UK
PD-10 Säulen	PD-10 Desalting Columns, GE Healthcare, UK
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Serologische Pipetten, Sarstedt, Nümbrecht

Pipettenspitzen (10/100 µl; 1250 µl)	Biosphere 10,100 µl; Biosphere Filter Tip 1250 µl, Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß	SafeSeal Gefäß 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenkassette	Dr. Goos Suprema, Heidelberg
Spritzenfilter zum Sterilfiltrieren	Whatman Puradisc™ FP Spritzenfilter, 0,2 µm, GE Healthcare, UK
Vakuum-Sterilfilterset	Stericup and Steritop Vacuum filter units, 0,22 µm, Millipore, Eschborn
Versuchsplatten (6, 24, 96-Loch), transparenter Flachboden	Multiwell, Tissue Culture Treated, Flat Bottom, BD Falcon, Heidelberg
Versuchsplatten (96-Loch), transparenter Rundboden	Multiwell, Tissue Culture Treated, Round Bottom, BD Falcon, Heidelberg
Zählkammer nach Neubauer (CE) und Deckgläser	0,0025 mm <sup>2</sup> , 1 mm, Marienfeld, Lauda-Königshofen; Thermo Scientific Deckgläser, Menzel, Braunschweig
Zellsieb	Cell Strainer, Porengröße 40 µm, BD Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	CellStar 15 ml & 50 ml Conical Centrifuge Tubes, Greiner Bio-One, Solingen

### 2.1.3 Medien, Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 3: Medien, Medienzusätze und Antibiotika**

<b>Medium, Zusatz</b>	<b>Details, Bezugsquelle</b>
DMEM	Dulbecco's MEM, High Glucose 4,5 g/l, PAA Laboratories, Österreich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem, Darmstadt
FBS (Fetal Bovine Serum)	Fetal Bovine Serum Gold, hitzeinaktiviert und sterilfiltriert, PAA Laboratories, Österreich
FBS (Fetal Bovine Serum) IgG-frei	Ultra-Low IgG Fetal Bovine Serum, GibcoBRL, Life Technologies, Eggenstein
G418 (Geneticin)	G418 Sulfate Pulver, PAA Laboratories, Österreich
Glukose	D-(+)-Glucose Sol. 45 %, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutamin	L-Glutamine, PAA Laboratories, Österreich
Hank's BSS (Balanced Salt Solution)	Hank's BSS, 500 ml, PAA Laboratories, Österreich
HEPES-Puffer	PAA Laboratories, Österreich
Luciferin	D-Luciferin-Natriumsalz, AppliChem, Darmstadt
Natrium-Bikarbonat	Sodium Bicarbonate Sol., Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Natrium-Pyruvat	Sodium Pyruvate Sol., Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS (Phosphate-Buffered Saline)	Dulbecco's PBS, PAA Laboratories, Österreich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	100x Penicillin/Streptomycin, PAA Laboratories, Österreich
ProCHO4	Biowhittaker™, Lonza, Belgien
Protein A-Sepharose Partikel	Protein A Sepharose™ CL-4B, Amersham Biosciences, Freiburg
Puromycin	Puromycin-Dihydrochlorid, 25 mg, AppliChem, Darmstadt
RPMI 1640	Life Technologies, Karlsruhe
Trypanblau	Trypan Blue Sol. 0,4 %, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA Solution (10x)	PAA Laboratories, Österreich

**Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien**

<b>Chemikalie, Reagenz</b>	<b>Details, Bezugsquelle</b>
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Carl Roth, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumin)	Albumin Fraction, AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Na <sub>2</sub> EDTA Titriplex III, Merck, Darmstadt
Eisessig (konzentrierte Essigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Walter CMP, Kiel
FURA 2-AM (Acetoxymethylester)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Ionomycin calcium salt, Biomol, Hamburg
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Ketamin (Esketaminhydrochlorid)	Ketanest®S, Injektionslösung, Pfizer, Berlin
Magermilchpulver	BioRad Blotting Grade Blocker, Bio-Rad Laboratories, München
Marker für SDS-PAGE	Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color, Bio-Rad Laboratories, München
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Orthovanadat	Sodium orthovanadate, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Calbiochem®, Merck, Darmstadt
Ponceau S	Ponceau S Practical grade, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	SERVA, Heidelberg
TEMED (Tetramethylethyldiamid)	Carl Roth, Karlsruhe
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
TRITON X-100 (Octoxinol 9)	Calbiochem®, Merck, Darmstadt
Tween 20	AppliChem, Darmstadt
Xylazin	Xylazine, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.4 Kits

**Tabelle 5: Kommerzielle Kits**

<b>Kommerzielles Kit</b>	<b>Details, Bezugsquelle</b>
Bio-Rad Proteinassay	Nr. 500-0006, Bio-Rad Laboratories, München
Chemilumineszenz-Detektion-Kit für Western Blot-Analyse	ECL-Western Blot Detektionssystem (Reagent 1 & 2), Nr. 32106, Thermo Scientific, Bonn
Chemilumineszenz-Immunoassay Kit für die Proliferationsanalyse	Cell Proliferation ELISA, BrdU Nr. 11 669 915 001, Roche Diagnostics, Mannheim
T-Zell-Isolationskit	Pan T Cell Isolation Kit, Nr. 130-090-861, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

### 2.1.5 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet: B16, LLC, HuT-78 und CHO. Tabelle 6 gibt einen Überblick über diese Zelllinien inklusive der Medien, in denen sie kultiviert wurden. Es folgen detailliertere Beschreibungen der einzelnen Zelllinien.

**Tabelle 6: Zelllinien und ihre Zellkulturmedien**

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Zusätze (Konzentration)	Bezugsquelle
B16-F10-luc-G5	Murines Melanom, adhären wachsend	DMEM	FBS 10 % Pen/Strep 1 % G418 400 µg/ml Puromycin 3 µg/ml	Bioware® Caliper, USA
LLC-GFP	Lewis Lung Carcinoma, murines Bronchialkarzinom, adhären wachsend	DMEM	FBS 10 % Pen/Strep 1 % G418 400 µg/ml	AntiCancer Inc., USA
HuT-78	Humanes Sezary T-Zell Lymphom, in Suspension wachsend	RPMI 1640	FBS 10 % Pen/Strep 1 % Na-Bikarbonat 1,5 g/l Na-Pyruvat 1 mM HEPES-Puffer 10 mM Glukose Lösung 4,5 g/l	ATCC, USA
CHO transfiziert mit CCL19-IgG	Genexpressions-system, bei 0 % FBS in Suspension wachsend	ProCHO4	Pen/Strep 1 %	ATCC, USA für parentale Zellen
	Kultivierte Zellen, adhären wachsend	DMEM	FBS (IgG-frei) 10 % Pen/Strep 1 % G418 400 µg/ml	

**B16.** Die B16 Tumorzellen entstammen einem malignen Melanom einer C57BL/6 Maus. Die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Zelllinie B16-F10-luc-G5 (Bioware, Caliper) ist abgeleitet vom B16-F10 Melanom, einer B16 Variante, die ursprünglich für ihr hohes Potential zur Bildung von Lungenmetastasen selektiert wurde (Poste et al., 1980). In die B16-F10 Zellen wurde das Firefly Luciferase Gen stabil transfiziert, um Lumineszenz-Imaging zu ermöglichen (Craft et al., 2005). Die Zellen sind überdies mit CCR7 transfiziert, so dass sie diesen Rezeptor überexprimieren. Außerdem trägt diese Zelllinie die zwei Resistenzgene Neomycin und PAC (Puromycin N-acetyl-transferase). Über diese Gene wird eine Positivselektion von transfizierten Zellen durch Kultivierung mit Geneticin (G418, Neomycin-Analogon) und/oder Puromycin möglich.

Für die Tierversuche wurden B16 Melanomzellen in C57BL/6 Mäuse subkutan injiziert (vgl. 2.2.3.1), wodurch lokal wachsende Tumore induziert wurden. In der Zellkultur zeigten die Zellen eine Verdopplungszeit von etwa 17 Stunden.

**LLC.** LLC-GFP Zellen (AntiCancer) basieren auf der Lewis Lung Carcinoma (LLC) Zelllinie, die dem Bronchialkarzinom einer C57BL/6 Maus entstammt. Die LLC Zelllinie

wurde mit einem GFP-Vektor stabil transfiziert, um beispielsweise einen Tumorprogress von lebenden Zellen direkt verfolgen zu können, ohne eine weitere Markierung der Zellen zu benötigen. GFP ist ein grün fluoreszierendes Protein, das ohne weitere Cofaktoren zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Im Rahmen zytometrischer Untersuchungen für diese Arbeit wurde das Signal der GFP-markierten LLC Zellen im Fluoreszenzkanal FL1 LOG (505 – 545 nm) detektiert. Als weiteres Gen trägt diese Zelllinie das Neomycin Resistenz Gen, das eine Positivselektion von Zellen durch Zugabe von Geneticin (G418) zulässt.

Für die Tierversuche wurden LLC Zellen in C57L/6 Mäuse subkutan injiziert (vgl. 2.2.3.1), und nach Anwachsen entstanden lokale Tumore von relativ weicher Konsistenz. In der Zellkultur zeigten diese Zellen eine Verdopplungszeit von etwa 21 Stunden.

**HuT-78.** HuT-78 (ATCC) ist eine Zelllinie, die sich aus dem humanen Sezary Hauttumor, einem T-Non-Hodgkin-Lymphom, ableitet. HuT-78 Zellen exprimieren CCR7 konstitutiv und im großen Ausmaß (Schweickart et al., 1994).

**CHO.** Diese Zelllinie (ATCC) leitet sich aus immortalisierten Ovarzellen des chinesischen Hamsters (Chinese Hamster Ovary) ab. Die CHO Zellen waren unter Nutzung des Vektors pcDNA3.1 mit CCL19-IgG stabil transfiziert worden (vgl. 2.1.8.1). Es gab zwei verschiedene Medien für die transfizierten CHO Zellen. Ein Teil der Zellen wurde unter Zugabe von IgG-freiem Serum im üblichen Kulturmedium (DMEM) kultiviert mit dem Ziel, eine große Anzahl von Zellen zum Einsatz zur Proteinproduktion bereitzustellen. Dem Medium wurde G418 (Neomycin-Analogon Geneticin) als Selektions-Antibiotikum zugegeben, da auf dem Vektor pcDNA3.1 auch das Neomycin-Resistenzgen kodiert ist. Anschließend wurden die Zellen zur Proteinüberstandsgewinnung in ein spezielles Medium (ProCHO4) überführt, in dem sie auch unter serumfreien Bedingungen gut proliferierten und in größerem Maße Proteine in den Überstand sezernierten.

### 2.1.6 Mäuse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 6 bis 8 Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 17 – 21 g verwendet. Die Tiere wurden unter den üblichen konstanten Bedingungen sowie gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes gehalten. Über den Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wurden die Tierexperimente beantragt und genehmigt (Aktenzeichen: 312-72241.121-4(45-5/08)).

## 2.1.7 Antikörper

**Tabelle 7: Antikörper (ohne Kit)**

Antikörper (Ak)	Verwendung	Verdünnung	Beschreibung, Firma
hIgG	Isotypkontrolle zum Fusionsprotein	äquimolar zur experimentellen Bedingung	Human-IgG, 50 g/l Infusionslösung, Intratect®, Biotest Pharma, Dreieich
anti-hIgG-PE	Durchflusszytometrie	1:100	Ziege anti-Human IgG (H+L)-RPE, R-Phycoerythrin (R-PE), IgG, F(ab') <sub>2</sub> -Fragment, #109-116-088, Jackson ImmunoResearch, Dianova, Hamburg
anti-CD3	T-Zell Stimulation	1:1000	anti-Maus-CD3, 1,9 mg/ml, Klon 145-2C11; BD Pharmingen #553057, BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD28	T-Zell Stimulation	1:500	anti-Maus-CD28, 0,5 mg/ml, Klon 37,51, BD Pharmingen #557393, BD Biosciences, Heidelberg
phospho-p44/42 MAPK	Western Blot, primärer Ak	1:2000	Phospho-p44/42 MAPK (E10), Maus IgG, #9106, Cell Signaling, USA
anti-mIgG-HRP	Western Blot, sekundärer Ak	1:5000	Polyclonal goat/rabbit, R1348HRP, Acris Antibodies, USA

## 2.1.8 Rekombinante CCR7-Liganden

In dieser Promotionsarbeit wurden verschiedene Liganden des Chemokinrezeptors CCR7 eingesetzt. Bei den Proteinen CCL21-IgG,  $\Delta 6$ -CCL19-IgG und  $\Delta 4$ -CCL21-IgG handelt es sich um chimäre Fusionsproteine, die im Rahmen bestehender Forschungsarbeiten von der Arbeitsgruppe entwickelt wurden. Sie wurden für diese Arbeit bereits aufgereinigt zur Verfügung gestellt. Dagegen musste CCL19-IgG aufgrund seiner Verwendung im Tierversuch in größeren Mengen für diese Promotionsarbeit hergestellt werden. Die Fusionsproteine waren in PBS gelöst und wurden bei -20 °C aufbewahrt. Als Isotypkontrolle in den Experimenten diente äquimolar eingesetztes Human-IgG.

### 2.1.8.1 Fusionsproteine CCL19-IgG und CCL21-IgG auf Basis der endogenen Chemokine

**CCL19-IgG** (mCCL19-hIgG1) ist ein Protein aus murinem CCL19, das an den Fc Anteil eines humanen IgG1 fusioniert ist. Die Generierung solcher chimären Fusionsproteine wurde

bereits zuvor beschrieben (Kunzendorf et al., 1996; Krautwald et al., 2004; Ziegler et al., 2007). Die relative Molekülmasse beträgt 38,5 kDa in seiner monomeren Form bzw. 77 kDa als Dimer. Letzteres entspricht der üblichen Form des Fusionsproteins, wie es z.B. gelöst in PBS vorliegt. Entsprechend beziehen sich die Konzentrationsangaben dieser Arbeit stets auf das Dimergewicht. Die Menge an CCL19-IgG, die für die Versuche benötigt wurde, wurde zuvor aus dem Kulturüberstand stabil transfizierter CHO Zellen gewonnen und aufgereinigt (siehe 2.2.2 für die Beschreibung der Überstandsgewinnung und Aufreinigung). Die biologische Aktivität von CCL19-IgG wurde mittels Testung der Chemotaxis und der MAP Kinase Aktivität durch CCR7 Stimulation überprüft (Krautwald et al., 2004).

**CCL21-IgG** (mCCL21-hIgG1) ist ein chimäres Fusionsprotein, das sich aus dem murinen CCL21 und dem Fc Anteil des humanen IgG1 zusammensetzt. Die Generierung dieses Proteins wurde schon zuvor beschrieben (Ziegler et al., 2007). Im Vergleich zum CCL19-IgG Fusionsprotein wurde hier die Domäne von CCL19 gegen die von CCL21 ausgetauscht.

#### **2.1.8.2 Fusionsproteine $\Delta 6$ -CCL19-IgG und $\Delta 4$ -CCL21-IgG auf Basis der Chemokin-Analoga**

Die Liganden  $\Delta 6$ -CCL19-IgG ( $\Delta 6$ -mCCL19-hIgG1) und  $\Delta 4$ -CCL21-IgG ( $\Delta 4$ -mCCL21-hIgG1) wurden von der Arbeitsgruppe mit dem Ziel entwickelt, mit diesen Molekülen bestimmte CCR7 vermittelte Signale zu antagonisieren. Als Chemokinrezeptor-Antagonisten sind N-terminal trunke oder modifizierte Chemokinanaloga vorbeschrieben, wobei die Generierung solcher Antagonisten auf die Methode der gerichteten Mutagenese (site-directed mutagenesis) zurückgreift. Hierdurch kann der gezielte Austausch oder die gezielte Entfernung einzelner Nukleinbasen eines Gens bewirkt werden. Zur Generierung der N-terminal trunke Analoga der murinen Chemokine CCL19 und CCL21 wurde die totale zelluläre RNA aus murinen Splenozyten, wie zuvor beschrieben (Ziegler et al., 2007), extrahiert. Daraus wurde die komplementäre DNA (cDNA) mittels RT-PCR unter Verwendung eines RNA PCR Kits (ThermoScript, Invitrogen-Life Technologies, USA) amplifiziert. Über die Wahl der Primer wurde die Addition entsprechender Restriktionsendonukleasenschnittstellen an die generierte cDNA erreicht und so eine direktionale Ligation in die Multiple Cloning Site des Expressionsvektors pcDNA3.1(+) ermöglicht.

Primer für  $\Delta 6$ -CCL19-IgG (Deletion der ersten sechs Aminosäuren von CCL19):

5'-CCAACTCTGGGGATGGACTGCTGCCTGTCT-3' (sense)

3'-GGTTGAGACCCCTACCTGACGACGGACAGA-5' (antisense)

Primer für  $\Delta 4$ -CCL21-IgG (Deletion der ersten vier Aminosäuren von CCL21):

5'-GCATCCCCTGGACCCAAGGCGGTCAGGACTGCTGCCTTAG-3' (sense)

3'-CGTAGGGGACCTGGGTTCCGCCAGTCCTGACGACGGAATC-5' (antisense)

Abbildung 1 verdeutlicht in vereinfachter Form die Unterschiede zwischen den hier verwendeten CCR7-Liganden. Das CC Motiv (bzw. DCCL-Motiv) identifiziert diese CCR7-Liganden als Mitglieder der CC-Chemokine.

(N-Terminus)	
GANDAED <u>CC</u> LKYS...	Nicht trunkierte Form des murinen CCL19-IgG
<u>DCCL</u> KYS...	Trunkierte Form des murinen $\Delta 6$ -CCL19-IgG
SDGGGQD <u>CC</u> LSVT...	Nicht trunkierte Form des murinen CCL21-IgG
GQD <u>CC</u> LSVT...	Trunkierte Form des murinen $\Delta 4$ -CCL21-IgG

**Abb. 1: Unterschiede der eingesetzten CCR7-Liganden bezüglich ihrer Aminosäuresequenz**

Überblick über die Fusionsproteine CCL19-IgG und CCL21-IgG und ihre entsprechenden N-terminal trunkierten Analoga. Abgebildet sind die N-terminalen Aminosäuresequenzen.

### 2.1.9 Software

Die Analyse von zytometrisch gewonnenen Daten (Listmode Dateien) und die Erstellung von Durchflusszytometrie-Histogrammen stützte sich auf die Verwendung von WinMDI 2.9 (J. Trotter, USA).

Diagramme und statistische Tests wurden mithilfe von Excel erstellt (MS Office 2003; Microsoft, USA).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (CellStar, Greiner Bio-One) mit entsprechendem Kulturmedium inkl. Zusätzen (siehe 2.1.5) bei 37 °C unter CO<sub>2</sub>-Begasung (5 %) in abgesättigter Atmosphäre kultiviert. Abhängig von der Proliferationsrate wurden die Zellen einmal bis dreimal pro Woche passagiert.

#### Adhärente Zellen

Zu den adhärennten Zellen zählen B16 und LLC Zellen sowie CHO Zellen, die in serumhaltigem Medium kultiviert wurden. Die adhärennten Zellen wuchsen in 175 cm<sup>2</sup> Gewebekulturflaschen und wurden üblicherweise passagiert, nachdem sie eine fast vollständige Konfluenz erreicht hatten. Hierbei wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung hinzugegeben. Durch Inkubation mit Trypsin/EDTA lösten sich die Zellen vom Boden. Nach ihrer Ablösung wurden die Zellen in Medium inklusive 10 % FBS suspendiert, wodurch das Trypsin inhibiert wurde und die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt werden konnten. Nach Zentrifugation (300 × g, 10 Min., 4 °C) wurde das Pellet in Kulturmedium inkl. Zusätzen aufgenommen und im Verhältnis von 1:10 bis 1:20 (bezogen auf die Ausgangszellzahl) auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

#### Suspensionszellen

HuT-78 zählt zu den Suspensionszelllinien. Die Zellen wurden normalerweise bei einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml passagiert. Für die Passage wurde der Inhalt der Kulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (300 × g, 10 Min., 4 °C) und das Pellet auf neue Gewebekulturflaschen ausgesät. Üblicherweise wurde hierbei eine Ausgangszellzahl von  $3 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt.

### 2.2.2 Produktion von CCL19-IgG

Für die Herstellung von CCL19-IgG wurden CHO Zellen kultiviert, die mit dem CCL19-IgG Konstrukt stabil transfiziert waren und CCL19-IgG in den Überstand exprimierten. Die Transfektion der CHO Zelllinie mit dem CCL19-IgG-Konstrukt wurde zuvor beschrieben (Krautwald et al., 2004). Das von den CHO Zellen exprimierte CCL19-IgG musste somit aus den Zellkulturüberständen isoliert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Nach erfolgter Aufreinigung (s.u.) wurde die Funktionalität des Proteins überprüft, indem folgende Nachweise erbracht wurden: (1) Nachweis des CCL19-IgG Bindungsvermögens an

den CCR7 Rezeptor mittels Durchflusszytometrie, (2) Nachweis der Aktivierung der Signalkaskade nach Liganden-Rezeptor-Bindung, (3) Nachweis der chemotaktischen Wirkung von CCL19-IgG mittels Migrationstest von CCR7<sup>+</sup> Zellen. Diese Untersuchungen zur Spezifität und biologischen Wirksamkeit des Fusionsproteins CCL19-IgG sind Bestandteil der Dissertation von S. Schott (bislang unveröffentlicht).

### **2.2.2.1 CCL19-IgG Überstandsgewinnung mit stabil-transfiziertem CHO Klon**

Für die Tierversuche musste das Fusionsprotein CCL19-IgG vorab im größeren Umfang produziert werden. Zum Beispiel wurde im Falle des Versuchs mit LLC Tumoren ein maximaler Bedarf von ca. 130 mg CCL19-IgG geschätzt (8 Tiere in der Behandlungsgruppe, denen bis zur angenommenen Höchstdauer von 6 Wochen jeweils täglich 390 µg CCL19-IgG appliziert werden). Für die Bereitstellung dieser Menge an CCL19-IgG wurden wöchentlich die Überstände von transfizierten CHO Zellen sukzessiv aufgereinigt und die gewonnenen Proteinmengen bei -20 °C zwischengelagert. Zur Gewährleistung gleicher Bedingungen wurde das Protein der einzelnen Aufreinigungschargen vor dem Tierversuch gepoolt.

Zur Überstandsgewinnung wurden die CHO Zellen in 50 ml ProCHO Medium fassenden Gewebekulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>, Sarstedt) gehalten. In diesem speziellen Medium proliferierten CHO Zellen auch ohne Serumbeimengung in starkem Maße und exprimieren viel Protein in den Überstand (Ziegler et al., 2006). Die Produktionsflaschen wurden jeweils mit etwa  $2,5 \times 10^7$  CHO Zellen neubestückt und für etwa eine Woche bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und durch Zentrifugation (300 × g, 10 Min.) sowie Vakuum-Sterilfiltration (Vacuum filter units, Millipore) von Zellen befreit.

### **2.2.2.2 Aufreinigung von CCL19-IgG**

Die Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose ist eine gängige Methode zur Aufreinigung von Immunglobulinen bzw. Proteinen mit einem Immunglobulin-Anteil. Protein A ist ein bakterielles Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus* mit einer spezifischen Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen der G-Klasse. Protein A weist eine hohe Stabilität im Bereich von pH 2 bis 10 auf. Die Bindungsaffinität zum Fc-Teil ist vom pH-Wert abhängig. Nach Bindung an den IgG-Anteil im neutralen oder leicht alkalischen Milieu lassen sich die zu isolierenden Proteine im sauren Bereich eluieren.

Der Kulturüberstand, der das sezernierte CCL19-IgG enthielt, wurde unter Verwendung von Protein A-Sepharose Partikeln (Amersham Biosciences) aufgereinigt. Ein solches Partikel besteht aus einem Sepharose-Anteil, an dem Protein A kovalent gekoppelt ist. Die Protein

A-Sepharose Partikel wurden dem Kulturüberstand zugegeben. Anschließend konnte dann aufgrund der Bindung der Partikel an den Fc-Teil des CCL19-IgG das Gemisch durch Filtration aufgetrennt werden. Das Fusionsprotein blieb, an die Partikel reversibel gebunden, im Filter hängen. Die Elution der gebundenen Fusionsproteine erfolgte anschließend durch Verschiebung des pH-Werts in den sauren Bereich. In einem weiteren Schritt wurde die saure Lösung, in der nun das Fusionsprotein gelöst war, mittels einer PD-10 Desalting Säule (Ionenaustauscher) umgepuffert, so dass letztendlich das aufgereinigte Fusionsprotein in PBS gelöst war.

Die folgenden Schritte waren im Einzelnen für die Isolierung des Fusionsproteins nötig. Es wurde etwa 1 Liter Überstand für eine Proteinaufreinigungscharge gesammelt. Der das Fusionsprotein enthaltende Überstand wurde auf pH 7,4 eingestellt und mit 0,5 g/l Protein A-Sepharose Partikel für eine Dauer von 16 Std. bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Mithilfe einer Schlauchpumpe wurde das Gemisch anschließend in eine Filtersäule (Econo-Column, Bio-Rad Laboratories) überführt, wobei die Protein A-Sepharose Partikel mit gebundenen CCL19-IgG auf der Säule zurückgehalten wurden. Zur Trennung von CCL19-IgG vom Protein A wurden die Fusionsproteine insgesamt dreimal mit je 4,5 ml 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,4) eluiert, wobei jedes Mal sofort 500 µl 2M Tris-HCl (pH 8) (d.h. final 0,2 M) zur raschen pH Neutralisierung zum Eluat gegeben wurde.

Das gewonnene Eluat wurde nun sukzessiv aufkonzentriert. Die Lösung wurde in ein Amicon-Filtrerröhrchen (Millipore) überführt, das zuvor mit PBS gespült wurde, und schließlich für 7 Min. bei  $2500 \times g$  und 4 °C zentrifugiert. Durch fünfmalige Wiederholung dieses Vorgangs wurden so 15 ml Proteinlösung auf schließlich ca. 2,5 ml eingengt.

Die Entsalzung/Umpufferung mittels PD-10 Säule (GE Healthcare) war der nächste Schritt. Vor Gebrauch musste die PD-10 Säule äquilibriert werden, indem sie dreimal mit 6 ml PBS durchgespült wurde. Danach konnte die Proteinlösung auf die PD-10 Säule gegeben werden. Der Durchfluss wurde verworfen, während sich nun das Fusionsprotein auf der PD-10 Säule befand. Dieses konnte dann mit 3,5 ml PBS eluiert und als Durchfluss aufgefangen werden. Als letztes wurde die CCL19-IgG Lösung per Spritzenfilter steril filtriert und eine Konzentrationsbestimmung vorgenommen.

### **2.2.2.3 Messung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad Laboratories) nach Bradford (1976) bestimmt. Diese Methode nutzt die Eigenschaft des Coomassie-Farb-

stoffes, mit Proteinen Komplexe zu bilden, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Somit ändert sich die Farbe der Coomassie enthaltenen Lösungen entsprechend der vorliegenden Proteinkonzentrationen. Die Absorption wurde spektrometrisch (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration gemäß der Standardkurve ermittelt.

### **2.2.3 Tiermodelle**

#### **2.2.3.1 Injektion von Tumoren**

Zur Implantation der Tumore wurden den Mäusen murine Tumorzellen entweder intraperitoneal (i.p.) oder subkutan (s.c.) injiziert. Die Tiere wurden vorher im Bereich der geplanten Injektionsstelle rasiert und mit Ethanol (70 %) desinfiziert. Bei allen Tieren eines Experiments wurde versucht, die Injektion an der gleichen Körperstelle zu setzen (z.B. paramedian zur Linea alba im Bereich der linken Flanke). Es wurde eine Menge von 200 µl für i.p. Injektionen und 100 µl für s.c. Injektionen eingesetzt. Die eingesetzte Anzahl von B16 und LLC Zellen variierte und ist im Ergebnisteil angegeben. Zur Inokulation wurden die Zellen in PBS suspendiert und in eine Insulinspritze (Omnican 40, B Braun) aufgezogen. Für die subkutane Applikation wurde die Haut der Maus an der geplanten Einstichstelle angehoben, die Nadel vorsichtig platziert und die Zellen injiziert. Dabei wurde die Maus von einer zusätzlichen Person fixiert.

#### **2.2.3.2 Bestimmung der Tumorgröße**

Zur Darstellung des Tumorwachstum wurde die Tumorfläche als Vergleichsgröße herangezogen, da sich die Tiefe des Tumors nicht immer präzise ermitteln ließ. Mithilfe eines digitalen Messschiebers wurde der größte Durchmesser (Breite) des Tumors und der Durchmesser (Höhe) senkrecht dazu bestimmt. Die Tumorfläche wurde vereinfacht gemäß der Ellipsenformel ( $\text{Fläche} = \pi/4 \text{ Breite} \times \text{Höhe}$ ) berechnet. Es wurde der Student's t Test (zweiseitig) zur Bewertung des Mittelwertunterschieds herangezogen. Das erreichte Signifikanzniveau wurde im Balkendiagramm mitabgebildet (\* für  $p < 0,05$ ).

#### **2.2.3.3 Biolumineszenz-Imaging**

Eine Möglichkeit für die nicht-invasive Untersuchung von Tumorwachstum stellt das Biolumineszenz-Imaging dar. Diese Methode nutzt die Lichtemission, die nach Zugabe des Substrates Luciferin von dem Enzym Luciferase der Firefly (Leuchtkäfer *Photinus pyralis*) unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff produziert wird. Die Anzahl der emittierten Lichtquanten

ist unter bestimmten Bedingungen proportional zur Anzahl der Luciferasemoleküle. Das abgegebene Licht kann mithilfe einer CCD (charge-coupled device) Kamera sichtbar gemacht werden. Mit dieser Technik ist es möglich, Zellen, welche mit dem Luciferase Gen transfiziert wurden, im Tierorganismus mittels Injektion von Luciferin nachzuweisen. Biolumineszenz Imaging wurde bereits in mehreren Studien erfolgreich zur Verlaufsbeobachtung des Wachstums verschiedener Tumore in Versuchstieren verwendet (u.a. Edinger et al., 1999; Edinger et al., 2002; Craft et al., 2005).

Für die Biolumineszenz-Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit wurde die kommerziell erhältliche B16-F10-luc-G5 Tumormlinie (Bioware™, Xenogen/Caliper, USA) eingesetzt, die bereits stabil mit dem Firefly Luciferase Gen transfiziert war. So sollte der Effekt der i.p. versus s.c. Injektion von Tumorzellen in Mäusen veranschaulicht werden. Die Luciferin-Stamm-lösung betrug 5 mg/ml und musste bis zur Verwendung unter Lichtschutz gelagert werden. In Vorbereitung auf die Aufnahmen wurden die Mäuse zunächst per i.p. Anästhesie narkotisiert. Dafür wurden 50 µl eines Gemisches aus Ketamin (10 mg/ml) und Xylazin (1 mg/ml) pro Maus gespritzt. Als Substrat wurden 100 µl Luciferin-Lösung (0,5 mg Luciferin) jedem Tier i.p. injiziert. Nach kurzer Resorptionszeit konnte das Tier in die Dunkelkammer gelegt und mit den Aufnahmen mittels der CCD Kamera (NightOWL, Berthold Technologies) begonnen werden. Es wurde zunächst eine Übersichtsaufnahme der Maus bei 0,7 s Belichtungszeit angefertigt, die dann mit der folgenden Biolumineszenz-Aufnahme überlagert werden konnte. Die Biolumineszenz-Aufnahme wurde mit einer Belichtungszeit von 2 Min. durchgeführt.

#### **2.2.4 Durchflusszytometrische Testung des Bindungsvermögens an CCR7**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das die Charakterisierung einer Zellpopulation aufgrund ihrer Lichtstreuung und Fluoreszenz ermöglicht. Mithilfe des Durchflusszytometers Coulter Epics XL (Beckmann Coulter) wurden folgende Analysen durchgeführt:

- Überprüfung erfolgter Proteinaufreinigungen des Fusionsproteins hinsichtlich des Bindungsvermögens an CCR7<sup>+</sup> Zellen
- Überprüfung von eingesetzten Tumorzellen hinsichtlich ihres Bindungsvermögens von CCL19-IgG (CCR7-Expression)
- Vergleich des Bindungsvermögens von verschiedenen rekombinanten CCR7-Liganden an CCR7<sup>+</sup> Zellen

#### 2.2.4.1 Prinzip der zytometrischen Detektion über Ligand-CCR7 Bindung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie vor allem für den Nachweis der Bindung von verschiedenen Liganden an CCR7 eingesetzt. Als Grundlage für die Detektion dieser Bindung dienten CCR7<sup>+</sup> Zellen, wie zum Beispiel primäre T-Zellen. Dem Mechanismus der Ligand-Rezeptorbindung folgend konnten die eingesetzten Fusionsproteine bestehend aus einem CCL19- oder CCL21-Anteil an CCR7 auf den Zelloberflächen binden. Anschließend konnten mithilfe eines PE (Phycoerythrin)-fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen hIgG (anti-hIgG-PE) die Rezeptor-Ligand-Bindungen in der Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden. Hierdurch fluoreszierten die CCR7<sup>+</sup> Zellen. Dieses Signal konnte mittels eines Durchflusszytometers im Fluoreszenzkanal FL2 LOG (560 – 590 nm) detektiert werden. FL2 ist der Sensor für Orange fluoreszenzen, wobei die Signale von Fluoreszenzen mit logarithmischer Verstärkung aufgezeichnet werden. Als Vergleich dienten die unmarkierten Zellen der Vehikel-Kontrollbedingung und der Isotypkontrolle mit Human-IgG.

#### 2.2.4.2 Probenvorbereitung

Für jede Untersuchung wurden drei Versuchsansätze, nämlich a) CCR7-Ligand, b) Vehikel, c) Isotypkontrolle, benötigt. Dafür wurden jeweils  $4 \times 10^5$  Zellen in die Durchflusszytometer-Röhrchen gegeben und zweimal in PBS gewaschen (Zentrifugation bei  $300 \times g$ , 4 °C). Dann wurden 100 µl einer Proteinlösung (Konzentration 20 µg/ml) eines CCR7-Liganden auf das Zellpellet gegeben. Für die Kontrollen wurde entsprechend 100 µl Vehikellösung (PBS) bzw. 100 µl Human-IgG-Lösung (Konzentration 20 µg/ml) eingesetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation der Röhrchen auf Eis wurde zweimal mit je 2 ml eiskaltem Puffer (PBS + 5 % FBS) gewaschen. Nun folgte die Zugabe des PE-markierten Sekundärantikörpers (Ziege anti-hIgG-PE) in einer Verdünnung von 1:100 in 100 µl eiskaltem Puffer. Es schloss sich abermals eine dreißigminütige Inkubation aller Röhrchen auf Eis an, diesmal unter Abdunklung. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem Puffer (PBS + 5 % FBS) gewaschen (Zentrifugation bei  $300 \times g$ , 4 °C). Als letzten Schritt wurden die Zellen in 500 µl Puffer (PBS + 5 % FBS) resuspendiert und per Durchflusszytometer analysiert. Durch Gate-Setzung auf die Hauptzellpopulation im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht flossen in erster Linie die Messdaten vitaler Zellen in die Ergebnisdarstellung ein. In der Regel wurden so die Fluoreszenzsignale von  $1,5 \times 10^4$  vitalen Zellen aufgenommen. Die Listmode-Dateien, die alle zytometrisch gemessenen Daten einer Probe enthalten, wurden mittels WinMDI 2.9 zur Erstellung der Histogramme bearbeitet.

## 2.2.5 Proliferationsassay

### 2.2.5.1 Prinzip des BrdU-Proliferationsassays

Der BrdU-Proliferationsassay ermöglicht es, *in vitro* das Zellwachstum zu quantifizieren. Der Test wurde mittels eines Kits (Chemilumineszenz-Immunoassay Kit, Roche) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer Markierung aller im Testzeitraum neu gebildeten Zellen. Dazu wird ein Marker in Form des Pyrimidinanalogons BrdU (Bromdesoxyuridin) dem Zellkulturmedium zugefügt und zwischen 2 und 24 Stunden im Medium belassen. Während dieser Dauer wird BrdU an Stelle von Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut. Zur Quantifizierung des BrdU-Einbaus dient ein kolorimetrischer ELISA-Immunoassay, der mittels Luminometer ausgewertet wird.

### 2.2.5.2 Probenvorbereitung

Für die Proliferationsanalyse mussten im ersten Schritt die Zellen auf einer 96-Loch-Platte dem Versuchsaufbau entsprechend ausplattiert werden. Dafür wurden die Zellen mithilfe ihres Kulturmediums auf die benötigte Zellzahl eingestellt, so dass die Löcher mit einer konstanten Anzahl von Zellen bestückt werden konnten. Die Anzahl richtete sich nach der Proliferationsrate und der Zellgröße: in der Regel bestand ein Probenansatz aus  $1 \times 10^4$  Tumorzellen (schnell proliferierende, relativ große B16 oder LLC Zellen) oder  $1,5 \times 10^5$  nativen Zellen (langsam proliferierende, kleine Splenozyten oder T-Zellen). Die Versuchsplatte wurde dafür mit jeweils 100  $\mu$ l Zelllösung inklusive Medium und Versuchssubstanz (z.B. CCL19-IgG) pro Loch bestückt. Anschließend wurden die Zellen für etwa 1,5 Tage (bzw. wie im Ergebnisabschnitt angegeben) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.5.3 Messung der Proliferation

Die nächsten Schritte folgten gemäß den Vorgaben des eingesetzten Proliferationskits (Roche). Zunächst wurde den Zellen BrdU-Lösung (BrdU-Reagenz verdünnt mit Kulturmedium) in einer finalen Konzentration von 100  $\mu$ M hinzugegeben. Dem schloss sich eine weitere Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zu 24 Stunden an. In dieser Zeit konnte BrdU in die DNA wachsender Zellen eingebaut werden.

Nach Ende der Markierungszeit wurde das Ausmaß des BrdU-Einbaus ermittelt. Dafür musste die Platte vom Zellkulturmedium befreit und die Zellen denaturiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Platte zentrifugiert (10 Min. bei  $300 \times g$ ), so dass die Zellen am Plattenboden haften blieben, während der Überstand von der Platte abgeschlagen werden konnte. Zusätzlich wurden die Platten für ca. 1 Std. bei 60 °C ohne Deckel im Wärmeschrank

getrocknet. Auf die trockene Platte wurde dann 100 µl „FixDenat-Lösung“ pro Loch hinzugegeben und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch wurden die Zellen auf dem Plattenboden fixiert, und gleichzeitig wurde ihre DNA denaturiert, so dass die DNA für den gegen BrdU gerichteten, Peroxidase gekoppelten, Antikörper (anti-BrdU-POD) zugänglich war. Die anti-BrdU-POD enthaltende Lösung wurde in einer 1:100 Verdünnung mit „Antibody Dilution Solution“ angesetzt und davon jeweils 100 µl mithilfe einer 8-Kanal-Pipette den Proben hinzugegeben. Die denaturierten Zellen wurden nun für 30 Min. mit dem Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert, so dass anti-BrdU-POD an BrdU binden konnte. Danach wurde die Platte abgeschlagen und mit Waschlösung des Kits dreimal gewaschen. Abschließend wurde die Menge des eingebauten BrdU durch eine nachgeschaltete Peroxidase-Färbereaktion mittels ELISA-Plattenleser (Victor light 1420, Perkin Elmer) bestimmt. Dafür wurden jeweils 100 µl einer zuvor angesetzten Peroxidase-Substrat-Lösung der Platte hinzugegeben. Die Peroxidase-Substrat-Reaktion wurde zügig im ELISA-Plattenleser gemessen. Die Intensität der Lumineszenz, die durch diese chemische Reaktion erzeugt wird, wird in relativen Lumineszenzeinheiten (relative luminescence units, rlu; hier gemessen über 100 ms) ausgedrückt. Laut Herstellerangaben korrelieren diese rlu-Werte über einen größeren Bereich in linearer Weise mit der Proliferation der Zellen während der Markierungszeit.

#### **2.2.5.4 Auswertung des Proliferationsassays**

Für jede Zelllinie wurden neben der Probe mit der Versuchssubstanz immer auch zwei Kontrollproben zeitgleich pipettiert. Human-IgG stellte die Isotypkontrolle dar. Als Negativkontrolle diente PBS, die Vehikel-Substanz für das Fusionsprotein. Da immer eine Vierfachbestimmung durchgeführt wurde, war die Berechnung von Student's-t Tests (zweiseitig) zur Bewertung des Mittelwertunterschieds gegenüber IgG-Kontrolle möglich. Das erreichte Signifikanzniveau wurde im Balkendiagramm mitabgebildet (\*\* für  $p < 0,01$ ; \* für  $p < 0,05$ ).

### **2.2.6 Primäre T-Zellen in vitro**

#### **2.2.6.1 Isolierung von primären T-Zellen aus Mäusen**

Die Isolierung von primären murinen T-Zellen erfolgt mittels magnetischer Zellseparierung durch MACS-Säulen (Magnetic Activated Cell Sorting). Nach diesem Prinzip werden zunächst Oberflächenmoleküle, die auf den anzureichernden Zellen exprimiert werden, spezifisch mit Antikörpern markiert. An diese Antikörper werden Magnetpartikel, sogenannte MicroBeads, gekoppelt. Diese etwa 50 nm großen magnetischen Kügelchen bestehen aus einer Zuckerhülle mit darin eingeschlossenem Eisenoxid. Beim Durchfluss eines Zellgemis-

ches durch eine Metallmatrix-Säule, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist, lassen sich Zellen, die über Antikörper-MicroBeads-Konjugate markiert wurden, zurückhalten (Miltenyi et al., 1990). Somit lassen sich mit diesem Separationsverfahren Zellpopulationen unter sterilen Bedingungen schonend anreichern bzw. abtrennen. Mithilfe eines Pan T cell Kits (Miltenyi Biotec) können so primäre T-Zellen aus Zellgemischen isoliert werden. Beim Pan T cell Kit stellen die unmarkierten Zellen die Zielzellen dar; es wird also eine negative Selektion mittels MACS durchgeführt.

Zuerst wurden Milz und sichtbare Lymphknoten den toten Mäusen entnommen und per Stempel einer Spritze zerpresst. Die Suspension wurde durch ein Zellsieb gegeben und in Puffer (PBS + 0,5 % FBS) gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von ACK Lysepuffer, durch dessen Hypoosmolarität die Erythrozyten lysiert wurden. Anschließend wurden die Zellen mindestens zweimal in MACS-Puffer gewaschen und dann gezählt. Die Kapazität der MACS LS-Säule (Miltenyi Biotec) beträgt ungefähr  $10^8$  markierte Zellen. Die Inkubation der Zellen erfolgte entsprechend dem Kit-Protokoll mit dem Biotin-Antikörper-Gemisch in Abhängigkeit von der vorliegenden Zellzahl (40  $\mu$ l MACS-Puffer + 10  $\mu$ l Biotin-Antikörper-Gemisch je  $10^7$  Zellen) über 10 Min. auf Eis. Dann folgte die Inkubation mit den Anti-Biotin-MicroBeads (30  $\mu$ l MACS-Puffer + 20  $\mu$ l Anti-Biotin-MicroBeads je  $10^7$  Zellen) auf Eis für 15 Min.. Die Zellen wurden sodann in MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei  $300 \times g$ , 10 Min., 4 °C) und in MACS-Puffer (500  $\mu$ l je  $10^8$  Zellen) resuspendiert. Die MACS-Säule wurde in den Magneten gestellt, die Zelllösung in die Säule gegeben und der Durchfluss, der die T-Zellen enthält, aufgefangen. Diese primären T-Zellen wurden gewaschen, gezählt und schließlich in Kulturmedium aufgenommen, um sie anschließend in verschiedenen Assays (vgl. 2.2.5 für BrdU-Proliferationsassay, 2.2.7 für Chemotaxisassay, 2.2.8 für  $Ca^{2+}$ -Flux, 2.2.9 für Western Blot-Analyse) einzusetzen.

#### **ACK Lysepuffer**

0,15 M	Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)
1 mM	Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )
0.1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
800 ml	Aqua dest.

Lösung mit 1N HCl auf pH 7,3 einstellen.

#### **MACS-Puffer**

0,5 %	BSA
2 mM	EDTA in PBS

### 2.2.6.2 Primäre T-Zellen im Proliferationsassay

Durch eine Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern können primäre murine T-Zellen zur in vitro-Proliferation angeregt werden. Dies war für den Einsatz von primären T-Zellen in den BrdU-Proliferationsassays notwendig. Hierfür wurden 96-Loch-Platten mit Rundboden zunächst mit dem anti-CD3 Antikörper vorgebunden. Der anti-CD3 Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:1000 (finale Konzentration 2 µg/ml) in PBS gelöst. Es wurden jeweils 100 µl dieser Lösung in die Vertiefungen der Platte gegeben und über mindestens 4 Std. bei 37 °C inkubiert sowie anschließend steril abpipettiert. Als weiterer Antikörper musste anti-CD28 zur Kostimulation der T-Zellen eingesetzt werden. Dieser Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 (finale Konzentration 1 µg/ml) direkt ins Kulturmedium des Ansatzes gegeben. Zum Ausplattieren wurde das Zellpellet der primären T-Zellen in dieses Kulturmedium aufgenommen und die Zellsuspension auf  $1 \times 10^6$  pro ml eingestellt. Daraus wurden 100 µl Zelllösung ( $1 \times 10^5$  T-Zellen) je Loch pipettiert. Die Zellen wurden daraufhin bei 37 °C über drei Tage inkubiert. BrdU wurde im Rahmen des BrdU-Proliferationsassays (siehe 2.2.5) hinzugegeben.

### 2.2.7 Chemotaxis Zellmigrationstest

Als Grundlage für die Quantifizierung der Migration entlang eines Chemokingradienten diente die Zwei-Kammer-Technik nach Boyden (1962), bei der zwei vertikal angeordnete Kammern durch eine Filtermembran voneinander getrennt sind. In die obere Kammer wird eine Zellsuspension gegeben, während die Versuchslösung mit den chemotaktisch aktiven Molekülen in die untere Kammer gefüllt wird. Die Zellen wandern während der mehrstündigen Inkubationszeit in unterschiedlichem Ausmaß in die untere Kammer, so dass die Stärke der Chemotaxis quantifiziert werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine 24-Loch-Zellmigrationsplatte (Transwell, Corning Costar) verwendet, was die parallele Beobachtung von mehreren Chemotaxinen in unterschiedlichen Konzentrationen ermöglichte. Getestet wurde mit primären T-Zellen, die auf den eingesetzten Lockstoff reagieren konnten. Es wurde eine Porengröße von 5 µm gewählt, da sich die Porengröße der Membran an der Größe der mobilen Zellen (T-Zellen) orientierte. Im ersten Schritt musste die 24-Loch-Zellmigrationsplatte mit RPMI und 1 % BSA bei 37 °C eine Stunde lang vorinkubiert werden. Als Versuchsansatz wurden je  $1 \times 10^6$  murine T-Zellen in 100 µl Medium aufgenommen und in die obere Kammer gefüllt. In die untere Kammer wurden jeweils 600 µl Medium mit dem enthaltenen Chemotaxin in unterschiedlichen Konzentrationen gegeben. Als Positivkontrolle (bzw. hypothetisches Maximum) wurden 100 µl

Zelllösung direkt in eine untere Kammer pipettiert und 500  $\mu$ l Medium hinzugegeben, so dass dies einem Ergebnis entsprach, dem zufolge alle Zellen migriert wären. Für die Dauer der Migration wurden die Zellen für 3 bis 5 Std. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium aus den oberen Kammern abgenommen sowie die Unterseite der Membran einmal mit 400  $\mu$ l PBS in die untere Kammer abgespült, so dass sich eine Gesamtmenge von 1 ml pro Probe ergab. Das Ermitteln des Anteils der Zellen, die in die untere Kammer migriert waren, erfolgte mittels Durchflusszytometer (Zählung der Zellen über 1 Min. bei mittlerer Flusstärke). Die Stärke der Migration konnte so als Prozentwert der gewanderten Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle angegeben werden.

### **2.2.8 Messung von $\text{Ca}^{2+}$ -Flux**

Bindet ein Chemokin als Ligand an seinen Chemokinrezeptor, löst dies einen intrazellulären Anstieg von Kalziumionen aus. Die Änderung des intrazellulären Kalziumspiegels lässt sich durch FURA 2-AM messen. FURA 2-AM ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit Kalziumionen Chelatkomplexe bildet.

Die FURA 2-AM Färbung erfolgte mithilfe von primären murinen T-Zellen. Es wurden  $10^7$  Zellen pro Färbeansatz gewählt. Diese Zellmenge wurde zunächst zweimal mit PBS gewaschen ( $300 \times g$ , 10 Min., 4 °C) und das Zellpellet dann in 1800  $\mu$ l Hanks' BSS Puffer aufgenommen. Für die Färbung wurden 18  $\mu$ l FURA 2-AM (finale Konzentration 10  $\mu$ M) zur Zellsuspension gegeben und diese für 30 Min. bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen ( $300 \times g$ , 10 Min., 4 °C) und das Pellet wurde dann in 1 ml PBS resuspendiert. Für die Kalziumionen-Messung im Mikrotiterplatten-Lesegerät wurden jeweils 90  $\mu$ l Zellsuspension, also  $9 \times 10^5$  Zellen, in die Vertiefungen einer schwarzen undurchsichtigen 96-Loch-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) pipettiert. Die experimentellen Stimuli wurden per Zugabe von jeweils 10  $\mu$ l Lösung eines CCR7-Liganden (finale Konzentration 1  $\mu$ M bzw. ca. 80  $\mu$ g/ml) bzw. Kontrolllösungen gesetzt. Als Negativkontrolle dienten 10  $\mu$ l PBS, als Positivkontrolle 10  $\mu$ l Ionomycin Lösung (6,6  $\mu$ M). Ionomycin ist ein Kalzium-Ionophor, das den Kalziumspiegel in Zellen unspezifisch erhöht. Die Messung erfolgte im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite 200 PRO, Tecan, Program Tecan i-Control, Exzitationswellenlänge 340 nm, Emissionswellenlänge 510 nm) bei 37 °C.

#### **FURA 2-Stammlösung (1 mM)**

50 $\mu$ g	FURA 2-AM
50 $\mu$ l	DMSO

## 2.2.9 Proteinnachweis über SDS-PAGE und Western Blot

### 2.2.9.1 Herstellung von Zelllysaten

Die primären T-Zellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei  $300 \times g$ , 10 Min.,  $4^\circ C$ ), um das proteinhaltige Medium weitgehend zu entfernen. Das Zellpellet wurde dann in Lysepuffer inkl. Proteaseinhibitoren (maximal 1 ml Puffer pro  $10^7$  Zellen) aufgenommen, resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Lyse wurde das Reaktionsgefäß für 5 bis 10 Min. im Schüttelinkubator bei  $4^\circ C$  geschüttelt und gewirbelt. Anschließend wurde das Lysat bei  $20000 \times g$  für 10 Min. bei  $4^\circ C$  zentrifugiert (Centrifuge 5417 R, Eppendorf). Daraufhin wurde die Proteinkonzentration aus dem Überstand nach Bradford bestimmt (siehe 2.2.2.3), und die Probe durch Verdünnung mit Lysepuffer auf 1,25 mg/ml eingestellt. Dieses Gemisch wurde mit 5x Laemmli-Probenpuffer unter Zugabe von 5 % 2-Mercaptoethanol für 5 Min. bei  $95^\circ C$  auf dem temperierbaren Schüttelinkubator (Thermomixer Comfort, Eppendorf) denaturiert. Davon wurden 20  $\mu l$  pro Geltasche pipettiert, also 20  $\mu g$  Protein je Spur aufgetragen (siehe 2.2.9.2). Alternativ konnten die Zelllysate bis zur Verwendung bei  $-20^\circ C$  gelagert werden.

#### Lysepuffer

10 mM	Tris
50 mM	NaCl
30 mM	Natriumpyrophosphat ( $Na_4P_2O_7$ )
50 mM	NaF
1 %	Triton X-100 (pH 7.1)

#### Proteaseinhibitoren-Zugabe zum Lysepuffer

0,1 mM	PMSF
1,5 $\mu M$	Aprotinin
0,1 mM	Orthovanadat

#### 5x Laemmli-Probenpuffer (ohne 2-Mercaptoethanol)

7,81 ml	2M Tris (pH 6,8)
17,19 ml	20 % SDS
25 ml	Glycerin
6,25 mg	Bromphenolblau

### 2.2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dafür wird SDS zu den Proteinen im Überschuss bei der Vorbereitung der

Proben gegeben. Durch Erhitzen und SDS-Zugabe werden nicht-kovalente Wechselwirkungen der nativen Proteine zerstört und die Eigenladungen überdeckt, so dass alle Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Zusätzlich werden die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine durch Mercaptoethanol im Probenpuffer (Laemmli, 1970) reduziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt, bei der sich der pH-Wert und die Acrylamid-Konzentrationen von Sammel- und Trenngel unterscheiden. Zunächst wurde die Trenngellösung zwischen zwei, im Minigel-Caster vertikal befestigte, Glasplatten gegossen. Zur Glättung wurde die Trenngellösung mit etwas Flüssigkeit (0,2 % SDS in Aqua dest.) überschichtet, die nach Polymerisierung des Gels wieder abgenommen wurde. Nun wurde die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Nach Herausziehen des Probenkamms konnten die aus den Zellysaten gewonnenen und vorbereiteten (s.o.) Proteinproben in die entstandenen Geltaschen pipettiert werden. Außerdem wurde regelhaft in einer Gelspur ein Marker (in kDa, Proteinstandard) mitgeführt. Zunächst wurde eine Stromstärke von 20 mA pro Gel angelegt, solange sich die Proben noch im Sammelgel befanden. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 40 mA pro Gel.

**Trenngel (10 ml) für 12 %iges Polyacrylamidgel    4x Trenngelpuffer, pH 8,8**

4,0 ml	30 % Bisacrylamid	10 ml	20 % SDS
2,5 ml	4x Trenngelpuffer	115 ml	Aqua dest.
3,5 ml	Aqua dest.	375 ml	2M Tris-HCl
100 µl	10 % APS (w/v in Aqua dest.)		
10 µl	TEMED		

**Sammelgel (4 ml) für 3 %iges Polyacrylamidgel    4x Sammelgelpuffer, pH 6,8**

0,4 ml	30 % Bisacrylamid	10 ml	20 % SDS
1 ml	4x Sammelgelpuffer, pH 6,8	365 ml	Aqua dest.
2,6 ml	Aqua dest.	125 ml	2M Tris-HCl
40 µl	10 % APS		
8 µl	TEMED		

**1x Laufpuffer mit SDS**

3,02 g	Tris
14,42 g	Glycin
1000 ml	H <sub>2</sub> O
2,5 ml	20 % SDS

### 2.2.9.3 Western Blot-Analyse

Der Western Blot ermöglicht einen Nachweis von Proteinen in einer Trägermatrix wie der SDS-PAGE. Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch im Semidry-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Beim Semidry-Blotting sind die Elektroden im direkten Kontakt mit einem „Sandwich“ aus Chromatographie-Papier/Gel/Membran/Chromatographie-Papier, um so einen schnellen, effizienten Transfer zu erzielen. Die Proteine wandern, dem senkrecht gerichteten elektrischen Feld folgend, aus dem Polyacrylamidgel zur Membran (Hybond ECL Membran, Amersham). Alle Bestandteile wurden zuvor mit Transferpuffer möglichst luftblasenfrei benetzt. Der Transfer wurde über eine Stunde bei 70 mA pro Blot in einer dafür vorgesehenen Blot-Kammer (Semi Phor, Hoefer Pharmacia Biotech) durchgeführt.

Nach dem Blotting wurde die Membran zunächst zum Waschen in TBS gelegt und dann zum Blocken über eine Stunde in Waschpuffer mit Magermilchpulver (5 % w/v) geschwenkt, wodurch unspezifische Bindungsstellen abgesättigt wurden. Die nächsten Schritte der Immunodetektion erfolgten gemäß den Herstellerangaben für die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper. Wenn nicht anders vorgegeben, wurde die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung entsprechend der Herstellerempfehlung) in Waschpuffer mit BSA (5 % w/v) in Bewegung bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Nach fünfmaligem fünfminütigen Waschen bei Raumtemperatur wurde die Membran mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Verdünnung entsprechend der Herstellerempfehlung) bei Raumtemperatur über 1 Std. in Waschpuffer mit BSA (5 % w/v) geschwenkt und danach fünfmal jeweils 5 Min. in Waschpuffer gewaschen.

Der Peroxidasenachweis wurde mit einem Chemilumineszenz-Detektionskit (ECL-System, Amersham) entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wird das in einer Reaktionslösung enthaltene Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch das Enzym Peroxidase oxidiert. Die Oxidation versetzt das Luminol in einen angeregten Zustand, bei dessen Verlassen auch Energie in Form von Licht freigesetzt wird. Auf einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm MP) kann dieses per Entwicklungsmaschine (Curix 60, Agfa) sichtbar gemacht werden. Der Röntgenfilm wurde zuvor zusammen mit der Membran für etwa 5 Min. in eine Röntgenkassette gelegt.

Um sicherzustellen, dass sich in etwa die gleiche Proteinmenge je Probe auf der Membran befand, wurde die Membran mit Ponceau S reversibel gefärbt. Dazu wurde die Membran für ca. 1 Min. in die Ponceau S-Lösung gelegt und mit Aqua dest. entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar waren.

**Transfer-Puffer**

0,3 % (w/v) Tris  
1,4 % (w/v) Glycin  
in Aqua dest.

**10x TBS (Tris-buffered saline), pH 7,6**

200 mM Tris  
1,37 M NaCl  
in Aqua dest.

**Waschpuffer (TBS-Tween)**

0,1 % Tween 20 in TBS

**Ponceau S-Lösung**

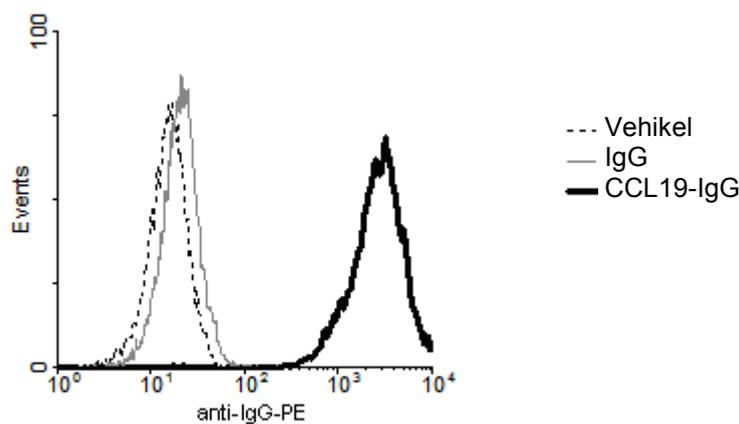
0,1 % (w/v) Ponceau S  
5 % Essigsäure

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung von B16 und LLC Tumoren in vitro

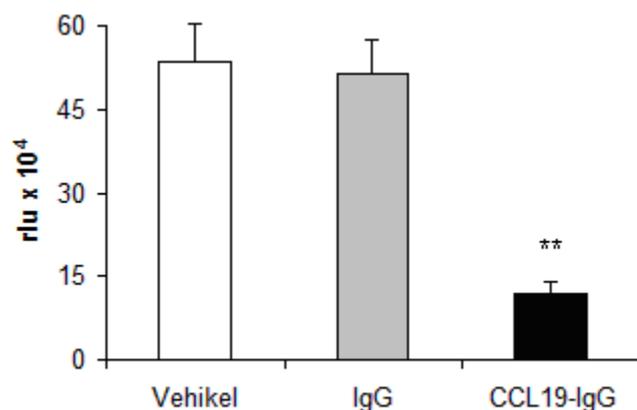
##### 3.1.1 B16 Tumorzellen

Wie die zytometrische Analyse in Abbildung 2 zeigt, interagieren B16 Zellen deutlich mit dem Fusionsprotein CCL19-IgG per Ligand-Rezeptorbindung; sie weisen also eine hohe CCR7 Expression auf. Zusätzlich lässt sich ihr Wachstum durch CCL19-IgG signifikant im Proliferationsassay inhibieren (Abb. 3). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die B16 Tumore als ein geeignetes Modell für eine CCL19-IgG-Applikation im Tierversuch angesehen.



**Abb.2: Nachweis der CCR7-Expression von B16 Zellen mittels CCL19-IgG**

Für die zytometrische Analyse wurden  $4 \times 10^5$  B16 Zellen mit  $2 \mu\text{g}$  [ $20 \mu\text{g/ml}$ ] CCL19-IgG oder IgG bzw. mit  $100 \mu\text{l}$  Vehikel inkubiert und anschließend mit anti-IgG-PE (1:100) gefärbt. Im PE (FL2 LOG) Kanal zeigte sich ein deutlicher Shift nur nach Inkubation mit CCL19-IgG. CCL19-IgG bindet über seine CCL19 Domäne und nicht über seinen Fc Anteil an die CCR7-exprimierenden B16 Zellen, da IgG allein nicht gebunden wird.



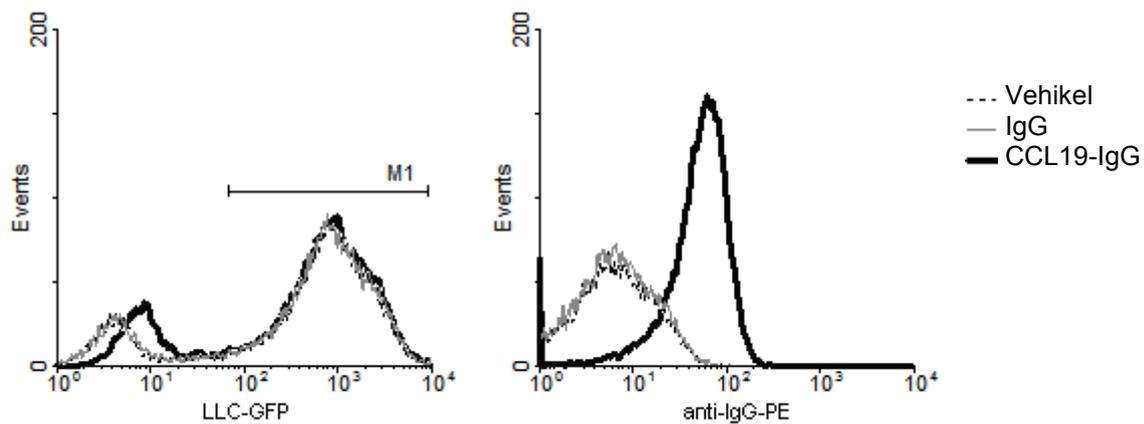
**Abb.3: CCL19-IgG vermittelte Proliferationshemmung bei B16 Zellen**

Für den BrdU-Proliferationsassay wurden jeweils  $1 \times 10^4$  B16 Zellen mit Vehikel, IgG ( $200 \mu\text{g/ml}$ ) oder CCL19-IgG ( $200 \mu\text{g/ml}$ ) über 48 Std. inkubiert, davon wurde über 12 Std. mit BrdU markiert. Eingesetzt wurden vier Proben pro Bedingung.

Die Zugabe von CCL19-IgG führt zu einer signifikanten Proliferationshemmung gegenüber der Negativ- und Isotypkontrolle (\*\*  $p < 0,01$ ). Die Proliferationshemmung durch IgG ist insignifikant.

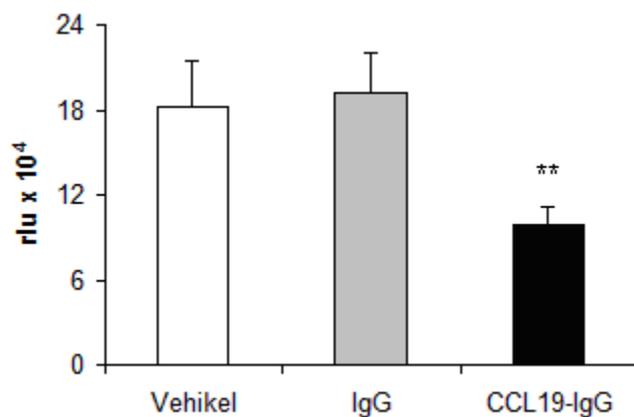
### 3.1.2 LLC Tumorzellen

Auch LLC Zellen interagieren mit CCL19-IgG per Ligand-Rezeptorbindung in deutlichem Ausmaß (Abb. 4). Es ist somit anzunehmen, dass die LLC Zellen eine starke CCR7 Expression aufweisen. Zudem führt die Inkubation mit CCL19-IgG zu einer signifikanten Proliferationshemmung (Abb. 5). Mit diesen Ergebnissen waren die Grundvoraussetzungen für die Nutzung von LLC Zellen als murines Tumormodell für die Behandlung mit CCL19-IgG erfüllt (siehe 3.3).



**Abb. 4: Nachweis der CCR7-Expression von LLC Zellen mittels CCL19-IgG**

Linkes Histogramm: In der zytometrischen Analyse zeigen LLC-GFP Zellen grüne Fluoreszenz (FL1 LOG): M1 markiert in etwa die 80 % der LLC Zellen, die den GFP-Vektor tragen.  
 Rechtes Histogramm: LLC Zellen exprimieren CCR7, denn über Ligandbindung von CCL19-IgG und Färbung mit anti-IgG-PE resultiert ein Shift (FL2 LOG).



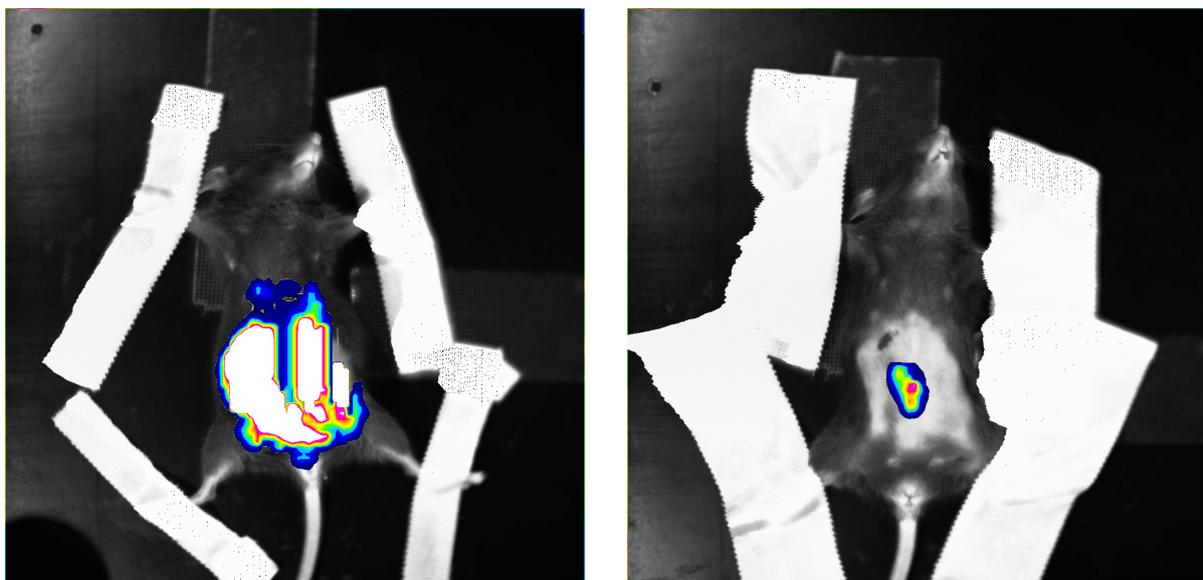
**Abb. 5: CCL19-IgG vermittelte Proliferationshemmung bei LLC Zellen**

Für den BrdU-Proliferationsassay wurden jeweils  $1 \times 10^4$  LLC Zellen mit Vehikel, IgG (200  $\mu\text{g/ml}$ ) oder CCL19-IgG (200  $\mu\text{g/ml}$ ) über 48 Std. behandelt, davon 12 Std. Inkubation mit BrdU. Eingesetzt wurden vier Proben pro Bedingung. Es kommt zu einer signifikanten Proliferationshemmung unter CCL19-IgG Inkubation gegenüber Negativkontrolle und Isotypkontrolle (\*\*  $p < 0,01$ ), aber zu keiner Proliferationshemmung unter Isotypkontrolle (IgG).

## 3.2 Tierversuche mit B16 Tumoren

### 3.2.1 Intraperitoneale vs. subkutane Applikation von Tumorzellen

Um die Wirkung der CCL19-IgG-Behandlung gut beurteilen zu können, sollten die Tumore eine valide Größenerfassung per extern angelegtem Messschieber erlauben. Deswegen wurde ein Tumormodell angestrebt, das einen solide wachsenden, solitären Tumorherd mit linearem Wachstumsverhalten ausbildet. Dafür kommt vor allem ein subkutanes (s.c.) oder intraperitoneales (i.p.) Einbringen von Tumorzellen infrage. Im Vergleich zeigte das in vivo Imaging mittels Biolumineszenz (Abb. 6) einen Vorteil bei der s.c. Applikation, da der i.p. gesetzte Tumor in Größe „explodierte“ und schnell den gesamten Bauchraum ausfüllte. Es wurde somit eine s.c. Injektion der B16 Tumorzellen für die Tierversuche ausgewählt.



**i.p. Applikation**

**s.c. Applikation**

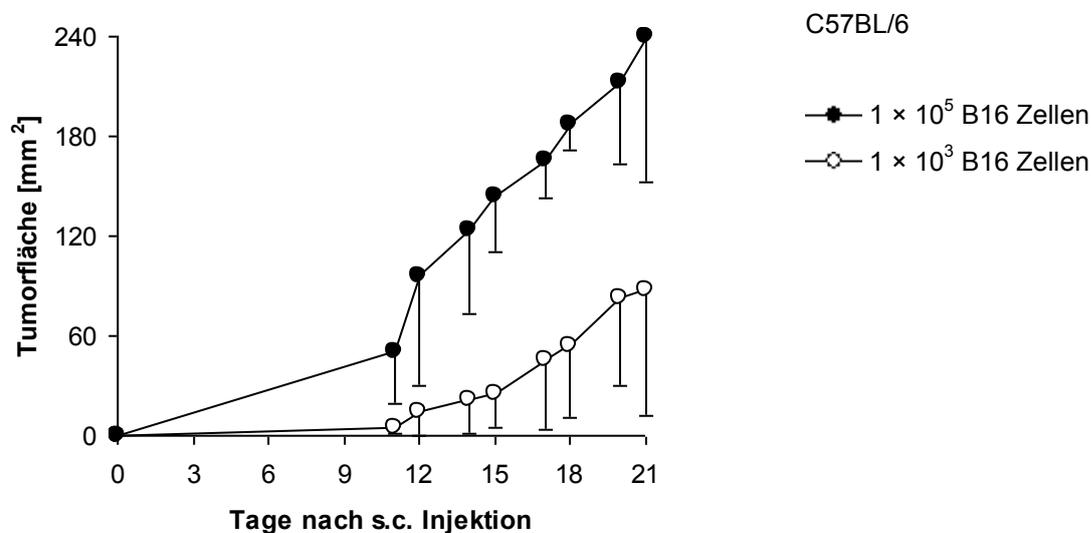
**Abb. 6: In vivo Tumormorphologie nach i.p. versus s.c. Injektion von B16 Zellen**

Biolumineszenz-Aufnahmen zweier Mäuse nach 17 Tagen zeigt nach i.p. oder s.c. Applikation von jeweils  $5 \times 10^4$  B16-F10-luc-G5 Tumorzellen deutliche Unterschiede: eine über die Peritonealhöhle disseminierte vs. lokal begrenzte Ausbreitung.

### 3.2.2 B16 Tumorzellzahlfindung im Tiermodell

Primär musste eine geeignete Zellzahl zur subkutanen Tumorzellapplikation bestimmt werden, da ein zu langsames Tumorstadium zu einem relativ hohen Fusionsproteinverbrauch führen würde, während ein initial zu großer und zu rapide wachsender Tumor sich eventuell nur schwer beeinflussen ließe. Zur Darstellung des Tumorstadiums wurde die Tumorstadiumfläche als Vergleichsgröße herangezogen.

Abbildung 7 zeigt die unterschiedliche Entwicklung der durchschnittlichen Tumorstadiumgröße, nachdem den Tieren  $1 \times 10^3$  oder  $1 \times 10^5$  B16 Zellen injiziert wurden. Insgesamt war das Tumorstadiumwachstum bei Inokulation von  $1 \times 10^3$  Zellen zu gering und zu variabel und bei Inokulation von  $1 \times 10^5$  Zellen zu rasant. Letztlich wurde eine subkutane Applikation von  $5 \times 10^4$  B16 Zellen pro Tier durchgeführt.



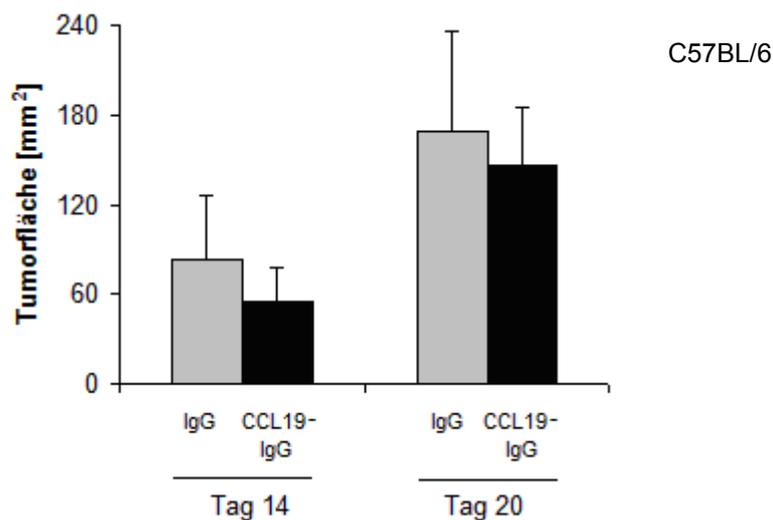
**Abb. 7: B16 Zellzahlfindung im Tiermodell durch Vergleich des Tumorstadiumflächenwachstums**

Eingesetzt wurden je fünf C57BL/6 Mäuse per Gruppe. Entweder  $1 \times 10^3$  oder  $1 \times 10^5$  B16 Zellen wurden am Tag 0 s.c. appliziert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Tumorstadiumflächenmessungen [mm<sup>2</sup>] sind abgebildet. Die Standardabweichungsbalken weisen zwecks Übersichtlichkeit in nur eine Richtung. Gezeigt ist der Verlauf über 21 Tage. Die Tumorstadiumgrößenentwicklung ist von der initial injizierten Zellzahl deutlich beeinflussbar.

### 3.2.3 In vivo CCL19-IgG-Behandlung von B16 Tumoren in Mäusen

Für diesen Versuch wurden weibliche C57BL/6 Mäuse gewählt. Diese hatten ein durchschnittliches Gewicht von 18,7 g (Behandlungsgruppe: 18,5 g; Kontrollgruppe: 18,8 g) und waren zu Versuchsbeginn sechs Wochen alt. Humanes IgG wurde als Isotypbehandlung für die Kontrollgruppe eingesetzt. Als Dosis wurden den Tieren 300 µl Proteinlösung, d.h. entweder CCL19-IgG oder IgG in einer Konzentration von 1,3 mg/ml, per i.p. Applikation injiziert. Aufgrund der relativ langen biologischen Halbwertszeit von CCL19-IgG, welche der Halbwertszeit anderer Zytokin-Immunglobulin Fusionsproteine entspricht (Krautwald et al., 2004), wurde CCL19-IgG nur jeden zweiten Tag appliziert. Pro Tier waren dies demgemäß 390 µg Protein alle zwei Tage. Außerdem erfolgte eine erste Gabe von CCL19-IgG bzw. IgG bereits 20 Stunden vor der Injektion des B16 Tumors.

Abbildung 8 stellt das Ergebnis des Tierversuchs dar: es ergab sich kein signifikanter Vorteil für die Behandlungstiere. Der 14-Tage-Trend, demzufolge die CCL19-IgG-Behandlung mit einer kleineren durchschnittlichen Tumorfläche verbunden war, hatte sich im weiteren Verlauf nicht bestätigt. Am Tag 20 wurde aus diesem Grund der Versuch abgebrochen, und alle Tiere wurden getötet. Zu diesem Zeitpunkt zeigte jeweils eines der Behandlungstiere und eines der Kontrolltiere intraabdominelle Metastasen.



**Abb. 8: Ergebnis des Tierversuches mit B16 Tumoren unter Behandlung mit CCL19-IgG**

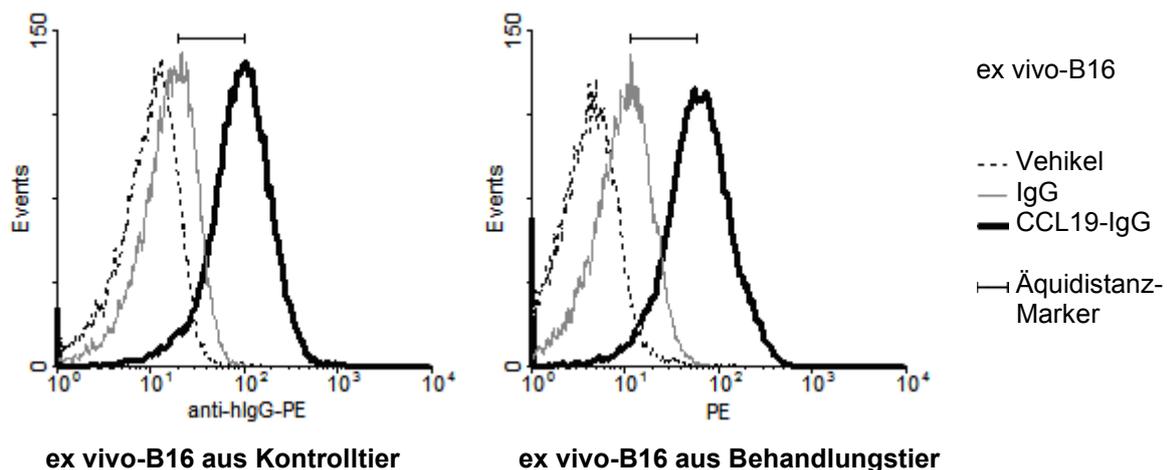
Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorfläche für die Behandlungsgruppe („CCL19-IgG“) und Kontrollgruppen („IgG“) bei je fünf C57BL/6-Mäusen pro Gruppe. Am Tag 0 wurden  $5 \times 10^4$  Zellen/100 µl PBS s.c. injiziert. Am Tag zuvor (Tag -1) wurden erstmalig 390 µg CCL19-IgG (Behandlungsgruppe) bzw. IgG (Kontrollgruppe) appliziert. Weiterbehandlung erfolgte i.p. alle zwei Tage.

Während am Tag 14 sich ein gewisser Unterschied in der Tumorgröße zwischen den CCL19-IgG-behandelten und IgG-behandelten Mäusen darstellte ( $p \approx 0,11$ , zweiseitig), war am Tag 20 diese Differenz geringer und der Unterschied klar insignifikant.

### 3.2.4 Ex vivo Untersuchung der eingesetzten B16 Tumorzellen

Vor dem Hintergrund des Ergebnisses des B16 Tierversuchs, galt es zu beantworten, ob die symptomatisch gewordenen Mäusetumore immer noch den ursprünglich implantierten B16 Tumorzellen entsprachen. Da CCR7 die Zielstruktur für das Fusionsprotein darstellt, wurde zunächst auf Abweichungen hinsichtlich der CCR7 Expression der Tumorzellen geachtet. Hierfür wurden noch am Tag des Abbruchs des Tierversuchs B16 Zellen aus homogenisierten Tumorsektaten von Tieren der Behandlungsgruppe (Gabe von CCL19-IgG) sowie Tieren der Kontrollgruppe (Gabe von IgG) zurückgewonnen. Die „ex vivo“-Zellen wurden zytometrisch auf ihre CCR7-Expression (Abb. 9) und im Proliferationsassay auf den CCL19-IgG vermittelten Proliferationshemmeffekt (Abb. 10) hin untersucht.

Abbildung 9 stellt die Bindung von CCL19-IgG an ex vivo-Zellen aus einem Tier der IgG-Kontrollgruppe (Kontrolltier) der Bindung von CCL19-IgG an ex vivo-Zellen aus einem Tier der CCL19-IgG-Behandlungsgruppe (Behandlungstier) gegenüber. Unabhängig von der Herkunft der Zellen wird CCL19-IgG vergleichbar stark gebunden. Demnach exprimieren diese ex vivo-B16 Zellen in ähnlichem Ausmaß CCR7 auf ihrer Oberfläche.

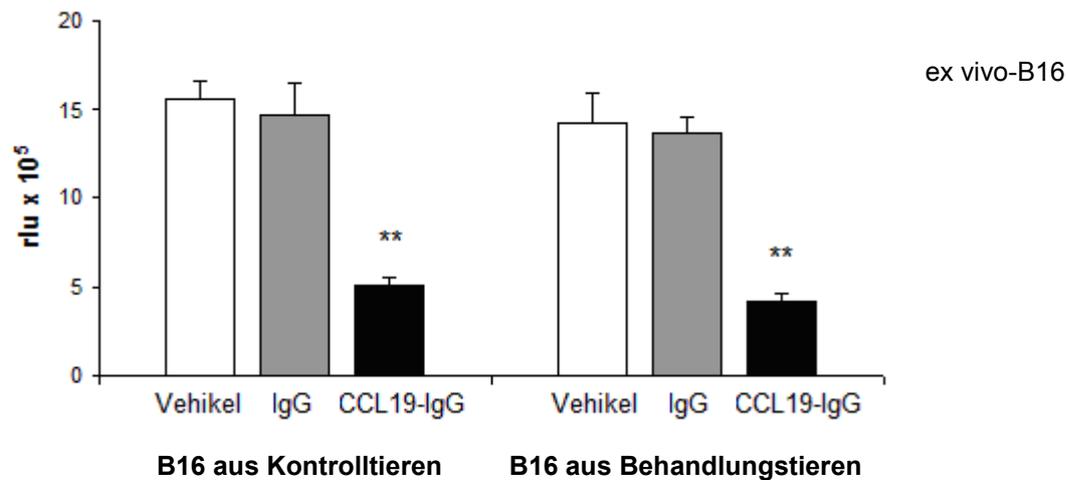


**Abb. 9: Zytometrische Untersuchung von ex vivo-B16 Zellen aus einem mit IgG behandeltem Tier vs. einem mit CCL19-IgG behandeltem Tier**

Untersucht wurden ex vivo-B16 Zellen aus jeweils einem repräsentativen Tier der Kontroll- bzw. der Behandlungsgruppe. Die Tiere hatten jeweils elfmalig eine i.p. Injektion von IgG bzw. CCL19-IgG über den Verlauf des Versuchs erhalten.

Im Vergleich beider Histogramme erscheint der Shift von CCL19-IgG gegenüber IgG fast identisch (siehe Äquidistanzmarkierung). Demnach besteht kaum ein Unterschied in der CCR7 Expression zwischen den ex vivo-B16 Zellen aus dem Kontrolltier und den ex vivo-B16 Zellen aus dem Behandlungstier.

Abbildung 10 zeigt, dass sich alle ex vivo-B16 Zellen, also unabhängig davon, ob sie Behandlungstieren oder Kontrolltieren entnommen wurden, weiterhin durch CCL19-IgG in ihrem Wachstum inhibieren lassen. Zudem ist auch zwischen Abbildung 10 und Abbildung 3 (S. 32) des in vitro Versuchs mit B16 Zellen kein deutlicher Unterschied sichtbar.



**Abb. 10: Ex vivo-B16 Zellen aus Kontrolltieren vs. Behandlungstieren im Proliferationsassay**

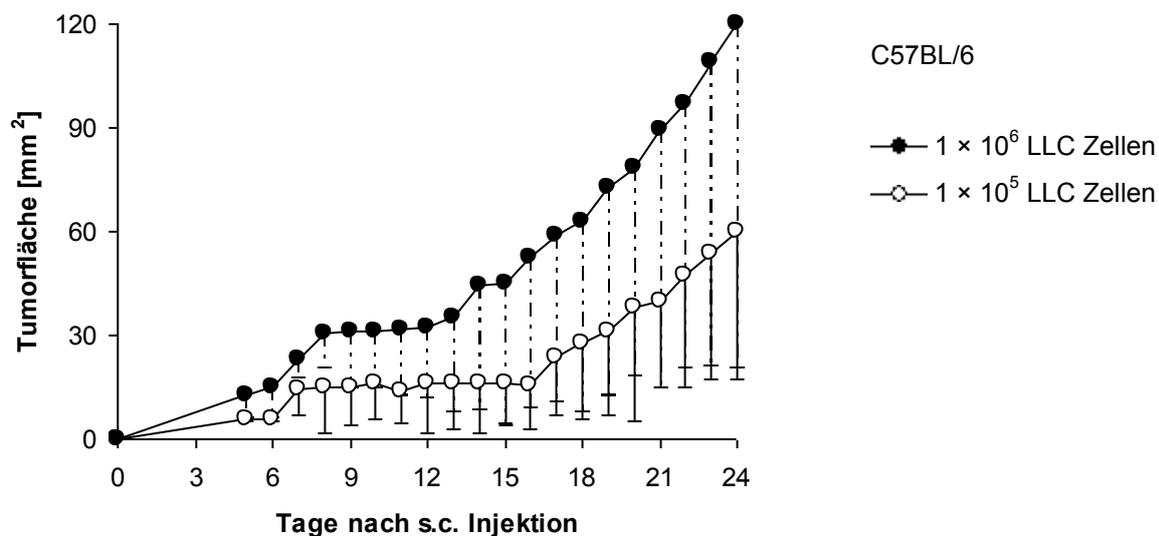
$5 \times 10^4$  B16 Zellen wurden mit Vehikel, IgG (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder CCL19-IgG (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) über 48 Std. inkubiert. Eingesetzt wurden vier Proben pro Bedingung. Bei Assaystart waren die Zellen bereits über zehn Tage rekultiviert worden. Dargestellt sind gemittelte Werte von ex vivo-B16 Zellen aus Kontrolltieren (Mittelwerte von zwei Tieren der IgG-Gruppe) vs. Behandlungstieren (Mittelwerte von drei Tieren der CCL19-IgG-Gruppe). Die Zugabe von CCL19-IgG führt zu einer signifikanten Proliferationshemmung (\*\*  $p < 0,01$ ) bei B16 Zellen unabhängig ihrer Gruppenzugehörigkeit. Der Proliferationshemmeffekt für Zellen aus Behandlungstieren und aus Kontrolltieren ist praktisch gleich stark ausgeprägt. Es gibt auch kaum einen Unterschied zu den kultivierten B16 Zellen (vgl. Abb. 3, S. 32).

### 3.3 Tierversuche mit LLC Tumoren

Von Beginn an waren zwei Versuchsreihen, basierend auf zwei verschiedenen CCR7<sup>+</sup> Tumoren geplant, um zu untersuchen, ob CCL19-IgG einen generellen, inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von CCR7<sup>+</sup> Tumoren ausübt. Besonders vor dem Hintergrund, dass für B16 Zellen in vivo keine Proliferationshemmung gezeigt werden konnte und der Tierversuch abgebrochen wurde, sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine zelllinienspezifische Ursache vorliegt. Als zweites syngenes Tumormodell waren LLC Zellen gewählt worden, die sich in vitro in ihrem Wachstum durch CCL19-IgG hemmen ließen (siehe 3.1.2).

#### 3.3.1 LLC Tumorzellzahlfindung im Tiermodell

Zunächst sollte eine adäquate Zellzahl für die s.c. Implantation der LLC Tumore gefunden werden. Abbildung 11 zeigt, dass nach einer Injektion von  $1 \times 10^6$  LLC Zellen geeignete Tumorgößen als nach einer Injektion von  $1 \times 10^5$  Zellen resultierten. Allerdings ergaben sich bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  auch größere Standardabweichungen. Zwar könnte sich eine größere Variabilität ungünstig auf die Reliabilität der Messungen auswirken, aber das deutlich schnellere Tumorwachstum wurde als vorteilhaft angesehen und daraufhin eine Injektion von  $1 \times 10^6$  LLC Zellen durchgeführt.



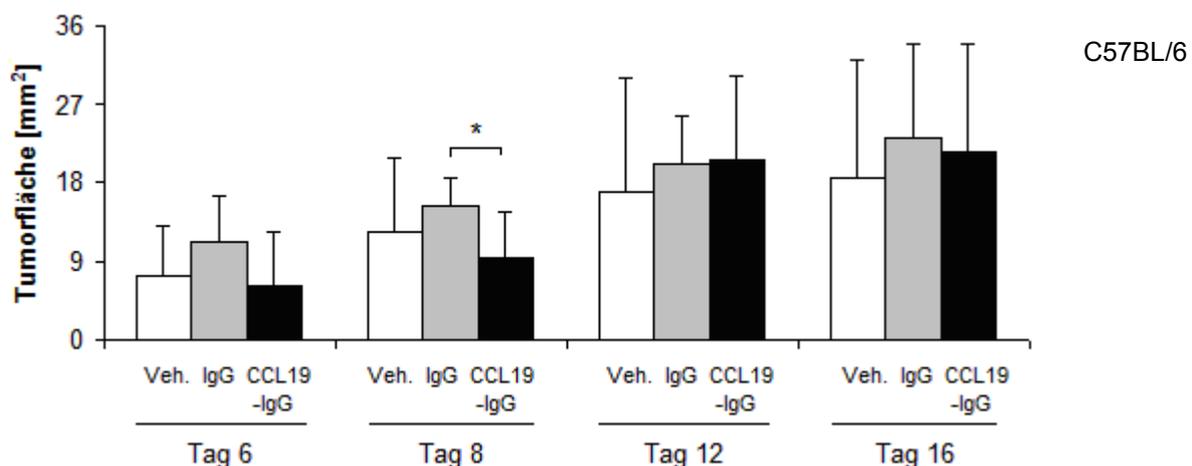
**Abb. 11: LLC Zellzahlfindung im Tiermodell durch Vergleich des Tumorflächenwachstums**

Eingesetzt wurden je acht C57BL/6 Mäuse pro Gruppe. Es wurden entweder  $1 \times 10^5$  oder  $1 \times 10^6$  LLC Zellen am Tag 0 s.c. appliziert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Tumorflächenmessungen [mm<sup>2</sup>] sind abgebildet, wobei die Standardabweichungsbalken zur besseren Übersichtlichkeit nur in eine Richtung weisen. Ab Tag 5 sind bei einigen Tieren Tumore messbar. Die Streuung ist bei s.c. Injektion von  $1 \times 10^6$  LLC Zellen verhältnismäßig stärker als bei Injektion mit  $1 \times 10^5$  LLC Zellen.

### 3.3.2 In vivo CCL19-IgG-Behandlung von LLC Tumoren in Mäusen

Für diesen Tierversuch wurden 24 weibliche C57BL/6 Mäuse in drei Gruppen aufgeteilt. Das durchschnittliche Gewicht einer Maus betrug 18.7 g (Behandlungsgruppe: 19,1 g, Kontrollgruppen: beide 18,5 g). Da der vorige Tierversuch abgebrochen werden musste, wurde diesmal – in Abweichung zum Behandlungsschema des B16 Versuchs – jeden Tag CCL19-IgG, IgG oder Vehikelsubstanz injiziert. Die Dosis von 390 µg Protein pro Maus (300 µl, Konzentration von 1,3 µg/ml) blieb unverändert. Die erste i.p. Applikation von CCL19-IgG erfolgte bereits 24 Std. vor der Impfung mit LLC Tumorzellen (pro Tier  $1 \times 10^6$  LLC Zellen s.c). Entsprechend wurde den Tieren der Negativkontrollgruppe PBS (Vehikel) und den Tieren der Isotypkontrollgruppe IgG injiziert.

Gegenüber der Isotypkontrollgruppe erschien die Tumorfläche bis Tag 8 für die Behandlungstiere noch marginal kleiner zu sein (Abb. 12). Doch nach 16 Tagen ergab sich kein Vorteil für die CCL19-IgG-behandelten Tiere hinsichtlich Tumorgröße und Überleben, und der Tierversuch wurde abgebrochen. Kein Tier war bis zum Versuchsabbruch am Tumor selbst verstorben. Außerdem hatten am Tag 16 zwei Tiere der Vehikel-Gruppe und ein Tier der CCL19-IgG-Gruppe noch keinen extern sichtbaren Tumor ausgebildet, weswegen eine weitere Entwicklung der Tumore abgewartet wurde. Am Tag 20 war jedoch bei allen Tieren ein Tumor evident, so dass von einer insgesamt erfolgreichen Tumordinokulation ausgegangen werden konnte.

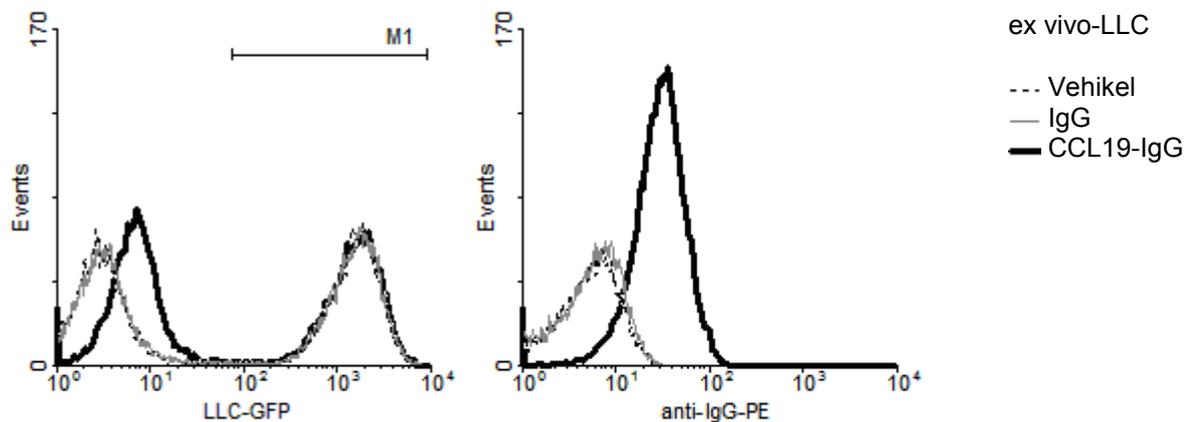


**Abb. 12: Ergebnis des Tierversuches mit LLC Tumoren unter CCL19-Behandlung**

Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorfläche für die Behandlungsgruppe („CCL19-IgG“) und die Kontrollgruppen („Vehikel“ und „IgG“) bei je acht C57BL/6 Mäusen pro Gruppe. Am Tag 0 wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/100 µl PBS s.c. injiziert. Das Behandlungsschema startete bereits am Tag -1 mit der ersten i.p. Applikation von täglich 390 µg CCL19-IgG bzw. 390 µg IgG oder 300 µl PBS für die IgG- oder Vehikel-Kontrollgruppen. Während am Tag 8 ein signifikanter Unterschied zwischen der CCL19-IgG-Gruppe gegenüber der IgG-Gruppe bestand (\*  $p < 0,05$ ), war am Tag 16 kein Vorteil mehr für die CCL19-IgG-Gruppe ersichtlich: der Versuch wurde abgebrochen.

### 3.3.3 Ex vivo Untersuchung der eingesetzten LLC Tumorzellen

Ein Tumor aus einem Tier der CCL19-IgG-Behandlungsgruppe wurde anschließend homogenisiert und für eine ex vivo Betrachtung rekultiviert, da sich der antiproliferative Effekt in vivo nicht reproduziert ließ. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich die LLC Tumorzellen unter in vivo Bedingungen in gewisser Weise entdifferenziert hatten, beispielsweise sich die Zellen dahingegen selektiert hatten, CCR7 nicht mehr zu exprimieren. Entsprechend folgte die zytometrische Überprüfung der ex vivo-LLC Zellen aus einem Tier der Behandlungsgruppe auf das Vorhandenseins ihres GFP-Tags und ihrer CCR7-Expression. In Abbildung 13 ist ersichtlich, dass die ex vivo-LLC Zellen sich nicht grundsätzlich von den kultivierten LLC Zellen (Abb. 4, S. 33) in Hinblick auf diese beiden Aspekte unterschieden.



**Abb. 13: Zytometrische Untersuchung von ex vivo-LLC Zellen aus einem mit CCL19-IgG-behandeltem Tier**

LLC Zellen wurden aus einem mit CCL19-IgG behandelten Tier isoliert, über einen Monat rekultiviert und zytometrisch analysiert. Zum Vergleich gegenüber den kultivierten LLC Zellen dient Abbildung 4 (S. 33).

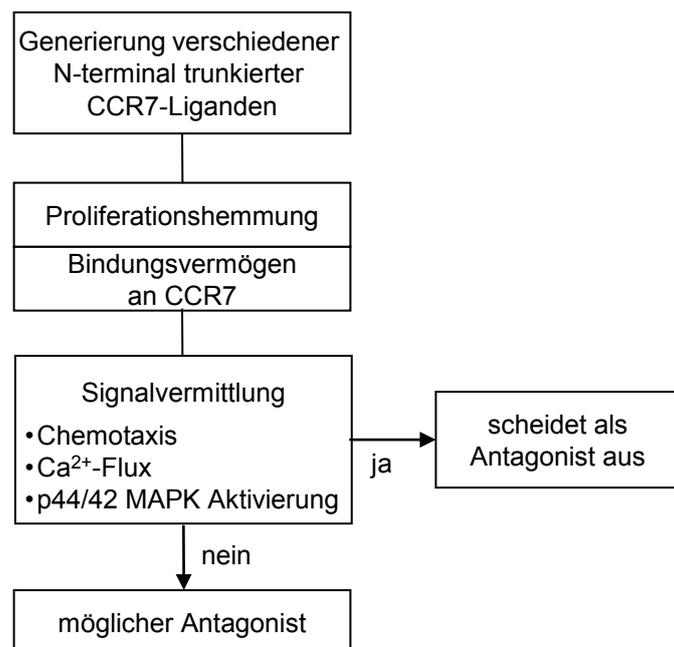
Linkes Histogramm: Die ex vivo-Zellen zeigen weiterhin grüne Fluoreszenz. Gemäß M1-Markierung fluoreszieren über 50 % der Zellen, d.h. die Zellen trugen überwiegend immer noch den GFP Vektor.

Rechtes Histogramm: Die CCR7-Expression der ex vivo-Zellen ist weiterhin deutlich und scheint gegenüber der CCR7-Expression der kultivierten LLC Zellen zumindest nicht wesentlich abgeschwächt.

### 3.4 Untersuchung der CCR7-Liganden $\Delta 4$ -CCL21-IgG und $\Delta 6$ -CCL19-IgG

In diesem Abschnitt sollen die Schritte zur Identifikation eines differenziell wirkenden CCR7-Antagonisten dargestellt werden, der die Proliferation von CCR7<sup>+</sup> Tumoren hemmt, aber im Gegensatz zu CCL19-IgG, einem vollen Agonisten, keine weiteren Signale an CCR7 vermittelt und so nicht direkt zur Immunmodulation beiträgt. Als Kandidaten wurden zwei von der Arbeitsgruppe generierte CCR7-Ligand-Analoga,  $\Delta 6$ -CCL19-IgG und  $\Delta 4$ -CCL21-IgG, getestet.

Abbildung 14 veranschaulicht das Prinzip der Testung auf einen Antagonismus am CCR7-Rezeptor. Zuerst wurden die Ligand-Analoga,  $\Delta 6$ -CCL19-IgG und  $\Delta 4$ -CCL21-IgG, zusammen mit den vollen CCR7-Agonisten, CCL19-IgG und CCL21-IgG, auf Proliferationshemmung und Bindungsvermögen an CCR7 untersucht. Waren beide Kriterien erfüllt, schlossen sich weitere Experimente an. Von einem CCR7-Antagonisten wurde außerdem gefordert, dass dieser weder Chemotaxis noch Ca<sup>2+</sup>-Flux noch Signaltransduktion über MAP Kinasen Aktivierung auslöste.

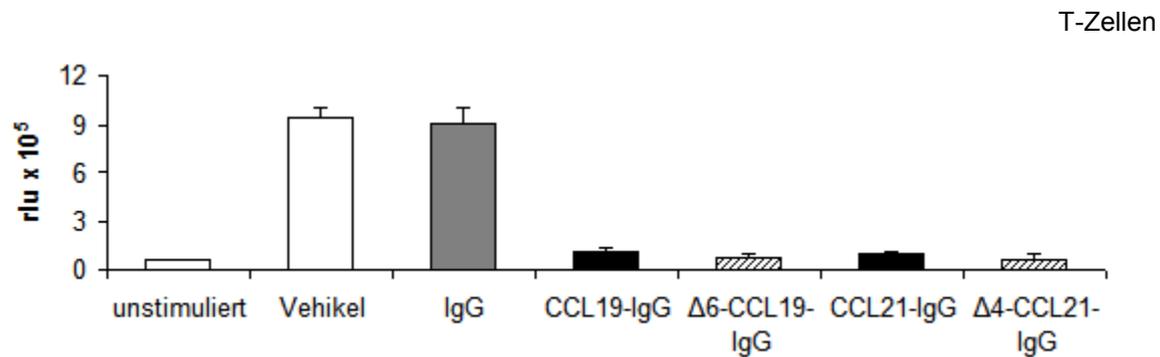


**Abb. 14: Schema für die Determinierung eines CCR7 Antagonisten**

Die Vorgehensweise bei der Untersuchung von N-terminal trunkierten CCR7-Liganden (hier  $\Delta 6$ -CCL19-IgG und  $\Delta 4$ -CCL21-IgG) hinsichtlich ihrer antagonistischen Wirkung am CCR7-Rezeptor ist schematisch dargestellt. Der gesuchte CCR7-Ligand induziert eine Proliferationshemmung auf Tumorzellen, während weitere CCR7-vermittelte Signale unterdrückt werden.

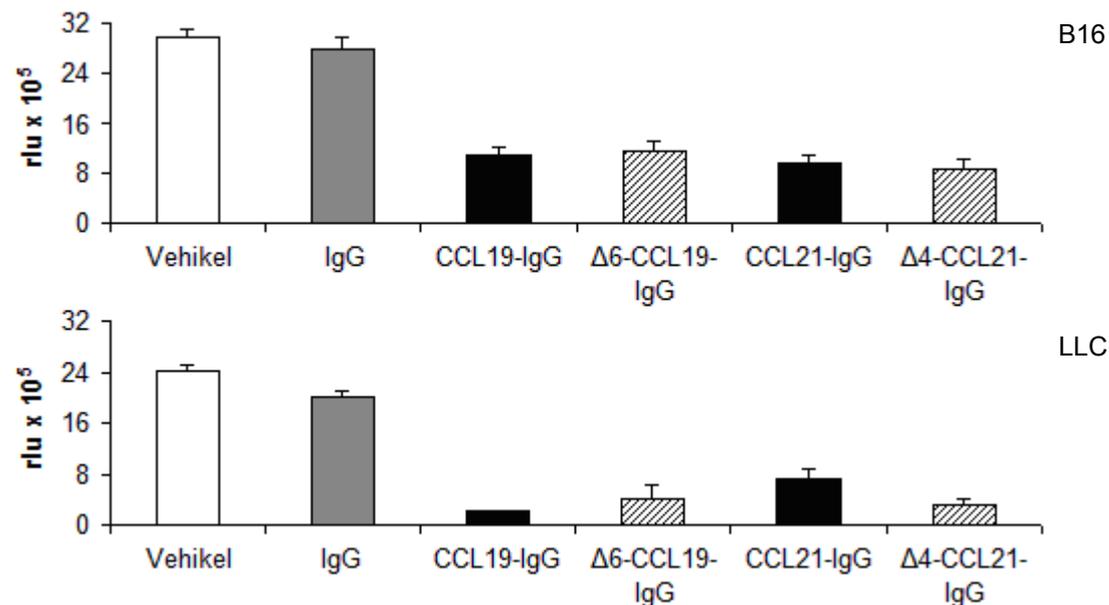
### 3.4.1 Proliferationshemmung vermittelt durch die CCR7-Liganden

$\Delta 6$ -CCL19-IgG und  $\Delta 4$ -CCL21-IgG zeigen einen deutlichen Proliferationshemmeffekt auf murine T-Zellen (Abb. 15) sowie auf B16 Zellen und LLC Zellen (Abb. 16). Die Stärke des Effekts ist vergleichbar mit dem Effekt induziert durch die vollen CCR7-Agonisten CCL19-IgG und CCL21-IgG.



**Abb. 15: CCR7-Ligand vermittelte Proliferationshemmung von primären T-Zellen**

Für den Proliferationsassay wurden  $1,5 \times 10^5$  T Zellen in 200  $\mu$ l pro Probe über drei Tage inkubiert (BrdU-Zugabe nach 48 Std.). Die CCR7-Liganden (CCL19-IgG,  $\Delta 6$ -CCL19-IgG, CCL21-IgG,  $\Delta 4$ -CCL21-IgG) wurden auf der Versuchsplatte vorgebunden, indem die Vertiefungen mit entsprechenden Proteinlösungen (50  $\mu$ g/ml in 100  $\mu$ l) bzw. Vehikel für 3 Std. inkubiert wurden. Die T-Zellen wurden mit anti-CD3/anti-CD28 zur Proliferation angeregt. Mit allen CCR7-Liganden ließ sich eine einheitlich starke Proliferationshemmung erzielen ( $p < 0,01$ ).

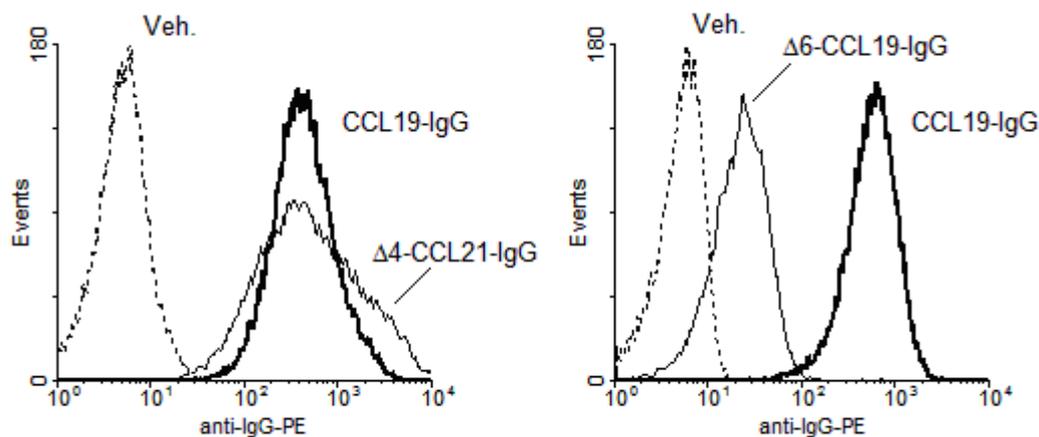


**Abb. 16: CCR7-Ligand vermittelte Proliferationshemmung von B16 und LLC Zellen**

Für den Proliferationsassay wurden  $4 \times 10^4$  B16 Zellen oder LLC Zellen in 200  $\mu$ l pro Probe über zwei Tage inkubiert (BrdU-Zugabe nach 36 Std.). Die CCR7-Liganden (CCL19-IgG,  $\Delta 6$ -CCL19-IgG, CCL21-IgG,  $\Delta 4$ -CCL21-IgG) wurden vorab auf der Versuchsplatte vorgebunden, indem die Vertiefungen mit entsprechenden Proteinlösungen (50  $\mu$ g/ml in 100  $\mu$ l) bzw. Vehikel für 3 Std. inkubiert wurden. Mit allen CCR7-Liganden ließ sich eine vergleichbar starke Proliferationshemmung von B16 und LLC Zellen erzielen ( $p < 0,01$ ).

### 3.4.2 Bindungsvermögen der CCR7-Liganden

Da ein möglicher Antagonist mit einer kompetitiven Wirkung am Rezeptor dort auch binden muss, wurde das CCR7 Bindungsvermögen der beiden Kandidaten,  $\Delta 4$ -CCL21-IgG und  $\Delta 6$ -CCL19-IgG, analysiert. Basierend auf dem dichten CCR7-Besatz auf der Zelloberfläche von HuT-78 Zellen kann das Bindungsausmaß der Liganden an CCR7 miteinander verglichen werden. Wie in Abbildung 17 dargestellt, zeigt  $\Delta 4$ -CCL21-IgG eine starke Bindung an CCR7, die der Bindung des äquimolar eingesetzten Agonisten CCL19-IgG fast gleichkommt.  $\Delta 6$ -CCL19-IgG weist hingegen ein vergleichsweise geringeres Bindungsvermögen an die Rezeptoren der HuT-78 Zellen auf. Somit hat  $\Delta 6$ -CCL19-IgG wahrscheinlich eine geringere Rezeptoraffinität und geringere Potenz als  $\Delta 4$ -CCL21-IgG.



**Abb. 17: Bindungsvermögen von  $\Delta 4$ -CCL21-IgG und  $\Delta 6$ -CCL19-IgG an CCR7**

Gezeigt ist die zytometrische Analyse des Bindungsvermögens von potenziellen Antagonisten  $\Delta 4$ -CCL21-IgG und  $\Delta 6$ -CCL19-IgG an CCR7<sup>+</sup> HuT-78 Zellen im Vergleich zum CCR7-Agonisten CCL19-IgG.

**$\Delta 4$ -CCL21-IgG** (linkes Histogramm): Im Vergleich zu CCL19-IgG stellt sich ein ähnlich starkes Bindungsvermögen von  $\Delta 4$ -CCL21-IgG mit größerer Streuung dar.

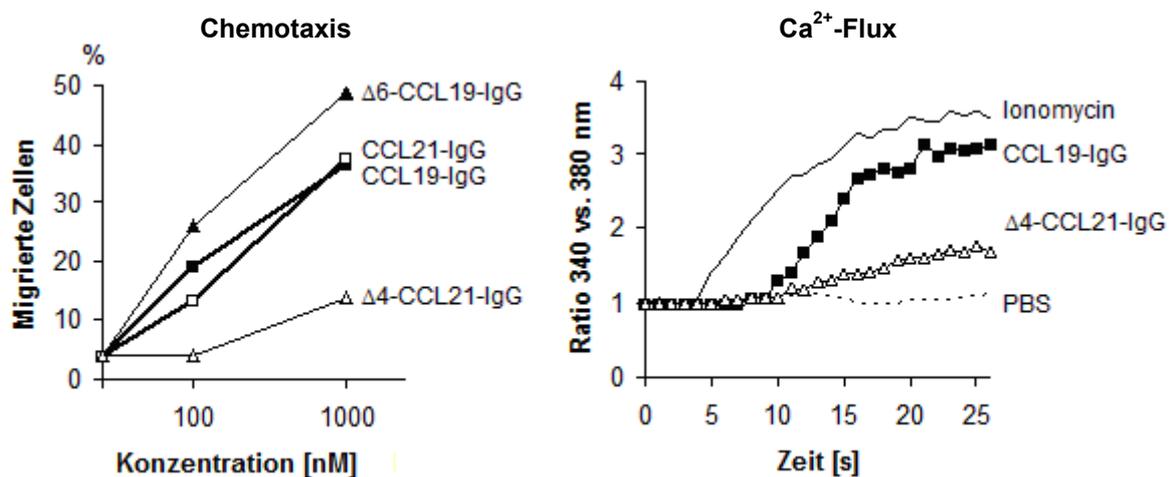
**$\Delta 6$ -CCL19-IgG** (rechtes Histogramm): Im Vergleich zu CCL19-IgG bindet  $\Delta 6$ -CCL19-IgG im geringeren Maße an CCR7.

### 3.4.3 Induktion von Chemotaxis und $\text{Ca}^{2+}$ -Flux durch CCR7-Liganden

Die Ligand-Analoga wurden auf ihre chemotaktische Wirkung hin untersucht. In den Vorarbeiten war die chemotaktische Aktivität der beiden CCR7-Agonisten CCL19-IgG und CCL21-IgG bei murinen primären T-Zellen nachgewiesen worden, so dass diese CCR7-Agonisten hier zum Vergleich herangezogen werden konnten.

Abbildung 18 zeigt im linken Bildabschnitt die Ergebnisse des Chemotaxisassays.  $\Delta 4$ -CCL21-IgG übt bei einer Konzentration von 100 nM (8  $\mu\text{g/ml}$ ) keine und bei 1  $\mu\text{M}$  (77  $\mu\text{g/ml}$ ) eine sehr reduzierte chemotaktische Wirkung aus.  $\Delta 6$ -CCL19-IgG zeigte sich als der potenteste Lockstoff unter den vier hier untersuchten CCR7-Liganden; dieses Fusionsprotein induzierte eine stärkere Zellmigration als die beiden CCR7-Agonisten. Folglich wurde  $\Delta 6$ -CCL19-IgG nicht mehr als aussichtsreicher Kandidat betrachtet.

Im rechten Abschnitt von Abbildung 18 sind die Ergebnisse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux Messung zusammengefasst.  $\Delta 4$ -CCL21-IgG induzierte deutlich weniger  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux als der volle Agonist CCL19-IgG.



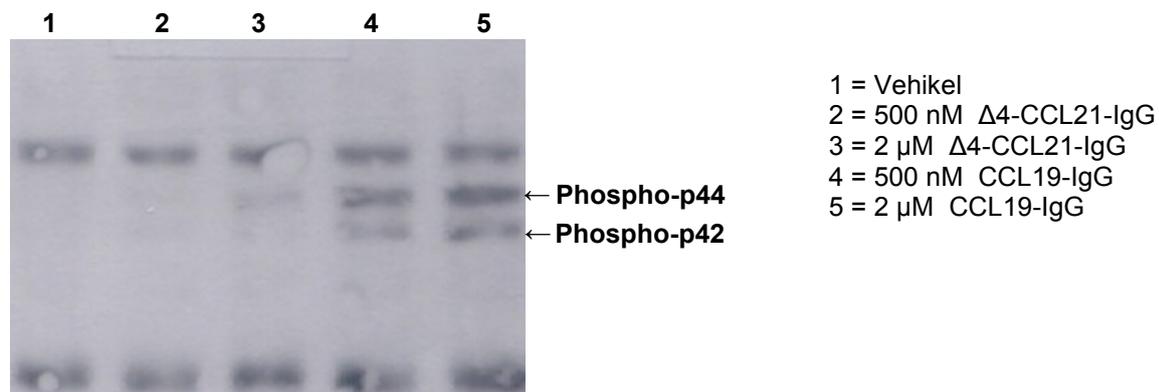
**Abb. 18: Vergleich von Chemotaxis und  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux durch die CCR7-Liganden**

**Chemotaxis-Assay:** Die Messung der chemotaktischen Aktivität verschiedener Liganden erfolgte in einer Konzentration von 100 nM (8  $\mu\text{g/ml}$ ) bzw. 1  $\mu\text{M}$  (~80  $\mu\text{g/ml}$ ). Als Ausgangsmenge wurden  $1 \times 10^6$  T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen pro Ansatz eingesetzt. Nach 4,5 Std. bei 37 °C wurde der Anteil der migrierten Zellen gezählt. CCL19-IgG und CCL21-IgG zeigten eine ähnlich starke Wirkung auf die Zellmigration. Im Vergleich löste  $\Delta 6$ -CCL19-IgG mehr Chemotaxis aus, während  $\Delta 4$ -CCL21-IgG insgesamt die geringste Wirkung auf die Zellen hatte.

**$\text{Ca}^{2+}$ -Flux-Assay:** Die Messung erfolgte bei Inkubation mit CCL19-IgG und  $\Delta 4$ -CCL21-IgG jeweils in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  (~80  $\mu\text{g/ml}$ ) in murinen T-Zellen aus C57BL/6. Als Positivkontrolle diente Ionomycin und als Negativkontrolle PBS.  $\Delta 4$ -CCL21-IgG induzierte deutlich weniger  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux als CCL19-IgG. Dieser Assay wurde dreimal durchgeführt und ein repräsentatives Testergebnis hier dargestellt.

### 3.4.4 Induktion von p44/42 MAPK Aktivität durch $\Delta$ 4-CCL21-IgG

Wird CCR7 durch seine natürlichen Liganden, d.h. biologisch aktives CCL19 oder CCL21, stimuliert, resultiert über die  $G_{\alpha i}$ -Einheit eine Aktivierung des MAPK-Wegs (Fang und Hwang, 2009). Hierbei werden die MAP Kinasen p44/42 (ERK1/2) phosphoryliert und können mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden. Gleiches gilt für weitere CCR7-Liganden. Bereits Krautwald et al. (2004) zeigten, dass das Fusionsprotein CCL19-IgG zu einer MAPK Aktivierung von murinen T-Zellen führt, die mit einer Aktivierung durch rekombinantes CCL19 vergleichbar ist. Abbildung 19 bestätigt die Signaltransduktion infolge einer Stimulation mit dem vollen Agonisten CCL19-IgG.  $\Delta$ 4-CCL21-IgG ist jedoch nicht in der Lage, MAPK in primären T-Zellen zu aktivieren (Abb. 19).



**Abb. 19: Nachweis von p44/42 MAPK (ERK1/2) Aktivierung durch  $\Delta$ 4-CCL21-IgG vs. CCL19-IgG im Western Blot**

Durchgeführt wurde eine 12 %ige SDS-PAGE nach fünfminütiger Inkubation von primären murinen T-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (500 nM [ $\sim$ 40  $\mu$ g/ml], 2  $\mu$ M [ $\sim$ 150  $\mu$ g/ml]) von  $\Delta$ 4-CCL21-IgG und CCL19-IgG. Die Immunodetektion im Western Blot erfolgte gegen Phospho-p44/42 MAPK.

$\Delta$ 4-CCL21-IgG kann die p44/42 MAP Kinase (ERK1/2) im Vergleich zu äquimolar eingesetzten Konzentrationen von CCL19-IgG nicht phosphorylieren.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob der Einsatz von CCR7-Liganden, die von der Arbeitsgruppe generiert wurden, im Sinne einer Tumorthherapie möglich ist. In Vorarbeiten (u.a. Krautwald et al., 2004) konnte gezeigt werden, dass der CCR7-Ligand CCL19-IgG *in vitro* das Wachstum von CCR7<sup>+</sup> Tumorzellen inhibierte. Deshalb wurde zunächst im Tiermodell mittels syngener Tumore überprüft, ob auch *in vivo* eine Behandlung mit CCL19-IgG das Wachstum CCR7-exprimierender Tumore zu verlangsamen oder gar zu verhindern vermag. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge führte die Behandlung mit CCL19-IgG in den Tierversuchen nicht zu dem erwarteten Effekt. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen *in vivo* Daten zeigen ein nur marginal verzögertes B16 Melanom- und ein ungehemmtes LLC Tumorwachstum. Es gab keinen Überlebensvorteil für die CCL19-IgG behandelten Mäuse. Vor diesem Hintergrund wurden weitere CCR7-Liganden hinsichtlich ihrer Eignung im Einsatz gegen CCR7-exprimierende Tumore untersucht. Mit  $\Delta 4$ -CCL21-IgG konnte ein Ligand identifiziert werden, welcher auf der einen Seite *in vitro* eine signifikante und den vollen Agonisten CCL19-IgG und CCL21-IgG vergleichbare Proliferationshemmung auslöst, welcher auf der anderen Seite aber keine weiteren, physiologisch CCR7-vermittelten Signale (Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup>-Flux, MAPK Aktivierung) triggert und somit mutmaßlich kaum immunmodulierend wirkt. Dies entspricht am ehesten den in Abbildung 14 (S. 42) dargestellten Kriterien für einen differenziellen Antagonismus. Im Kontrast dazu stehen die nicht-trunkierten CCR7-Liganden, wie z.B. CCL19-IgG, das eine deutliche Immunsuppression induziert (Ziegler et al., 2006).

Im Folgenden sollen mögliche Gründe für den fehlenden Proliferationshemmeffekt im Mausmodell diskutiert werden. Da CCL19-IgG das Wachstum CCR7-exprimierender Tumorzellen *in vitro* inhibieren konnte, müssen im Tiermodell Mechanismen greifen, die der Proliferationshemmung entgegenstehen. Bei der Betrachtung möglicher Ursachen wird zuerst die Dosierung von CCL19-IgG und die möglicherweise ungenügende CCL19-IgG-Bioverfügbarkeit im Tier besprochen. Auch eine mögliche Nebenwirkung, die durch CCL19-IgG-Anwendungen hervorgerufen werden könnte – speziell die potenzielle Begünstigung einer Metastasierung – wird erörtert. Dem schließt sich eine Bewertung der Ergebnisse der Tierversuche im Kontext aktueller Forschungen an. Hier werden zwei Erklärungsansätze, nämlich Decoy-Rezeptoren und immunmodulierende Effekte, für die fehlende Proliferationshemmung im Tier erwogen. Schließlich wird ein neuer Therapieansatz basierend auf dem Fusionsprotein und CCR7-Ligand-Analogon  $\Delta 4$ -CCL21-IgG diskutiert.

Da der in vitro für CCL19-IgG gefundene Effekt in vivo nicht reproduziert werden konnte, besteht die Möglichkeit, dass CCL19-IgG im Tierversuch zu gering dosiert wurde. Tatsächlich erhielten die Mäuse eine Einzeldosis von 390 µg, die sich primär aus den Versuchsgegebenheiten (Proteinkonzentration, adäquates Applikationsvolumen) ableitete. Die Stammlösung des gepoolten CCL19-IgG hatte eine Konzentration von 1,3 g/l, wobei eine weitere Konzentrierung wegen des unverhältnismäßigen Aufwands zunächst nicht infrage kam. Von dieser Lösung wurden 300 µl i.p. injiziert (d.h. 300 µl x 1,3 g/l = 390 µg). Ein Volumen von 300 µl per i.p. Injektion gilt als gut verträglich. Es stellt sich die Frage, wie diese Menge gegenüber den in vitro eingesetzten Proteinmengen einzustufen ist. Eine 18,5 g schwere Maus, wie sie im Tierversuch verwendet wurde, hat ein geschätztes Plasmavolumen von 1,2 ml (Riches et al., 1973; bzw. gemäß „Faustregel“ sind es 6–8 % vom Körpergewicht). Es würde demnach maximal (d.h. unter der Annahme von 0 % Plasmaproteinbindung, vernachlässigbare Metabolisierung etc.) eine Konzentration von 325 µg/ml (4,2 µM) im Plasma pro Applikation zur Verfügung stehen. Im Vergleich dazu wurde in Proliferationsassays eine Konzentration von 100 bis 200 µg/ml (1,3 bis 2,6 µM) eingesetzt, die auch bei B16 und LLC Zellen in vitro eine deutliche Hemmung erzielte. Auf der Basis dieser Vereinfachungen allein kann von einer ausreichenden Behandlungsdosis ausgegangen werden. Zudem ist anzunehmen, dass die relativ lange biologische Halbwertszeit des Fusionsproteins über die Dauer der Tierversuche zu einer Akkumulation führt. Natürlich können solche theoretischen Berechnungen eine Bestimmung des Plasmaspiegels in der Maus nicht ersetzen, wobei allerdings auch durch solche Messungen nicht geklärt wäre, wie viel Fusionsprotein tatsächlich die subkutan-implantierten Tumore erreicht. Die ex vivo Untersuchungen, die im Folgenden diskutiert werden, liefern den Hinweis, dass tatsächlich zu wenig CCL19-IgG in den Tumor gelangt sein könnte.

In den ex vivo Untersuchungen zeigten sich die B16 und LLC Zellen weiterhin CCR7<sup>+</sup> und in ihrer Proliferation durch CCL19-IgG hemmbar, so dass nicht davon auszugehen ist, dass sich die Zellen in gewisser Weise „entdifferenziert“ hatten und so nicht mehr der Fusionsproteinbehandlung zugänglich waren. Allerdings kann das Ergebnis der ex vivo-B16 Zellen dahingehend interpretiert werden, dass eine ungenügend hohe Fusionsproteinkonzentration in der Mikroumgebung des Tumors zur Verfügung stand. Abbildung 9 (S. 37) stellt die Bindung von CCL19-IgG an ex vivo-Zellen aus einem Behandlungstier der Bindung von CCL19-IgG an ex vivo-Zellen aus einem Kontrolltier gegenüber. Die Bindungen sind vergleichbar stark – unabhängig von der Herkunft der Zellen. Dies könnte darauf hinweisen,

dass die CCR7 Rezeptoren dieser B16 Zellen nicht herunterreguliert wurden, obwohl das bei einer erfolgreichen in vivo Rezeptorstimulation durch CCL19-IgG zu erwarten wäre. CCR7<sup>+</sup> Zellen internalisieren den Chemokinrezeptor CCR7 nach Stimulation mit CCL19 durch Endozytose und machen sich so dem Chemokin gegenüber unempfindlich (Bardi et al., 2001; Otero et al., 2006). Nach intrazellulärer Beseitigung der CCL19-Moleküle zirkuliert CCR7 dann zurück auf die Zelloberfläche. Krautwald et al. (2004) demonstrierten, dass auch die CCL19-IgG-Stimulation zu einer Rezeptorinternalisierung bei HuT-78 Zellen führte.

Wie in der Einleitung erwähnt, ist die Expression von CCR7 auf Tumorzellen mit einer lymphatischen Metastasierung assoziiert, wobei die Chemokine CCL19 und CCL21 einen Gradienten aufbauen, der CCR7<sup>+</sup> Tumorzellen mobilisiert und in die Lymphknoten lockt (Lanati et al., 2010). Es liegt also die Annahme nahe, dass auch durch CCL19-IgG ein solcher Effekt ausgelöst werden kann, der die Zellen zur Migration und vielleicht sogar zur Metastasierung anregt. In Experimenten mit HuT-78 Zellen löste CCL19-IgG bei einer Konzentration von ca. 250 nM (20 µg/ml) eine maximale chemotaktische Aktivität aus (Krautwald et al., 2004), während ein Proliferationshemmeffekt erst bei einer Konzentration von 1 µM (ca. 80 µg/ml) und ein noch stärkerer Effekt bei 2,5 µM (ca. 200 µg/ml) beobachtet wurde (Ziegler et al., 2007). Damit muss in Betracht gezogen werden, dass CCL19-IgG in vivo bei geringer Konzentration die Metastasierung von Tumorzellen begünstigen könnte. Deswegen wurden die Mäuse nach Ende der Tierversuche auch auf Metastasen hin untersucht. Obwohl sich makroskopisch kein Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe ergab, können Unterschiede hinsichtlich einer Mikrometastasierung nicht ausgeschlossen werden. Diese hätten nur histologisch dargestellt werden können. Der Effekt einer durch CCL19-IgG geförderten Metastasierung ist also weiterhin denkbar.

Als Ursache für die fehlende Proliferationshemmung durch CCL19-IgG im Tier könnten ferner atypische Chemokinrezeptoren, auch Decoy-Rezeptoren genannt, einen Erklärungsansatz bieten. Decoy-Rezeptoren sind eine neue Unterfamilie von Chemokin-Rezeptoren, zu denen derzeit DARC, D6, CCX-CKR und CRAM (CCRL2) gezählt werden (Catusse et al., 2010). Nach Bindung eines Liganden findet durch sie keine G-Protein-vermittelte Signaltransduktion statt (Feng et al., 2009). Vielmehr internalisieren sie einfach die Chemokine und agieren damit als „Chemokin-Fänger“. Diese atypischen Chemokin-Rezeptoren sind auf die Chemokin-Sequestrierung spezialisiert mit dem Zweck, die Bioverfügbarkeit von Chemokinen zu regulieren (Hansell et al., 2006). CCX-CKR ist ein solcher Decoy-Rezeptor, der die Chemo-

kine CCL19, CCL21 und CCL25 abfängt (Feng et al., 2009). Murines CCX-CKR ist in den meisten Organen mittels RT-PCR nachweisbar, wobei es vor allem in Herz und Lunge exprimiert wird (Townson und Nibbs, 2002). Damit besteht theoretisch die Möglichkeit, dass CCL19-IgG vermehrt von, gegebenenfalls sogar hochreguliertem, CCX-CKR gebunden, internalisiert und letztlich beseitigt wurde. Tatsächlich berichten Feng et al. (2009) von einem signifikanten Abfall der lokalen CCL19- und CCL21-Konzentrationen bei erhöhter CCX-CKR-Expression in Mäusen. Dafür bestimmten sie per ELISA die Spiegel der Liganden in CCX-CKR-transfizierten vs. nicht-CCX-CKR-transfizierten Xenografts (transfizierte MDA-MB-231 Zellen, einem humanen Mammakarzinom entstammend). Zur Testung der These, ob CCX-CKR ebenfalls die lokale Konzentration von CCL19-IgG signifikant zu senken vermag, bieten sich weitere Experimente an. Zuerst könnte *in vitro* untersucht werden, ob nach Inkubation mit CCL19-IgG dessen Konzentration im Überstand von CCX-CKR-transfizierten Zellen gegenüber Kontrollzellen abnimmt. Wird dies positiv beantwortet, könnten in Anlehnung an Feng et al. (2009) die Fusionsproteinspiegel in Transplanten aus Mäusen nach Gabe von CCL19-IgG versus einem zu generierenden Kontroll-Fusionsprotein (mit humanem Fc-Teil) verglichen werden.

Im Übrigen wurde kürzlich auch für CRAM (CCRL2) gezeigt, dass CCL19 (aber nicht CCL21) als Ligand an diesen Rezeptor bindet (Catusse et al., 2010, Leick et al., 2010). Allerdings besitzt CCL19 eine geringere Affinität zu CRAM als zu CCR7 oder CCX-CKR (Leick et al., 2010). Da auch die Aufgaben dieses Rezeptors bisher nur wenig charakterisiert wurden, kann über einen potenziellen Einfluss von CRAM auf das Ergebnis der Tierversuche nur schwer spekuliert werden.

Möglicherweise wirkten auch in der vorliegenden Arbeit immunmodulierende Effekte von CCR7 der Proliferationshemmung im Organismus entgegen. Wie in der Einleitung beschrieben, spielt CCR7 eine wichtige Rolle in der adaptiven Immunantwort, da der Rezeptor u.a. die Kolokalisation von dendritischen Zellen und naiven T-Zellen steuert. Ziegler et al. (2006) konnten durch Anwendung von CCL19-IgG sogar das Immunsystem soweit unterdrücken, dass eine Transplantatabstoßung in Mäusen ausblieb. Zudem ist das Ergebnis der Tierversuche dieser Arbeit konsistent mit Tierversuchsergebnissen von Krautwald et al. (2004). Hier bildeten transfizierte J558-Tumorzellen, die konstitutiv CCL19-IgG sezernierten, Tumore, die sogar schneller wuchsen als die Tumore der J558-Kontrollzellen. Krautwald et al. (2004) beschreiben, dass dendritische Zellen durch die CCL19-IgG sezernierenden Tumorzellen im

Tumor verblieben und nicht zwecks Antigen-Präsentation in die Lymphknoten migrierten. Dies könnte zu einer Suppression der Immunantwort gegen den Tumor selbst geführt haben.

Grundsätzlich muss also festgehalten werden, dass das Ansprechen von CCR7 im Rahmen einer Tumorthherapie mit einem Widerspruch verbunden ist: der erwünschten Proliferationshemmung steht die ungewollte Immunsuppression entgegen. CCL19-IgG, als ein voller Agonist, kann den Rezeptor nicht differenziell ansprechen, sondern löst alle CCR7-vermittelten Effekte aus.

Die obigen Ausführungen liefern Argumente dafür, den Rezeptor gezielt hinsichtlich der CCR7-vermittelten Proliferationshemmung anzusprechen. Es gilt die Proliferation von Tumoren zu inhibieren, ohne CCR7-abhängige immunologische Effekte (Immunsuppression/T-Zell-Migration) zu provozieren und ohne eine Metastasierung zu fördern. Dafür wurden zwei CCR7-Ligand-Analoga auf einen differenziellen Antagonismus am Rezeptor hin untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Ergebnisse (siehe Abschnitt 3.4) zeigen, dass mit  $\Delta 4$ -CCL21-IgG ein solcher differenzieller Antagonist möglicherweise gefunden wurde. In vitro konnte mit  $\Delta 4$ -CCL21-IgG die Proliferation von Tumorzellen inhibiert werden, während andere Signalwege im Vergleich kaum angesprochen wurden. Dies liefert einen Anhalt dafür, dass durch diesen Antagonisten keine CCR7-vermittelten immunmodulierenden Signale transduziert werden, d.h. aufgrund der fehlenden Induktion einer Chemotaxis auch die Kolokalisation von dendritischen Zellen und T-Zellen nicht direkt gehemmt wird.

An dieser Stelle soll aber nicht unerwähnt bleiben, dass auch mit diesem Liganden eine Beeinflussung des Immunsystems nicht vollständig vermieden werden könnte. Zum einen führte eine Inkubation mit  $\Delta 4$ -CCL21-IgG in vitro zu einer direkten Proliferationshemmung von primären T-Zellen (Abb. 15, S. 43). Zum anderen könnte dieser Ligand in vivo indirekt immunmodulierend wirken, indem er die natürlichen CCR7-Liganden und damit ihre physiologische Wirkung kompetitiv hemmt.

Trotzdem besteht insgesamt die begründete Vermutung, dass ein solcher CCR7-Ligand auch im Organismus einen spezifischeren Effekt als CCL19-IgG bewirken und damit eine Tumorprogression auch in vivo inhibieren könnte. Dieser sollte in weiteren Versuchen in Form einer  $\Delta 4$ -CCL21-IgG Behandlung von syngen Tumoren nachgegangen werden.

Im Hinblick auf die einleitend formulierte Fragestellung ist abschließend festzustellen, dass die Behandlung mit CCL19-IgG zwar keinen Erfolg im Tiermodell zeigte, aber mit  $\Delta 4$ -CCL21-IgG ein vielversprechender Kandidat vorliegt, der in zukünftigen Projekten weiter untersucht wer-

den sollte. Obwohl eine gewisse Unsicherheit bzgl. der Tierversuche darüber besteht, ob CCL19-IgG in ausreichender Menge lokal zugänglich war und gegen die implantierten Tumorzellen wirken konnte, hat CCL19-IgG als voller CCR7-Agonist immer auch einen immunsuppressiven Effekt auf den Organismus. Dagegen konnte mit  $\Delta 4$ -CCL21-IgG ein Ligand identifiziert werden, der eine gleich starke Proliferationshemmung induziert, aber den CCR7 Rezeptor selektiver anspricht. Insbesondere bewirkte  $\Delta 4$ -CCL21-IgG keine CCR7-vermittelte Chemotaxis, die einer Metastasierung oder Immunmodulation förderlich wäre. Dieses CCR7-Ligand-Analogon könnte eine aussichtsreiche Behandlungsstrategie zur Ausnutzung der CCR7-vermittelten Proliferationshemmung bei CCR7<sup>+</sup> Krebserkrankungen darstellen.

## 5 Zusammenfassung

Der Chemokinrezeptor CCR7 und seine Liganden CCL19 und CCL21 spielen eine zentrale Rolle in der Modulation der Immunantwort, da sie die Kolokalisation von T-Zellen und dendritischen Zellen steuern. In den letzten Jahren hat sich außerdem zunehmend die Bedeutung von CCR7 im Zusammenhang mit einer lymphatischen Metastasierung maligner Tumore gezeigt. Demnach können nicht nur Leukozyten sondern auch Tumorzellen den Rezeptor zur Lenkung ihrer Migration nutzen. Insbesondere bei Mammakarzinomen und einigen gastrointestinalen Tumoren ist die Expression von CCR7 als Biomarker im Sinne einer ungünstigen Prognose beschrieben worden. Es existieren erste Behandlungsansätze, über das Ansprechen von Chemokinrezeptoren das Wachstumsverhalten von malignen Tumoren zu beeinflussen. So führte in Vorarbeiten eine CCR7-Aktivierung durch CCL19-IgG, einem Fusionsprotein bestehend aus murinem CCL19 und dem Fc-Teil des humanen Immunglobulins der Klasse G, *in vitro* zur Wachstumshemmung CCR7-positiver Tumorzellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch die Überprüfung im Tiermodell die Frage beantwortet werden, ob das Fusionsprotein CCL19-IgG als Therapeutikum gegen Tumore eingesetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurde die CCL19-IgG-induzierte Proliferationshemmung im syngenem Mausmodell untersucht. Mittels zweier Versuchsreihen, basierend auf zwei verschiedenen CCR7<sup>+</sup> Tumoren, sollte analysiert werden, ob CCL19-IgG einen generellen, inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von CCR7<sup>+</sup> Tumoren ausübt. Ausgewählt wurden die murinen Tumore B16 (malignes Melanom) und LLC (Bronchialkarzinom) als syngene Modelle, die sich beide *in vitro* durch CCL19-IgG in ihrer Proliferation hemmen ließen. Der *in vitro* beobachtete Effekt konnte im Tiermodell nicht bestätigt werden. Als mögliche Ursachen hierfür wurden u.a. Decoy-Rezeptoren oder parallel wirkende immunmodulierende Effekte diskutiert.

Da der Chemokinrezeptor-Agonist CCL19-IgG keine antiproliferative Wirkung *in vivo* zeigte, wurde nach Behandlungsalternativen gesucht, die eine Proliferationshemmung in Tumoren induzieren, ohne aber durch Förderung von Chemotaxis oder anderen CCR7-getriggerten Effekten immunmodulativ zu agieren. Der Einsatz von Chemokinrezeptor-Antagonisten ist eine Methode zum Blockieren der Chemokinwirkung und bietet einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung neuer Therapeutika. Da bekannt ist, dass die chemotaktische Wirkung von Chemokinen im N-Terminus liegt, wurden zwei CCR7-Ligand-Analoga generiert, deren Sequenzen in diesem Bereich trunziert wurden, wobei das für die CC-Chemokine essentielle Cystein-Motiv erhalten blieb. Bei dem Fusionsprotein  $\Delta 6$ -CCL19-IgG wurden

sechs Aminosäuren am N-Terminus, bei dem Fusionsprotein  $\Delta 4$ -CCL21-IgG vier Aminosäuren am N-Terminus über Deletionsmutagenese entfernt. Mit  $\Delta 4$ -CCL21-IgG wurde ein CCR7-Ligand identifiziert, der unter Beibehaltung des Proliferationshemmeffektes andere von CCR7 vermittelte intrazelluläre Signalwege antagonisiert. Insbesondere bewirkt  $\Delta 4$ -CCL21-IgG keine Chemotaxis, die einer Metastasierung oder Immunsuppression förderlich wäre. Möglicherweise stellt speziell dieses Molekül einen neuen Ansatz in der Therapie gegen CCR7-exprimierende Tumore dar. Eine Testung dieses Fusionsproteins in vivo ist gegenwärtig in Vorbereitung.

## 6 Literaturverzeichnis

- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997): Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15, 675-705.
- Balkwill FR (2012): The chemokine system and cancer. *J Pathol* 226(2), 148-57.
- Bardi G, Lipp M, Baggiolini M, Loetscher P (2001): The T cell chemokine receptor CCR7 is internalized on stimulation with ELC, but not with SLC. *Eur J Immunol* 31, 3291-7.
- Boyden SV (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115(3), 453-66.
- Bradford, MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Burger JA, Stewart DJ, Wald O, Peled A (2011): Potential of CXCR4 antagonists for the treatment of metastatic lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 11, 621-30.
- Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, Broglio KR, Hortobagyi GN, Price JE, Sahin A (2005): CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res* 11, 5686-93.
- Catusse J, Leick M, Groch M, Clark DJ, Buchner MV, Zirlik K, Burger M (2010): Role of the atypical chemoattractant receptor CRAM in regulating CCL19 induced CCR7 responses in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer* 9, 297.
- Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD (1995): Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 57, 703-11.
- Craft N, Bruhn KW, Nguyen BD, Prins R, Liao LM, Collisson EA, De A, Kolodney MS, Gambhir SS, Miller JF (2005): Bioluminescent imaging of melanoma in live mice. *J Invest Dermatol* 125(1), 159-65.
- Cronin PA, Wang JH, Redmond HP (2010): Hypoxia increases the metastatic ability of breast cancer cells via upregulation of CXCR4. *BMC Cancer* 10, 225-32.
- Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH (1999): Non-invasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia* 1, 303-10.
- Edinger M, Cao YA, Hornig YS, Jenkins DE, Verneris MR, Bachmann MH, Negrin RS, Contag CH (2002): Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer* 38, 2128-36.
- Fang L, Hwang ST (2009): Roles for CCR7 in cancer biology. In: Fulton AM (Hrsg.) *Chemokine receptors in cancer*. 93-108, Humana Press, New York, NY
- Feng L-Y, Ou Z-L, Wu F-Y, Shen Z-Z, Shao Z-M (2009): Involvement of a novel chemokine decoy receptor CCX-CKR in breast cancer growth, metastasis and patient survival. *Clin Cancer Res* 15, 2962-70.
- Förster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A (2008): CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8(5), 362-71.

- Gong JH, Clark-Lewis I (1995): Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH<sub>2</sub>-terminal residues. *J Exp Med* 181(2), 631-40.
- Günther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W, Förster R (2005): Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *Int J Cancer* 116, 726-33.
- Hansell CA, Simpson CV, Nibbs RJ (2006): Chemokine sequestration by atypical chemokine receptors. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 6), 1009-13.
- Kakinuma T, Hwang ST (2006): Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 79, 639-51.
- Krautwald S, Ziegler E, Forster R, Ohl L, Amann K, Kunzendorf U (2004): Ectopic expression of CCL19 impairs alloimmune response in mice. *Immunology* 112, 301-9.
- Kunzendorf U, Pohl T, Bulfone-Paus S, Krause H, Notter M, Onu A, Walz G, Diamantstein T (1996): Suppression of cell-mediated and humoral immune responses by an interleukin-2-immunoglobulin fusion protein in mice. *J Clin Invest* 97, 1204-10.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lanati S, Dunn DB, Roussigné M, Emmett MS, Carriere V, Jullien D, Budge J, Fryer J, Erard M, Cailler F, Girard JP, Bates DO (2010): Chemotrap-1: an engineered soluble receptor that blocks chemokine-induced migration of metastatic cancer cells in vivo. *Cancer Res* 70, 8138-48.
- Leick M, Catusse J, Follo M, Nibbs RJ, Hartmann TN, Veelken H, Burger M (2010): CCL19 is a specific ligand of the constitutively recycling atypical human chemokine receptor CRAM-B. *Immunology* 129(4), 536-46.
- Lolis E, Murphy JW (2007): The structural biology of chemokines. In: Harrison JK, Lukacs NW (Hrsg.) *The chemokine receptors*. 9-20, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, Matloubian M, Cyster JG. (2002): Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol* 169(1), 424-33.
- Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, Inoue H, Mori M (2002): Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res* 62, 2937-41.
- Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231-8.
- 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 (2001): Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410(6824), 50-6.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000): International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52(1), 145-76.

- Olson TS, Ley K (2002): Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283(1), R7-28.
- Otero C, Groettrup M, Legler DF (2006): Opposite fate of endocytosed CCR7 and its ligands: recycling versus degradation. *J Immunol* 177, 2314-23.
- Ott TR, Lio FM, Olshefski D, Liu XJ, Ling N, Struthers RS (2006): The N-terminal domain of CCL21 reconstitutes high affinity binding, G protein activation, and chemotactic activity, to the C-terminal domain of CCL19. *Biochem Biophys Res Commun.* 348, 1089-93.
- Poste G, Doll J, Hart IR, Fidler IJ (1980): In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Res* 40, 1636-44.
- Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A (2007): Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett* 256(2), 137-65.
- Riches AC, Sharp JG, Brynmor T (1973): Blood volume determination in the mouse. *J Physiol* 228, 279-84.
- Righi E, Kashiwagi S, Yuan J, Santosuosso M, Leblanc P, Ingraham R, Forbes B, Edelblute B, Collette B, Xing D, Kowalski M, Mingari MC, Vianello F, Birrer M, Orsulic S, Dranoff G, Poznansky MC (2011): CXCL12/CXCR4 blockade induces multimodal anti-tumor effects that prolong survival in an immunocompetent mouse model of ovarian cancer. *Cancer Res* 71, 5522-34.
- Ruffini PA, Morandi P, Cabioglu N, Altundag K, Cristofanilli M (2007): Manipulating the chemokine-chemokine receptor network to treat cancer. *Cancer* 109, 2392-404.
- Sánchez-Sánchez N, Riol-Blanco L, Rodríguez-Fernández JL (2006): The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol* 176, 5153-9.
- Sasaki M, Hasegawa H, Kohno M, Inoue A, Ito MR, Fujita S (2003): Antagonist of secondary lymphoid-tissue chemokine (CCR ligand 21) prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *J Immunol* 170, 588-96.
- Schumann K, Lämmermann T, Bruckner M, Legler DF, Polleux J, Spatz JP, Schuler G, Förster R, Lutz MB, Sorokin L, Sixt M (2010): Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity* 32, 703-13.
- Schweickart VL, Raport CJ, Godiska R, Byers MG, Eddy RL Jr, Shows TB, Gray PW (1994): Cloning of human and mouse EBI1, a lymphoid-specific G-protein-coupled receptor encoded on human chromosome 17q12-q21.2. *Genomics* 23, 643-50.
- Takeuchi H, Fujimoto A, Tanaka M, Yamano T, Hsueh E, Hoon DS (2004): CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res* 10, 2351-8.
- Townson JR, Nibbs RJ (2002): Characterization of mouse CCX-CKR, a receptor for the lymphocyte-attracting chemokines TECK/mCCL25, SLC/mCCL21 and MIP-3beta/mCCL19: comparison to human CCX-CKR. *Eur J Immunol* 32, 1230-41.
- Ueda M, Shimada T, Goto Y, Tei K, Nakai S, Hisa Y, Kannagi R (2010): Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 37(4), 488-95.

- Wiley HE, Gonzalez EB, Maki W, Wu MT, Hwang ST (2001): Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* 93, 1638-43.
- Yang J, Wang S, Zhao G, Sun B (2011): Effect of chemokine receptors CCR7 on disseminated behavior of human T cell lymphoma: clinical and experimental study. *J Exp Clin Cancer Res* 30, 51-9.
- Ziegler E, Gueler F, Rong S, Mengel M, Witzke O, Kribben A, Haller H, Kunzendorf U, Krautwald S (2006): CCL19-IgG prevents allograft rejection by impairment of immune cell trafficking. *J Am Soc Nephrol* 9, 2521-32.
- Ziegler E, Oberbarnscheidt M, Bulfone-Paus S, Förster R, Kunzendorf U, Krautwald S. (2007). CCR7 signaling inhibits T cell proliferation. *J Immunol* 179, 6485-93.

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Kunzendorf für die Möglichkeit, im Nephrologischen Forschungslabor eine Promotionsarbeit durchführen zu dürfen, sowie für seine Unterstützung und hilfreichen Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Stefan Krautwald für die Übernahme der Doktorvaterschaft und Überlassung des Themas, sowie seine engagierte und freundliche Betreuung.

Dr. Philip Steen danke ich für seine tatkräftige Hilfe und die vielen Anregungen, die ständige Diskussionsbereitschaft und seine konstruktive Durchsicht dieser Arbeit.

Dr. Kirsten Keyser danke ich für ihre wertvollen Tipps und für ihr kritisches Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein Dank richtet sich auch an alle Mitarbeiter des Nephrologischen Forschungslabors für die freundliche Aufnahme und die Hilfe bei Problemen.

Nicht zuletzt möchte ich herzlich meiner Familie danken, besonders meinem Vater für seine Unterstützung, seinen Zuspruch und schließlich auch für das Korrekturlesen.