

Aus der Klinik für Nieren-und Hochdruckkrankheiten
Direktor: Prof. Dr. med. U. Kunzendorf
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUR CCL19-IgG-VERMITTELTEN
PROLIFERATIONSHEMMUNG VON TUMORZELLEN**

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

vorgelegt von
SANDRA SCHOTT
aus **Speyer**
Kiel **2012**

Erster Berichterstatter:

PD Dr. rer. nat. Stefan Krautwald

Zweiter Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Susanne Sebens

Tag der mündlichen Prüfung:

31.10.2012

Zum Druck genehmigt, Kiel den

16.08.2012

gez. Prof. Dr. med. Thomas Valerius
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chemokinrezeptoren und ihre Liganden	1
1.2	Chemokin-System und maligne Erkrankungen	2
1.3	Physiologische Funktion von CCR7 und seinen Liganden	4
1.4	Die Rolle von CCR7 in Tumorerkrankungen	5
1.5	Fusionsprotein CCL19-IgG als CCR7-Ligand	6
1.6	Fragestellung der Arbeit	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	9
2.1.2	Chemikalien und Kits	11
2.1.3	Mäuse	12
2.1.4	Materialien für die Zellkultur und Zelllinien	12
2.1.5	Antikörper	14
2.1.6	Sonstiges	14
2.2	Methoden	15
2.2.1	Zellkultur	15
2.2.1.1	Kultivierung von Tumorzelllinien	15
2.2.1.2	Isolierung und Kultivierung von primären Tumorzellen	16
2.2.1.3	Zellzahlbestimmung	17
2.2.1.4	Kryokonservierung von Zellen	17
2.2.1.5	Isolierung von murinen T-Lymphozyten	17
2.2.2	Herstellung von CCL19-IgG	19
2.2.2.1	Gewinnung von CCL19-IgG im Überstand transfizierter CHO-Zellen	19
2.2.2.2	Aufreinigung von CCL19-IgG mit Protein A-Sepharose-Beads	20
2.2.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	21
2.2.4	Herstellung von Zelllysaten nach Stimulation mit CCL19-IgG	21
2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
2.2.5.1	Anfärben von Proteingelen mit Coomassie-Blau	23
2.2.5.2	Western Blot-Analyse (Immunoblot)	24
2.2.6	Messung der CCL19-IgG-vermittelten Chemotaxis	25
2.2.7	Bestimmung der CCR7-Expression mittels Durchflusszytometrie	26
2.2.8	Proliferationsbestimmung mit dem BrdU-Proliferationsassay	28
2.2.8.1	Prinzip des BrdU-Proliferationsassays	28
2.2.8.2	Genereller Versuchsaufbau des Proliferationsassays	28

Inhalt

2.2.8.3	Unterschiede im Versuchsaufbau der Proliferationsassays	29
2.2.9	Fotodokumentation des Wachstumsverhalten von Zellen	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Untersuchung des aufgereinigten Fusionsproteins CCL19-IgG	32
3.1.1	Untersuchung des aufgereinigten CCL19-IgG mittels Coomassie-Gel	32
3.1.2	Untersuchung des aufgereinigten CCL19-IgG mittels Western Blot-Analyse	33
3.1.3	Durchflusszytometrische Untersuchung des aufgereinigten CCL19-IgG	34
3.1.4	Untersuchung der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung	36
3.1.5	Untersuchung der CCL19-IgG-vermittelten MAPK-Aktivierung	38
3.1.6	Untersuchung der CCL19-IgG-vermittelten Chemotaxis	39
3.2	Untersuchung der CCR7-Expression und der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung von Tumorzelllinien	40
3.2.1	Untersuchung der CCR7-Expression verschiedener Tumorzelllinien	40
3.2.2	CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung von Tumorzelllinien	42
3.3	Konzentrationsabhängigkeit der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung	45
3.4	Darbietungsform des CCL19-IgG	45
3.4.1	Untersuchung der CCL-19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung unter Nonbinding-Bedingungen	46
3.4.2	Untersuchung der CCL-19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung mit vorbeschichteten Versuchsplatten	49
3.5	Untersuchungen zur klinischen Übertragbarkeit der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung mit primären Tumorzellen	49
3.5.1	Untersuchung primärer Tumorzellen auf ihre CCR7-Expression	50
3.5.2	CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung primärer Tumorzellen	51
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung	58
6	Literaturverzeichnis	59
7	Danksagung	64

Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
AG	Arbeitsgruppe
Aqua dest	<i>Aqua destillata</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
DCs	Dendritische Zellen
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL-Detektion	<i>Enhanced chemiluminescent detection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , fetales Rinderserum
FL	Fluoreszenzkanal
Her2/neu	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
hIgG	Humanes Immunglobulin G
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IAZ	Institut für angewandte Zellkultur
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NSCLC	<i>Non small cell lung cancer</i> , kleinzelliges Bronchialkarzinom
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rlu	<i>Relative light units</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
S.	Seite
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Chemokinrezeptoren und ihre Liganden

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, welche nach ihrer Fähigkeit benannt wurden, Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten anzulocken (Fernandez und Lolis, 2002). Derzeit sind ca. 50 humane Chemokine mit ihren 19 Chemokinrezeptoren bekannt. Ihre Aufgaben sind vielseitig und hängen vom jeweiligen Chemokin ab. Chemokine sind in erster Linie maßgeblich beteiligt an der Entwicklung und Homöostase des Immunsystems (Rossi und Zlotnik 2000) und können in inflammatorische sowie homöostatische Chemokine unterteilt werden. So steuern Chemokine die Leukozytenmigration mittels Chemotaxis (Rollins 1997, Cyster 1999), aber auch die Reifung und Differenzierung von Immunzellen (Kim und Broxmeyer 1999). Sie spielen weiterhin eine Rolle in der Angiogenese, des Tumorwachstums und der Metastasierung (Rossi und Zlotnik 2000, Raman *et al.* 2007). Besonders im Hinblick auf den Einfluss verschiedener Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren im Bereich maligner Erkrankungen und chronisch-entzündlicher Erkrankungen sind Chemokine zurzeit von großem wissenschaftlichen Interesse (Raman *et al.* 2011, Balkwill 2012).

Die strukturelle Einteilung der Chemokine orientiert sich an den ersten beiden konservierten Cysteinresten im Amino-Terminus. Diesbezüglich lassen sich die Chemokine in vier Gruppen einteilen (Zlotnik und Yoshie 2000). C-Chemokine besitzen nur einen, die CC-Chemokine hingegen zwei der konservierten Cysteinreste. Die größte Gruppe bilden die CC-Chemokine (CCL), wobei hier die beiden ersten Cysteinreste direkt nebeneinander liegen. Bei der CXC-Gruppe (CXCL) und der CX3C-Gruppe (CX3CL) werden die beiden Cysteinreste von einer bzw. drei Aminosäuren getrennt. Chemokine sind kleine Proteine mit 70 bis 125 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 8 bis 11 kDa (Kakinuma und Hwang 2006). Sie werden von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, dazu zählen u.a. Makrophagen, dendritische Zellen, T-Lymphozyten, Stromazellen und Endothelzellen (Luster 2002) und vermitteln ihren Effekt über die Bindung an ihre Oberflächenrezeptoren (Chemokinrezeptoren). Chemokine sind promiskuitiv, d.h. viele binden nicht nur spezifisch einen Rezeptor, sondern können auch mehrere Bindungsaffinitäten aufweisen (z.B. aktiviert CCL16 CCR1 und CCR3). Chemokinrezeptoren erkennen mehrere Liganden, sind dennoch spezifisch für Liganden aus einer bestimmten Chemokin-Gruppe. Aus diesem Grund

orientiert sich die Benennung der Chemokinrezeptoren an den jeweiligen Chemokinen. So heißen die CC-Chemokin-bindenden Rezeptoren CCR (1 bis 11). Die Chemokinrezeptoren, welche die CXC-Chemokine erkennen, werden als CXCR (1 bis 6) bezeichnet. Entsprechend ihrer Liganden heißen die beiden anderen Chemokinrezeptoren CX3CR (1) oder XCR (1), wobei hier jeweils nur ein Rezeptor existiert. Chemokinrezeptoren gehören zur großen Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen (Rollins 1997). Die Liganden-Bindung an extrazelluläre Rezeptordomänen führt über Dissoziation des G-Proteins zur Aktivierung zellulärer Signalwege (Thelen 2001). Am Ende dieser Signaltransduktion steht die Aktivierung bzw. Regulierung verschiedener Prozesse im Rahmen der Migration, Degranulation, Aktivierung, Proliferation und Reifung von Zellen (Fernandez und Lolis 2002, Olson und Ley 2002).

1.2 Chemokin-System und maligne Erkrankungen

Der Zusammenhang zwischen Chemokin/Chemokinrezeptor-Interaktionen und Tumoren zeigt sich bereits in der Tumorentstehung (Raman *et al.* 2007). Chronische Entzündungen können über einen gewissen Zeitraum, oft über viele Zwischenschritte und präneoplastische Vorstufen, in maligne Erkrankungen übergehen. Als Beispiele wären hier das Pankreaskarzinom als Folge der chronischen Pankreatitis oder auch das hepatozelluläre Karzinom (HCC) bedingt durch eine Hepatitis-C-Infektion zu nennen (Raman *et al.* 2007). Im Rahmen von Entzündungen werden u.a. Chemokine freigesetzt und proinflammatorische Zellen angereichert, welche die Tumorentstehung und -progression unterstützen. Heute ist bekannt, dass viele Tumorzellen Chemokinrezeptoren exprimieren, obwohl ihre Ursprungszellen dies zuvor nicht taten (Fang *et al.* 2009). Einige Tumorzellen sind außerdem in der Lage, selbst Chemokine freizusetzen. Die Bedeutung der Interaktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren mit Tumorzellen kann auf die physiologischen Wirkungen der Chemokine zurückgeführt werden. Dies bedeutet, dass Chemokine die Tumorzellproliferation, die Invasivität und die Metastasierung (lymphogen oder in andere Organe) fördern können (Raman *et al.* 2007). Ebenso spielen Chemokine eine Rolle in der Regulierung der Angiogenese (Kakinuma und Hwang 2006). CXCL12/CXCR4 und CCL19 bzw. CCL21/CCR7 sind bedeutende Chemokin/Chemokinrezeptor-Paare, die im Zusammenhang mit Tumoren zu nennen sind. CXCR4 ist der am häufigsten von Tumorzellen exprimierte Chemokinrezeptor, z.B. von Melanomen, Prostata-, Mamma-, Ova-

rial-, Pankreas-, Ösophagus- und kolorektalen Karzinomen. Das Vorhandensein des Rezeptors ist häufig assoziiert mit einer Fernmetastasierung in Leber, Lunge und Knochenmark und grundsätzlich mit einer schlechten Prognose (Zlotnik 2006, Raman *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu wird die Expression von CCR7 generell mit der lymphatischen Metastasierung in Zusammenhang gebracht (Balkwill 2012). Neben den genannten Chemokinrezeptoren sind eine Reihe weiterer Chemokinrezeptoren auf Tumorzellen nachgewiesen worden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht der bisher beschriebenen tumorassoziierten Chemokinrezeptoren wieder. Außerdem sind auch autokrine Kreisläufe bekannt, mithilfe derer sich Tumorzellen eine eigenständige Rezeptorstimulation durch gleichzeitige Expression von Chemokinrezeptoren und Chemokinen aufrechterhalten (Wang *et al.* 2006).

Tabelle 1: Expression von Chemokinrezeptoren auf Tumoren

Cancer type	Chemokine receptors expressed by malignant cells
Breast	CXCR4, CXCR7, CCR4, CCR5, CX3CR1, CCR7
High grade serous ovarian	CXCR4
Prostate cancer	CXCR4, CXCR3
Melanoma	CXCR4, CCR10, CCR7, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR3
Oesophageal cancer	CXCR4
Non-small cell lung cancer	CXCR4, CCR7
Head and neck cancer	CXCR4, CCR7, CXCR5
Bladder cancer	CXCR4
Colorectal cancer	CXCR4, CCR6, CCR7, CXCR5
Osteosarcoma	CXCR4
Neuroblastoma	CXCR4
Pancreatic cancer	CXCR4, CX3CR1
Acute lymphoblastic leukaemia	CXCR4, CXCR3
Chronic lymphocytic leukaemia	CXCR4, CCR7, CXCR3
Stomach cancer	CXCR4, CCR7, CCR4
Non-Hodgkin's lymphoma	CCR7
T cell leukaemia	CCR7
Cutaneous lymphoma	CCR3, CCR4, CCR10, CCR7
Hodgkin's lymphoma	CCR5
Multiple myeloma	CCR1
Glioma	CXCR4, CXCR7, CX3CR1, CCR7

modifiziert nach Raman *et al.* 2007 und Balkwill 2012

Dem Einfluss von Chemokinen auf Tumorzellen gilt heute ein großes Interesse. Einerseits könnte die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren als „prognostische Marker“ im Bereich von Tumorerkrankungen und auch immunologischen Erkrankungen eingesetzt werden (Richmond *et al.* 2009). Andererseits besteht die Möglichkeit, darüber neue Therapiestrategien zu entwickeln. Denkbar sind beispielsweise Chemokin-Antikörper und Chemokin-Antagonisten. So existiert z.B. ein CXCR4-Antagonist (Plerixafor, AMD3100), welcher die Bindung von CXCL12

blockiert und darüber die Chemotaxis hemmt. Dieses Medikament wird derzeit im Bereich der Tumorthherapie erprobt, u.a. bei Mammakarzinomen (Smith *et al.* 2004) und Ovarialkarzinomen (Righi *et al.* 2011).

1.3 Physiologische Funktion von CCR7 und seinen Liganden

Der Chemokinrezeptor CCR7 bindet zwei endogene Liganden, CCL19 und CCL21. Im Gegensatz zur Gruppe der inflammatorischen Chemokine, welche auf einen Reiz hin (z.B. Entzündung, Infektion, Verletzung) induziert werden, werden die CCR7-Liganden den homöostatischen Chemokinen zugeordnet. CCL19 und CCL21 werden konstitutiv exprimiert und sind wesentlich beteiligt an der Homöostase des Immunsystems (Förster *et al.* 2008). Die Schlüsselrolle von CCR7 liegt in der Migration und Rezirkulation von T- und B-Lymphozyten sowie dendritischen Zellen (DCs) in lymphatische Organe (Ohl *et al.* 2004). CCR7 ist im Allgemeinen bekannt als „Homing-Rezeptor“ für naive T-Lymphozyten, zentrale Gedächtniszellen (central memory t cells) und DCs in der parakortikale T-Zell-Zone von Lymphknoten. Hier werden CCL19 und CCL21 von Stromazellen exprimiert, und hier findet der direkte Kontakt zwischen naiven T-Lymphozyten und antigen-präsentierenden DCs statt. Dies erlaubt die CCR7-regulierte Kolokalisation von DCs mit naiven T-Lymphozyten und damit die antigen-spezifische Aktivierung der T-Lymphozyten (Förster *et al.* 2008). Naive T-Lymphozyten migrieren über hochendotheliale Venolen in die Lymphknoten (oder auch in andere sekundäre Lymphorgane, z.B. Peyer-Plaques), wobei der komplexe Vorgang der Transmigration durch die Endothelschicht CCR7-gesteuert ist. Dabei binden die Zellen u.a. über CCR7 an die luminalseitig dargebotenen CCL19- und CCL21-Moleküle (Sánchez-Sánchez *et al.* 2006). Ebenso wichtig ist der Chemokinrezeptor CCR7 auf DCs, der allerdings erst nach einer Antigen-Aufnahme von diesen Zellen exprimiert wird. Die Funktion des Rezeptors liegt hier in der Reifung und Mobilisierung der DCs auf ihrem Weg in die Lymphknoten über die zuführenden Lymphgefäße (Endothelzellen exprimieren CCL21). Insgesamt wird postuliert, dass CCR7 über verschiedene Wege die „Kontakt-Wahrscheinlichkeit“ von DCs mit T-Lymphozyten erhöht und damit einen wesentlichen Einfluss auf die Immunantwort hat. Dabei exprimieren DCs auch eigenständig CCL19 (Sánchez-Sánchez *et al.* 2006). Über die Regulierung der Zellmigration lässt sich auch der Einfluss von CCR7 auf die Architektur lymphatischer Organe erklären. Diesbezüglich zeigen Arbeiten mit CCR7-Knockout-Mäusen, dass das Fehlen des Chemokinrezeptors deutliche Verän-

derungen im Aufbau lymphatischer Organe wie Thymus, Lymphknoten und Peyer-Plaques zufolge hat (Ohl *et al.* 2004, Förster *et al.* 2008).

1.4 Die Rolle von CCR7 in Tumorerkrankungen

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass CCR7 von unterschiedlichen Tumorzellen exprimiert wird. Mittlerweile wurde die Expression von CCR7 auf einer Reihe von soliden Tumoren, wie Melanomen, Mamma-, Cervix-, Prostata-, Bronchial- (NSCLC), Pankreas- und kolorektalen Karzinomen sowie auch auf hämatologischen Malignomen (z.B. T-CLL) nachgewiesen. Es wird vermutet, dass eine Expression von CCR7 und anderen Chemokinrezeptoren auf Tumorzellen durch Faktoren wie Zytokin-Stimulation und Hypoxie induziert wird (Fang und Hwang 2009). *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass CCL19 und CCL21 über die Stimulation von CCR7 Migration, Invasion und Proliferation der Tumorzellen fördern (Kodama *et al.* 2007). Dies korreliert in vielen Fällen mit größeren Tumoren und prognostisch ungünstiger Invasions-tiefe (Fang und Hwang 2009).

Ein wichtiger Aspekt der CCR7-vermittelten Funktion in Tumorzellen ist die lymphatische Metastasierung. Die CCR7-gesteuerte Metastasierung in regionäre und periphere Lymphknoten stützt sich in erster Linie auf den Mechanismus der Chemotaxis. Vermutlich werden CCR7-exprimierende Tumorzellen, dem Gradienten folgend, von CCL21 in die Lymphgefäße und über CCL19 und CCL21 in die Lymphknoten „gelockt“ (Fang und Hwang 2009). Lymphknoten sind die häufigsten Orte der Metastasierung und daher von großer Bedeutung, v.a. weil sie häufig im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose der Tumorerkrankung stehen (Kakinuma und Hwang 2006, Fang und Hwang 2009). Experimentelle Arbeiten von Wiley *et al.* (2001) unterstreichen die Abhängigkeit von CCR7 bezüglich der Metastasierung in die regionären Lymphknoten am Beispiel von CCR7-exprimierenden Melanomzellen im Vergleich zu CCR7-negativen Zellen. Ebenso zeigen Arbeiten von Takeuchi *et al.* (2004), dass sowohl Melanomzelllinien als auch primäre Melanomzellen CCR7 exprimieren können und darüber hinaus ein deutlicher Zusammenhang zwischen CCR7-Expression und Tumorgröße sowie Fortschreiten der Erkrankung besteht. Zusätzlich bestehen Hinweise, dass die Produktion von CCL21 von Stromazellen der Lymphknoten nach erfolgter lymphogener Metastasierung herunter reguliert wird. Außerdem können Tumorzellen eigenständig CCL19 und CCL21 in ihre Umgebung sezernieren (autokrine Sekretion). Dieser Mechanismus ermöglicht CCR7-positiven

Tumorzellen, unter Einfluss des langsamen interstitiellen Flüssigkeitsstromes den transzellulären Gradienten aus CCR7-Liganden auszunutzen und schließlich CCR7-gesteuert in die entsprechende Richtung zu migrieren (gezeigt in einer 3D-Matrix, Shields *et al.* 2007).

Begründet im engen Zusammenhang zwischen CCR7-Expression auf Tumoren und lymphatischer Metastasierung wird in aktuellen Studien versucht, CCR7 als einen prädiktiven Biomarker im Rahmen der Tumor-Diagnostik einzuführen, ähnlich wie z.B. Her2/neu beim Mammakarzinom etabliert ist (Günther *et al.* 2005, Cabioglu *et al.* 2005). CCR7 könnte so z.B. die Entscheidung beeinflussen, welche Patienten allein der chirurgischen Tumorthherapie zugeführt werden können bzw. eine Systemtherapie erhalten sollten. Letzteres würde bei einem positiven Nodalstatus oder einem erhöhten Risiko für lymphogene Metastasierung (beispielsweise vorhergesagt durch CCR7-Expression der Tumorzellen) angezeigt sein. Darüber hinaus könnte CCR7 ein möglicher Ansatzpunkt einer gezielten Tumorthherapie darstellen (Raman *et al.* 2011), zumal Patienten mit CCR7-positiven Tumoren auch meist ein schlechteres Gesamtüberleben aufzeigen.

1.5 Fusionsprotein CCL19-IgG als CCR7-Ligand

CCL19-IgG ist ein Fusionsprotein, bestehend aus dem murinen CCL19 und dem Fc-Teil des humanen Immunglobulins der Klasse G₁. Das Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 38,5 kDa als Monomer, wobei es gelöst als Dimer vorliegt. Es wurde von der Arbeitsgruppe generiert (Krautwald *et al.* 2004, Ziegler *et al.* 2006) und mithilfe transfizierter CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) produziert. Der CCL19-Anteil des Fusionsproteins bindet wie der entsprechende native Ligand CCL19 an den Chemokinrezeptor CCR7. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass CCL19-IgG die Proliferation primärer T-Lymphozyten hemmt. Der Mechanismus der Proliferationshemmung ist bisher noch nicht geklärt. Es gibt Hinweise, dass CCL19-IgG mittels CCR7-gesteuerter Signalwege über einen Zellzyklusarrest bzw. eine Verzögerung im Zellzyklus inhibierend auf die Proliferation von T-Lymphozyten wirkt. Die Arbeiten von Ziegler *et al.* (2007) mit T-Lymphozyten zeigen, dass sich CCL19-IgG-behandelte Zellen zu größeren Anteilen in den Zellzyklusphasen G₂/M befinden als unbehandelte Zellen. Nicht nur primäre T-Lymphozyten werden durch CCL19-IgG in ihrer Proliferation gehemmt, sondern auch HUT78-Lymphomzellen (Ziegler *et al.* 2004), welche im starken Maße CCR7 exprimieren (Schweickart *et al.* 1994). Weiter-

hin ist CCL19-IgG in der Lage, wie auch die natürlichen Liganden CCL19 und CCL21, Chemotaxis zu bewirken (Gunn *et al.* 1998, Willmann *et al.* 1998, Krautwald *et al.* 2004). Krautwald *et al.* (2004) zeigen, dass eine Chemotaxis, gemessen an der Migration primärer T-Lymphozyten mit relativ niedrigen CCL19-IgG-Konzentrationen induzierbar ist (maximaler Effekt bei ca. 20 µg/ml) und mit zunehmender Konzentration wieder abfällt (glockenförmige Kurve). Der antiproliferative Effekt konnte von Ziegler *et al.* (2007) nur bei vergleichsweise höheren CCL19-IgG-Konzentrationen (ca. 100 – 200 µg/ml) beobachtet werden.

Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass CCL19-IgG, wie auch der endogene Ligand CCL19, über die CCR7-Stimulation zur G_{αi}-Protein-gekoppelten Aktivierung der MAPK-Kaskade (mitogen-activated protein kinase, ERK1/2) führt (Krautwald *et al.* 2006).

1.6 Fragestellung der Arbeit

Chemokine und ihre korrespondierenden Rezeptoren spielen eine essentielle Rolle bei der gerichteten Migration funktionell unterschiedlicher Untergruppen von T- und B-Lymphozyten sowie dendritischer Zellen in sekundäre lymphatische Organe. Neueste Forschungsergebnisse belegen nun, dass spezielle homöostatische Chemokine und ihre Rezeptoren für die Disseminierung von Tumorzellen in lymphatische Organe von großer Bedeutung zu sein scheinen. Die CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 sind zentrale Vertreter dieser homöostatisch exprimierten Chemokinklasse.

In der vorliegenden Arbeit sollte analysiert werden, welche Arten von Tumorzellen den Chemokinrezeptor CCR7 exprimieren und ob sich die Proliferation dieser Tumore mittels des Fusionsproteins CCL19-IgG genauso effizient hemmen lässt wie die primärer Lymphozyten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tumorzellen zunächst hinsichtlich ihrer CCR7-Expression und Signaltransduktion nach Ligandbindung molekularbiologisch untersucht. Die antiproliferative Wirkung von CCL19-IgG sollte anhand CCR7-positiver Tumore charakterisiert und optimiert werden. Hierfür sollten unterschiedliche Darbietungsformen und Konzentrationen der CCL19-IgG-Zugabe untersucht werden. Außerdem sollten nach primärer Charakterisierung etablierter Tumorzelllinien zwecks klinischer Relevanz auch frisch isolierte Tumorzellen, die unmittelbar aus Patienten entnommen wurden, untersucht werden.

Mithilfe derart gewonnener Ergebnisse sollte letztlich der Frage nachgegangen werden, ob und in welchem Umfang das von der Arbeitsgruppe generierte Fusionsprotein CCL19-IgG einen neuen Behandlungsansatz zur Proliferationshemmung CCR7-exprimierender Tumore darstellen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Laborgeräte

Laborgerät	Modell	Hersteller
Absauggerät	Vacu Safe	Integra Biosciences
Analysewaage	CP 124S-OCE	Sartorius, Göttingen
Blotapparatur	Semi Phor	Hofer/Amersham Biosciences, UK
Brutschrank (CO ₂ -Inkubator)	HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific/ Heraeus, USA
Durchflusszytometer	Coulter Epics XL	Beckmann-Coulter, USA
Durchlichtmikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Göttingen
Einfrierbehälter für Isopropanolbad	Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific/ Nalgene, USA
Filmentwickler	Curix 60	AGFA, Belgien
Fluoreszenzmikroskop mit Kamera	ApoTome	Carl Zeiss, Göttingen
Flüssigstickstoffbehälter	GT40	Air liquid, Österreich
Gefrierschrank -86°C	HERAfreeze	Thermo Fisher Scientific/ Heraeus, USA
Gelelektrophorese-Set	Mighty Small SE 260 II	Hofer/Amersham Biosciences, UK
Heizblockthermostat mit Mischerfunktion	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Luminometer	Victor light 1420	Perkin Elmer, USA
MACS-Säulenständer	Quadro MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer mit Heizung und Magnetfischen	IKA® RH basic 2	Eydam, Kiel
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Multikanal-Pipette (8-Kanal)	Research pro 1200	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Seven easy	Mettler Toledo, Gießen
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences/ GE Healthcare, UK
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	Easypet	Eppendorf, Hamburg

Material und Methoden

Power Supply für Gelelektrophorese	Mighty Slim SX250	Hofer/Amersham Biosciences, UK
Präzisionswaage	CP 4202S	Sartorius, Göttingen
Pumpe für Protein-Aufreinigung	Abinet Minipuls 3	Gilson, Langenfeld
Röntgenkassette	Dr. Goos Suprema	Dr. Goos, Heidelberg
Sterile Werkbank	HERAsafe	Thermo Fisher Scientific/ Heraeus, USA
Trockenschrank	Trockenschrank E28	Binder, Tuttlingen
Vortexer	Vortex Reax Control	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	Inkubationswasserbad GFL	GFL, Burgwedel
Wippschüttler	Rocker 25	Labnet, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Amicon Ultra 15 Centrifugal Filter Device, Membran NMWL 10 kDa	Millipore, Schwalbach
Autoradiographiefilm, Hyperfilm MP	Amersham Biosciences/ GE Healthcare, UK
Chromatographie-Papier, Blot-Paper	GE Healthcare, UK
Durchflusszytometer-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Einfrierröhrchen, Cryo.s (1 ml)	Greiner Bio-One, Solingen
Einmal-Küvetten (1,5 ml halbmikro)	Brand, Wertheim
Einmal-Spritzen, BD Discardit II (10 ml)	Becton Dickinson Heidelberg
Gewebekulturflaschen, Cellstar® (175 cm ² , 75 cm ² , 25 cm ²)	Greiner Bio-One, Solingen
Gewebekulturflaschen, Tissue Culture Flask (grün) (175 cm ² , 50 ml Arbeitsvolumen)	Sarstedt, Nürmbrecht
MACS-LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nitrocellulose Membran, Hybond ECL	Amersham Biosciences/ GE Healthcare, UK
Nonbinding-Versuchsplatten, 96 wells, Flachboden, schwarz	Greiner Bio-One, Solingen
PD-10 Desalting Columns	Amersham Biosciences/ GE Healthcare, UK
Pipettenspitzen, autoklaviert (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen, Biosphere® Filter Tips (1250 µl)	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäße, SafeSeal (1,5 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht

Material und Methoden

Säule für Protein-Aufreinigung, Bio-Rad Econo Column	Bio-Rad, München
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Spritzenfilter, Whatman (Porengröße 0,2 µm)	Whatman/GE Healthcare, UK
Transwell-Systeme für Chemotaxis, 24 wells (Porengröße 5 µm)	Corning Costar, Bodenheim
Vakuum-Sterilfilter, Stericup und Steritop Express Plus (Porengröße 0,22 µm)	Millipore, Schwalbach
Zellkultur-Versuchsplatten: Petrischalen, BD Falcon™ (100 mm) 6 well-Versuchsplatten, BD Falcon™ 96 well-Versuchsplatten, transparenter Flachboden, schwarz 96-well-Versuchsplatten, transparenter Rundboden, schwarz	Becton Dickinson, Heidelberg Becton Dickinson, Heidelberg Nunc, USA Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, Cellstar® (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One, Solingen
Zellsieb, BD Falcon™ (Porengröße 40 µm)	Becton Dickinson Heidelberg

2.1.2 Chemikalien und Kits

Tabelle 4: Chemikalien

Name	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA, Albumin Fraction V	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R 250	Merck, Darmstadt
Eisessig (konzentrierte Essigsäure)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Walter CMP, Kiel
Glycerin	Merck, Darmstadt
Größenmarker für Gelelektrophorese, Precision Plus Protein Standards (Dual Color)	Bio-Rad Laboratories, München
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver, Bio-Rad Blotting Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories, München
Methanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Na ₂ EDTA, Titriplex III	Merck, Darmstadt
Natrium-Orthovanadat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Natriumfluorid (NaF)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyrophosphat	Merck, Darmstadt
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Calbiochem/Merck Darmstadt
Salzsäure (HCl), 25%	Carl Roth, Karlsruhe
SDS (Sodium-Dodecylsulfat)	SERVA, Heidelberg
Stripping Buffer, Restore™ Western Blot	Thermo Fisher Scientific, USA
TEMED (Tetramethylethylendiamid)	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
Triton® X-100 (Octoxinol 9)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

Tabelle 5: Käufliche Kits

Kits (Bestellnummer)	Hersteller
Bio-Rad Proteinassay (500-0006)	Bio-Rad Laboratories, München
Pan T Cell Isolation Kit (130-090-861)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell Proliferation ELISA BrdU (11 669 915 001)	Roche Applied Science, Mannheim
Detection Kit für Westernblotting (32106)	Thermo Fisher Scientific, USA

2.1.3 Mäuse

Tabelle 6: Mäuse

Mäuse	Bezugsquelle
CCR7-Knockout-Mäuse: B6.129P2(C)-Ccr7tm1Rfor/J (mit C57BL/6-Background)	Jackson Laboratories, bezogen über Charles River, Sulzfeld
Kontrollmäuse: C57BL/6	Charles River, Sulzfeld

2.1.4 Materialien für die Zellkultur und Zelllinien

Tabelle 7: Zellkulturmedien

Zellkulturmedien	Hersteller
DMEM (high Glucose, mit L-Glutamin)	PAA Laboratories, Österreich
RPMI 1640 (mit L-Glutamin)	PAA Laboratories, Österreich
ProCHO4 (serumfrei, ohne Phenolrot)	Lonza Group, Belgien
Quantum 263 (ohne L-Glutamin)	PAA Laboratories, Österreich

Tabelle 8: Zellkulturzusätze

Antibiotika, Zellkulturzusätze und andere Zellkulturreagenzien	Hersteller
D-Glucose (45%)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem, Darmstadt
FBS Gold, sterilfiltriert und hitzeinaktiviert	PAA Laboratories, Österreich
FBS Ultra-Low-IgG, sterilfiltriert und hitzeinaktiviert	Gibco BRL, Eggenstein
G-418, Geneticin	PAA Laboratories, Österreich
Hepes-Puffer (1M)	PAA Laboratories, Österreich
Natrium-Bicarbonat (7,5%)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natrium-Pyruvat (100 mM)	PAA Laboratories, Österreich
Penicillin (10.000 U/l), Streptomycin (10 mg/ml), 100x	PAA Laboratories, Österreich
PBS, Phosphatpuffer Dulbecco's PBS (without Ca/Mg)	PAA Laboratories, Österreich
Puromycin (25 mg)	AppliChem, Darmstadt
Trypanblau, Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (0,5%/0,2%) 10x	PAA Laboratories, Österreich

Tabelle 9: Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Bezugsquelle
B16-F10-luc-G5 Bioware® Cell Line	Murines malignes Melanom	Caliper Life Sciences, USA
CHO (CCL19-IgG transfizierter-Klon)	Chinese hamster ovary cells transfiziert von PD Dr. S. Krautwald	ATCC, USA (parentale CHO)
CHP-126	Humanes Neuroblastom	IAZ, München
Daudi	Humanes Burkitt-Lymphom	ATCC, USA
HUT78	Humane T-Lymphomzellen (Sézary-Lymphom)	ATCC, USA
HT29f	Humanes kolorektales Adenokarzinom	ATCC, USA
LLC-GFP	Lewis Lung Carcinoma, murines Bronchialkarzinom, GFP-transfiziert	AntiCancer, USA
MDA-MB 231	Humanes Mamma-Adenokarzinom	ATCC, USA
MM1.s	Humanes multiples Myelom	AG Prof. Valerius, UKSH Kiel
PC3	Humanes Prostata-Adenokarzinom	ATCC, USA
RPMI 8226	Humanes multiples Myelom	ATCC, USA

2.1.5 Antikörper

Tabelle 10: Antikörper und Verwendung

Antikörper	Verwendung	Hersteller (Bestellnummer)
ChromPure human IgG, Gesamtmolekül, unkonjugiert	Isotypkontrolle für CCL19-IgG	Dianova, Hamburg (009-000-003)
Goat Anti-Human-IgG-PE, R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Human-IgG (H+L)	Durchflusszytometrie (CCR7-Expression), 1:100	Jackson Immuno Research Laboratories/Dianova, Hamburg (109-116-088)
Hamster Anti-Mouse-CD3	Proliferationsassay, T-Lymphozyten-Aktivierung, 1:1000	BD Pharmingen, Heidelberg (553057)
Hamster Anti-Mouse-CD28	Proliferationsassay, T-Lymphozyten-Aktivierung, 1:500	BD Pharmingen, Heidelberg (557393)
Goat Anti-Mouse-CCL19/MIP-3 β	Western Blot, Primärantikörper, 1 μ g/ml	R&D-Systems, USA (MAB880)
Goat Anti-Human-IgG-Fcy	Western Blot, Primärantikörper, 1 μ g/ml	Dianova, Hamburg (109-005-098)
Phospho p44/42-MAPK-Mouse-IgG	Western Blot, Primärantikörper, 1:2000	Cellsignaling, USA (9106)
Donkey Anti-Goat-IgG-HRP	Western Blot, Sekundärantikörper, 1:5000	Promega, Mannheim (V8051)
Donkey Anti-Mouse-IgG-HRP	Western Blot, Sekundärantikörper, 1:5000	Acris, Herford (R1348HRP)

2.1.6 Sonstiges

Tabelle 11: Sonstige Materialien und Software

Name	Hersteller
Protein A Sepharose™, Beads für CCL19-IgG-Aufreinigung	Amersham Biosciences/GE Healthcare, UK
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Menzel-Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Software: WinMDI 2.9 (Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten) MS Excel 2007	Joseph Trotter, 2000, USA Microsoft, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator in den entsprechenden Kulturmedien (Tabelle 12) unter sterilen Bedingungen. Alle verwendeten Kulturmedien wurden zusätzlich zum Schutz vor bakterieller Verunreinigung mit Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) versetzt.

Tabelle 12: Zellkulturbedingungen der einzelnen Zelllinien

Zelllinie	a/s*	Kulturmedium	Passage
B16-F10-luc-G5	a	DMEM + 10% FBS, 400 µg/ml G418, 3 µg/ml Puromycin	1:20
CHO (transfizierter-Klon, CCL19-IgG)	a	RPMI 1640 + 10% FBS Ultra-Low-IgG , 400 µg/ml G418 bzw. ProCHO4	1:10, in ProCHO4-kulti- vierte CHO-Zellen 1x/Woche
CHP-126	s	RPMI 1640 + 10% FBS	1:2
Daudi	s	RPMI 1640 + 10% FBS	1:4
HUT78	s	RPMI 1640 + 10% FBS, 1 mM Natrium-Pyruvat, 1,5 g/l Natrium-Bicarbonat, 4,5 g/l D-Glucose, 10 mM Hepes Puffer	1:10
HT29f	a	DMEM + 10% FBS	1:8
LLC	a	DMEM + 10% FBS, 400 µg/ml G418	1:10
MDA-MB 231	a	DMEM + 10% FBS	1:8
MM1.s	s	RPMI 1640 + 10% FBS	1:4
PC3	a	RPMI 1640 + 10% FBS	1:4
RPMI 8226	s	RPMI 1640 + 10% FBS	1:2
* Wachstumsform der Zellen: adhärent (a), in Suspension (s)			

Die Passagierung der adhärennten Zellen erfolgte beim Erreichen der Konfluenz (Monolayerkultur). Hierzu wurden die Zellen nach kurzem Abspülen mit PBS unter Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA von den Kulturflaschen abgelöst, und anschließend wurde die Trypsin-Reaktion mit frischem Kulturmedium neutralisiert. Nach Zentrifugation (300 x g, 10 Minuten, 4°C) und Resuspension der Pellets folgte die Aussaat auf neue Kulturflaschen. Die Verdünnung der Zellen orientierte sich an der jeweiligen Proliferationsrate.

Die Suspensionszellen wurden bei einer Zellzahl von etwa 1×10^6 /ml passagiert. Nach Zellzählung und Zentrifugation (300 x g, 10 Minuten, 4°C) konnten die Zellen im frischen Kulturmedium resuspendiert werden. Für die Aussaat der Suspensionszellen wurde im Allgemeinen eine Ausgangszellzahl von 3×10^5 Zellen/ml gewählt.

2.2.1.2 Isolierung und Kultivierung von primären Tumorzellen

Die primären Tumore wurden freundlicherweise über die Sektion für Molekulare Onkologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein von Prof. Dr. H. Kalthoff zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um Gewebeproben von Tumoren, welche während einer Operation entfernt und noch am gleichen Tag für die Zellkultur aufbereitet wurden. Um eine Zellsuspension herzustellen, wurden die Gewebeproben in eine mit Kulturmedium befüllte Petrischale gelegt und mit dem Stempel einer Spritze zerkleinert. Um eine möglichst homogene Zellsuspension zu erhalten, wurde diese über ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) gegeben. Nach Zentrifugation und Resuspension wurden die Zellen in eine Kulturflasche (25 cm²) mit 7,5 ml Kulturmedium "Quantum 263" pipettiert.

Die Tumorzellen „Malignes Melanom I und II“ wurden über die beschriebene Methode isoliert, wobei die Zellen des „Malignen Melanoms I“ direkt aus einem Hautexzidat stammten und die Zellen des „Malignen Melanoms II“ aus Lebermetastasen gewonnen wurden. Nach fünf Passagen konnten diese in den Experimenten eingesetzt werden.

Die weiteren primären Ovarial-Tumorzellen wurden freundlicherweise aus dem onkologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Kiel von PD Dr. C. Schem zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden zuvor von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom aus Aszites isoliert und über mehrere Passagen kultiviert. Die in dieser Arbeit verwendeten Primärtumorzellen wuchsen adhärent.

Tabelle 13: Zellkulturbedingungen der primäre Tumorzellen

Tumorzellen	Kulturmedium	Aussaat
Malignes Melanom I	Quantum 263 + 10% FBS	1:2
Malignes Melanom II	Quantum 263 + 10% FBS	1:2
Ovarial-Ca I	DMEM + 10% FBS	1:5
Ovarial-Ca II	DMEM + 10% FBS	1:5

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzählung erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde die Zellsuspension mit Trypanblau in einem Verhältnis von 1:2 gemischt und die Zählkammer mit 10 µl bestückt. Es folgte die mikroskopische Zählung der vitalen, d.h. nicht angefärbten, Zellen. Hierzu wurden die vier großen Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen wurden diese zunächst gezählt und mittels Zentrifugation (300 x g, 10 Minuten, 4°C) pelletiert. Im Allgemeinen wurden 5×10^6 Zellen pro Einfrierröhrchen eingefroren. Die einzelnen Zellpellets wurden in 1000 µl unverdünntem FBS resuspendiert und in die zuvor mit 100 µl DMSO bestückten Einfrierröhrchen pipettiert. Anschließend folgte das Einfrieren bei -86°C im Isopropanol-Bad. Für die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff konnten die Einfrierröhrchen nach drei Tagen in die Tanks gestellt werden.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Dabei sollten die Zellen möglichst zügig aufgetaut und dann in 37°C warmes Kulturmedium gegeben werden. Nach Zentrifugation (300 x g, 10 Minuten, 4°C) wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt.

2.2.1.5 Isolierung von murinen T-Lymphozyten

Die Gewinnung primärer T-Lymphozyten erfolgte aus murinen Milzen. In der vorliegenden Arbeit wurden CCR7-positive und CCR7-negative T-Lymphozyten aus C57BL/6 verwendet, wobei letztere aus CCR7-Knockout-Mäusen (Förster *et al.* 1999) isoliert wurden. Dazu wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet. Es folgte die Organentnahme. Anschließend wurden die Milzen zusammen mit etwas RPMI 1640 + 10% FBS in einer Petrischale mit dem Stempel einer Spritze zerdrückt. Um größere Zellaggregate zurückzuhalten und um möglichst eine homogene Zellsuspension zu erzielen, wurde die Suspension über ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach Zentrifugation (300 x g, 15 Minuten, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das Pellet kurz aufgeschüttelt. Um die Erythrozyten aus dem Zellgemisch zu entfernen, schloss sich die hypoosomolare Erythrolyse durch Zugabe von ACK-Lysepuffer an.

<u>ACK-Lysepuffer</u>		<u>MACS-Puffer</u>	
0,15 M	NH ₄ Cl	2 M	EDTA
1 mM	KHCO ₃	0,5%	BSA
0,1 mM	Na ₂ EDTA		PBS
pH 7,4, sterilfiltrieren			

Die Zellsuspension wurde mit 20 ml ACK-Lysepuffer vermischt und zehn Minuten auf Eis inkubiert, danach mit MACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (300 x g, 15 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20 ml MACS-Puffer resuspendiert, um die Zellzahl zu bestimmen (s. Abschnitt 2.2.1.3).

Prinzip der magnetischen Zellseparation:

Für die Isolierung bestimmter Zellen (hier: T-Lymphozyten) aus einer Zellpopulation kann man sich die Expression charakteristischer Oberflächenantigene zunutze machen. Bei der magnetischen Zellseparation (Magnetic Activated Cell Sorting; MACS, Miltenyi *et al.* 1990) werden spezifische Antikörper gegen Oberflächenantigene mit magnetischen Partikeln gekoppelt. Bei der anschließenden Verwendung einer magnetischen Trennsäule werden die mit Antikörpern-markierten Zellen zurückgehalten, die nicht-markierten Zellen durchlaufen die Säule ungehindert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein „Pan T Cell Isolation Kit“ von Miltenyi Biotec verwendet, welches auf der Basis der negativen Selektion (Depletion) die T-Lymphozyten isoliert. Dieses Kit markiert „Non-T-Lymphozyten“, wie z.B. B-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, dendritische Zellen, Makrophagen und Granulozyten mit einem Gemisch aus Biotin-gekoppelten Antikörpern gegen CD45R, DX5, CD11b und Ter-119. Durch die Zugabe von magnetischen Anti-Biotin-MikroBeads werden so die markierten „Non-T-Lymphozyten“ auf der MACS-Säule zurückgehalten, während die nicht-markierten T-Lymphozyten aufgefangen werden. Die nächsten Schritte folgten den Angaben des Herstellers.

Zuerst wurden die Zellen mit dem Biotin-Antikörper-Gemisch für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Dafür wurden die Zellen nach der Zentrifugation komplett vom Überstand befreit und mit 40 µl kaltem MACS-Puffer aufgeschwemmt. Bei einer Gesamtzellzahl von z.B. 1×10^7 Zellen wurden entsprechend 10 µl Biotin-Antikörper-Gemisch hinzu pipettiert. Für die Markierung mit den magnetischen Beads wurden dem Ansatz 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin-MikroBeads zugegeben. Im Anschluss an die Inkubation von 15 Minuten auf Eis wurden die Zellen dreimal mit 1ml MACS-Puffer aufgefüllt und über 15 Minuten zentrifugiert (300 x g, 4°C). Nun

wurde das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und in die MACS-LS-Säule gegeben. Dabei befand sich die Säule bereits im Magnetständer, sodass die nicht-markierten T-Lymphozyten im Durchfluss mithilfe eines Zentrifugenröhrchens depletiert werden konnten. Anschließend wurden die isolierten T-Lymphozyten mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die T-Lymphozyten in RPMI + 10% FBS bis zur zeitnahen Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.2 Herstellung von CCL19-IgG

Die Herstellung des Fusionsproteins CCL19-IgG gliederte sich methodisch in folgende zwei Schritte:

- 1) Gewinnung des Fusionsproteins aus dem Überstand transfizierter CHO-Zellen
- 2) Proteinreinigung mithilfe der Affinitätschromatographie über Protein A-Sepharose-Beads

Die stabil-transfizierten CHO-Zellen (Ziegler *et al.* 2006, Ziegler *et al.* 2007) produzieren CCL19-IgG als Exportprotein und wurden für diese Arbeit von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

2.2.2.1 Gewinnung von CCL19-IgG im Überstand transfizierter CHO-Zellen

Für die Herstellung von CCL19-IgG mussten die CHO-Zellen in dem speziellen ProCHO4-Kulturmedium kultiviert werden. Mithilfe dieses Kulturmediums lassen sich höhere Proliferationsraten und größere Mengen des sezernierten Fusionsproteins erzielen. Wichtig ist für die spätere Aufreinigung (s. Abschnitt 2.2.2.2) der Gebrauch von serum- bzw. IgG-freien Kulturmedien. Zunächst wuchsen die CHO-Zellen in DMEM + FBS Ultra-Low-IgG bis zur vollständigen Konfluenz in einer 175 cm²-Zellkulturflasche heran. Dem Kulturmedium wurde das Antibiotikum G-418 (400 µg/ml) hinzugefügt, um nur den CCL19-IgG-transfizierten Klon selektiv anzuzüchten. Schließlich konnten die CHO-Zellen (durchschnittlich $2,5 \times 10^7$ Zellen pro Zellkulturflasche) nach „Trypsinierung“ und Zentrifugation auf eine Kulturflasche mit 50 ml Fassungsvermögen in ProCHO4 ohne FBS ausgesät werden. Der Zellüberstand wurde nicht wie üblich verworfen, sondern für die spätere CCL19-IgG-Aufreinigung bei -20°C gelagert. Im ProCHO4-Medium produzierten die CHO-Zellen in größeren Mengen CCL19-IgG und wuchsen unter den serumfreien Bedingungen nicht mehr adhärent. Nachdem die CHO-Zellen bei 37°C etwa sieben Tage kultiviert wurden, konnte der Zellüberstand mit dem enthaltenen CCL19-IgG gewonnen werden. Um den Überstand von den Zellen zu trennen, wurde die Zellsuspension zentrifugiert

(300 x g, 10 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde anschließend sterilfiltriert (Vakuum-Sterilfilter), um eine vollständige Zellfreiheit zu erzielen. Anschließend folgte die Lagerung bei -20°C oder direkt die Aufreinigung des CCL19-IgG.

2.2.2.2 Aufreinigung von CCL19-IgG mit Protein A-Sepharose-Beads

Mithilfe der Affinitätschromatographie konnte das Fusionsprotein aus dem Überstand der CHO-Zellen aufgereinigt werden.

Prinzip der Affinitätschromatographie mit Protein A-Sepharose:

Protein A ist ein bakterielles Zellwandprotein, welches über eine hohe Affinität zum Fc-Teil von Immunglobulinen verfügt. Die Bindungsaffinität verändert sich pH-abhängig. Dies macht man sich bei Aufreinigung von Proteinen zunutze. Die zu isolierenden Immunglobuline werden an die Protein A-Sepharose-Beads gebunden. Mittels pH-Verschiebung vom neutralen in den sauren Bereich lassen sich die separierten Immunglobuline nun eluieren, da sich die Bindungsaffinität von Protein A vermindert.

Um das Fusionsprotein CCL19-IgG aus dem Zellüberstand zu isolieren, wurde der Überstand gemeinsam mit den Protein A-Sepharose-Beads (Bindungskapazität: 10 mg/ml) für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation musste der Überstand bei 4°C über ein Schlauchsystem mithilfe einer Pumpe kontinuierlich in die Econo-Säule überführt werden. Schließlich befanden sich die Beads (mit dem gebundenen CCL19-IgG), separiert vom Zellüberstand, auf der Säule. Als nächster Schritt folgte die Trennung der Beads vom gebundenen CCL19-IgG über die Verschiebung pH-Wertes in den sauren Bereich. Dies wurde über Zugabe von 4,5 ml Glycin-HCl (0,1 M, pH 2,4) erreicht. Zur raschen pH-Neutralisierung wurden anschließend 500 µl TRIS-HCl (2 M, pH 8) hinzugegeben. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt, um möglichst das gesamte CCL19-IgG von den Beads abzulösen. Die Konzentration des CCL19-IgG in der Lösung wurde im Anschluss durch Einengen auf ein geringeres Volumen erhöht. Hierzu wurde die Proteinlösung mithilfe eines Amicon-Röhrchens (Millipore) bis zum Zielvolumen von 2,5 ml bei 2500 x g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Konzentrat wurde abschließend mittels PD-10-Säule auf Phosphatpuffer (PBS) umpuffert. Nach vorheriger Spülung der PD-10-Säule mit PBS wurde die CCL19-IgG-Lösung in die Säule gegeben. Dabei verblieb das CCL19-IgG im Filter der PD-10-Säule, wobei der Puffer verworfen werden konnte. Das CCL19-IgG konnte dann mit 3,5 ml PBS gelöst und mit einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen werden. PBS fungiert als „Lösungsmittel“ bzw. als Vehikel von

CCL19-IgG. Abschließend wurde das aufgereinigte CCL19-IgG sterilfiltriert, die Konzentration (s. Abschnitt 2.2.3) bestimmt und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert. Das CCL19-IgG wurde nach seiner Aufreinigung routinemäßig auf seine Qualität, Spezifität und Wirkung untersucht. Diesbezüglich wurden folgende Analysen durchgeführt: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung, durchflusszytometrische Untersuchungen und Proliferationsassays mit CCR7-positiven HUT78-Zellen sowie Chemotaxis-Assays mit T-Lymphozyten.

2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mithilfe eines kommerziellen Färbereagens (Bio-Rad Proteinassay) vorgenommen. Die Proteine bilden Komplexe mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau. Die Absorptionzunahme kann bei 595 nm photometrisch gemessen werden. Der Proteingehalt wird anschließend anhand einer standardisierten Kalibriergeraden berechnet, die entsprechend des Herstellerprotokolls unter Verwendung von BSA erstellt wurde.

2.2.4 Herstellung von Zelllysaten nach Stimulation mit CCL19-IgG

Für dieses Experiment wurden HUT78-Zellen auf eine 6-well-Versuchsplatte mit einer Zellzahl von $1 \times 10^6/2 \text{ ml}$ ($5 \times 10^5/\text{ml}$) in HUT-Medium ohne FBS ausgesät. Nach der Kultivierung bei 37°C für 24 Stunden im Brutschrank erfolgte die Zugabe von CCL19-IgG in der finalen Konzentration von $200 \mu\text{g/ml}$. Als Kontrolle diente PBS. Zur Stimulation mit CCL19-IgG wurden die HUT78-Zellen im Brutschrank für zehn Minuten inkubiert. Die Zellen wurden aus dem well in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 4°C kaltem PBS aufgefüllt. Nach der Zentrifugation ($300 \times g$, 10 Minuten, 4°C) konnten die Lysate der Zellen hergestellt werden. Dafür wurden die Pellets in $100 \mu\text{l}$ Lysepuffer inklusive der Protease-Inhibitoren PMSF ($0,1 \text{ mM}$) und Aprotinin ($1,5 \mu\text{M}$) sowie des Phosphatase-Inhibitors Natrium-Orthovanadat ($0,1 \text{ mM}$) aufgeschwemmt. Unter Schütteln wurden die Zellen bei 4°C für zehn Minuten lysiert. Es schloss sich die Zentrifugation ($10.000 \times g$, 10 Minuten, 4°C) in der Mikrozentrifuge (5417 R, Eppendorf) an, um die löslichen Proteinanteile zu isolieren. Daraufhin konnte der Überstand abpipettiert und dessen Proteinkonzentration (s. Abschnitt 2.2.3) ermittelt werden. Schließlich wurde die Proteinlösung mit $1/5$ Probenpuffer (5x) und 5% 2-Mercaptoethanol versehen und in einem Reaktionsgefäß für fünf Minuten

bei 95°C auf dem Heizblock unter Schütteln denaturiert. Daraufhin wurden 20 µg des Proteins in Probenpuffer auf ein Polyacrylamidgel (s. Abschnitt 2.2.5) aufgetragen.

<u>Lysepuffer (pH 7)</u>		<u>Probenpuffer nach Laemmli (5x)</u>	
10 mM	TRIS	7,81 ml	2M TRIS
50 mM	Natriumchlorid	17,19 ml	20% SDS
30 mM	Natriumpyrophosphat	25 ml	Glycerin
50 mM	Natriumfluorid	6,25 mg	Bromphenolblau
1%	Triton X-100	(erwärmen und mischen)	

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Gelelektrophorese wurde primär zur Untersuchung des aufgereinigten CCL19-IgG eingesetzt: 1) als Kontrolle nach jeder Aufreinigung für die anschließende Coomassie-Blaufärbung, 2) zur Analyse des Fusionsproteins im Western Blot über die Verwendung von spezifischen Antikörpern.

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Vor der elektrophoretischen Auftrennung müssen die Proteine denaturiert und ihre Eigenladung durch die Zugabe von SDS mit einer negativen Ladung überdeckt werden. Die Aufhebung der Sekundär- und Tertiärstruktur erfolgt mittels Erhitzen der Proteingemische auf 95°C gemeinsam mit SDS. Zusätzlich werden bestehende Disulfidbrücken durch die Zugabe von reduzierendem 2-Mercaptoethanol gespalten. Diese Vorbehandlung gewährleistet, dass die Auftrennung der Proteine in der anschließenden Elektrophorese allein auf ihrer Größe basiert. Als Trennmedium wird ein Polyacrylamidgel verwendet, in dem die negativ geladenen Proteine bei angelegter Spannung zur Anode wandern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE angewendet. Hier werden zwei Gele eingesetzt, welche sich in ihrer Acrylamid-Konzentration und ihrem pH-Wert unterscheiden. Das Sammelgel ist aufgrund des geringeren Gehalts an Acrylamid „weitporiger“ als das Trenngel. Es wird initial zum Sammeln der Proteine an der Grenzfläche zum Trenngel eingesetzt. Erst im Trenngel beginnt die eigentliche Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld.

<u>Sammelgelpuffer (4x, pH 6,8)</u>		<u>Trenngelpuffer (4x, pH 8,8)</u>	
125 ml	2M TRIS- HCl	375 ml	2M TRIS-HCl
10 ml	20% SDS	10 ml	20% SDS
ad 500 ml	Aqua dest	115 ml	Aqua dest

Laufpuffer mit SDS

3 g	TRIS
14,4 g	Glycin
2,5 ml	20% SDS
ad 1 l Aqua dest	

Sammelgel (3% Acrylamid)

400 µl	30% Bisacrylamid
1 ml	4x Sammelgelpuffer
2,6 ml	Aqua dest
40 µl	10% APS
8 µl	TEMED

Trenngel (12% Acrylamid)

4 ml	30% Bisacrylamid
2,5 ml	4x Trenngelpuffer
3,5 ml	Aqua dest
100 µl	10% APS
10 µl	TEMED

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei vertikale Glasplatten gegossen und zusätzlich mit 0,2% SDS überschichtet. Nach Polymerisierung des Trenngels konnte die 0,2%-SDS-Lösung abgekippt und das Sammelgel hinzu pipettiert werden. Zusätzlich wurde ein Probenkamm in das noch flüssige Sammelgel gesetzt, um die späteren Geltaschen zu erhalten. Das Gel konnte nach erfolgter Polymerisierung in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und diese daraufhin mit Laufpuffer gefüllt werden. Schließlich wurden die Geltaschen mit den vorbereiteten Proteingemischen bestückt. Die eingesetzte Proteinmenge pro Geltasche betrug jeweils 20 µg für die Proteingemische aus Zelllysaten sowie jeweils 1 µg für CCL19-IgG bzw. humanes Immunglobulin (Coomassie-Gel und Western Blot). Zur späteren Abschätzung der Proteingröße wurde ein Proteinmarker mit bekannten Molekulargewichtstandards mitgeführt. Es folgte die Elektrophorese für ca. 20 Minuten im Sammelgel bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel, bis die Proteine eine scharfe Linie an der Grenze zum Trenngel bildeten. Daraufhin wurde die Elektrophorese bei 40 mA pro Gel weitergeführt, bis die „Bromphenolblaufront“ der Proben das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

2.2.5.1 Anfärben von Proteingelen mit Coomassie-Blau

Die Coomassie-Blau-Färbung ermöglicht die Darstellung aufgetrennter Proteine im Gel. Das Gel wurde dazu für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Coomassie-Blau-Färbelösung inkubiert und für etwa 12 Stunden in 10%iger Essigsäure entfärbt, bis schließlich das Gel wieder farblos und nur noch die Blaufärbung der Proteine sichtbar war.

Coomassie-Blau-Färbelösung

150 mg	Coomassie-Blau (G 250)
500 ml	Methanol
420 ml	Aqua dest
80 ml	Eisessig

2.2.5.2 Western Blot-Analyse (Immunoblot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung des Proteingemisches in einzelne Proteinbanden werden diese auf eine Membran übertragen, um sie dann mithilfe von Antikörpern zu detektieren. Der Transfer der Proteine erfolgt über ein senkrecht angelegtes elektrisches Feld auf eine Nitrocellulose-Membran über das Semidry-Verfahren. Bei dieser Methode liegt das Polyacrylamidgel auf der Membran, beide befinden sich wiederum zwischen zwei Chromatographie-Papieren.

Für das Western Blot-Verfahren wurden alle Komponenten zuvor mit Laufpuffer (ohne SDS, 1x) befeuchtet und luftblasenfrei in die Blotapparatur gelegt. Es folgte das Blotten für 70 Minuten bei einer Stromstärke von 70 mA pro Gel.

Laufpuffer ohne SDS (10x)

30,3 g	TRIS
144,2 g	Glycin
900 ml	Aqua dest

Nach erfolgtem Transfer musste die Membran fünfmal (jeweils fünf Minuten) bei Raumtemperatur in TBS gewaschen werden. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu vermeiden, wurde die Membran zur Absättigung der freien Bindungsstellen für zwei Stunden in einer Blockierungslösung geschwenkt. Die anschließende Immunodetektion über die Primärantikörper gefolgt von Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern wurde entsprechend der Herstellerprotokolle durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran fünfmal (jeweils fünf Minuten) in TBS-T gewaschen und die Peroxidase-gekoppelten Immunkomplexe wurden mithilfe der Chemilumineszenz-Reaktion detektiert. Hierfür wurde ein Detection Kit von Thermo Fisher Scientific gemäß der Herstellerangaben verwendet. Schließlich wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm in einer Röntgenkassette fünf Minuten inkubiert, bevor der Röntgenfilm schließlich im Entwicklergerät Curix 60 (AGFA) entwickelt wurde. Bei schwacher Reaktion wurde die Membran versuchsweise länger mit dem Röntgenfilm inkubiert.

TBS (10x, pH 7,6)

48,4 g TRIS
160 g NaCl
ad 2 l Aqua dest

TBS-Tween (TBS-T)

0,1% Tween 20
TBS

Blockierungslösung

0,5 g Magermilchpulver
10 ml TBS-T

Um die Membran gegebenenfalls erneut mit einem anderen Antikörper zu inkubieren, musste diese von den zuvor gebundenen Antikörpern befreit („gestrippt“) werden. Dafür wurde zunächst die Membran dafür in TBS-T gewaschen, um diese dann für zehn Minuten im Stripping-Buffer (Thermo Fisher Scientific) bei Raumtemperatur zu schwenken. Nach anschließendem Waschen in TBS-T konnte der entsprechende Primärantikörper, wie bereits zuvor beschrieben, auf die nun „gestrippte“ Membran gegeben werden.

2.2.6 Messung der CCL19-IgG-vermittelten Chemotaxis

Als Chemotaxis wird die gerichtete Migration von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten bezeichnet. Das Fusionsprotein CCL19-IgG besitzt wie auch die natürlichen CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 die Fähigkeit, Chemotaxis zu induzieren (Krautwald *et al.* 2004, Ziegler *et al.* 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CCL19-IgG-vermittelte Chemotaxis von T-Lymphozyten gemessen. Die vergleichende Verwendung von CCR7-positiven und CCR7-negativen T-Lymphozyten sollte zeigen, dass CCL19-IgG tatsächlich nur CCR7-positive Zellen anlocken kann. Außerdem wurde die Messung der Chemotaxis auch zur Aktivitätsprüfung des aufgereinigten Fusionsproteins CCL19-IgG herangezogen.

Prinzip des Chemotaxisassays (Migrationsassay):

Dem Chemotaxisassay liegt das Prinzip der Migration von Zellen durch eine Membran in Richtung des chemotaktischen Stimulus zugrunde. Der in dieser Arbeit verwendete Migrationsassay (Boyden 1962) funktioniert über ein Transwell-System (Costar, Bodenheim). Dieses System besteht aus zwei Kammern, wobei die Zellen von der oberen Kammer über eine Membran (Porengröße 5 µm) in die untere Kammer, welche das Chemokin enthält, wandern. Die Migration der Zellen kann anschließend mithilfe der durchflusszytometrischen Zählung quantifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die isolierten T-Lymphozyten aus Wildtyp-Mäusen (CCR7-positive Zellen) und CCR7-Knockout-Mäusen (CCR7-negative Zellen) verwendet. Die Bestückung der oberen Kammer erfolgte mit 1×10^6 Zellen in 100 μ l RPMI und 1% BSA. CCL19-IgG wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (s. Abb. 9, S. 39) in 600 μ l RPMI und 1% BSA in die untere Kammer gegeben. Schließlich erfolgte die Inkubation der Zellen im Transwell-System für drei Stunden bei 37°C im Brutschrank. Zur Auswertung des Migrationsassays wurde das Medium aus der oberen Kammer abpipettiert und verworfen. Die Unterseite des oberen Wells wurde mit 400 μ l PBS abgespült und zusammen mit dem Inhalt der unteren Kammer in ein Durchflusszytometer-Röhrchen pipettiert. Die migrierten Zellen konnten nun durchflusszytometrisch bestimmt werden. Dabei wurde das Durchflusszytometer „Coulter Epics XL“ von Beckman-Coulter verwendet und für 30 Sekunden bei mittlerer Durchflussstärke gezählt.

2.2.7 Bestimmung der CCR7-Expression mittels Durchflusszytometrie

In der vorliegenden Arbeit wurde die CCR7-Expression auf Zellen mithilfe durchflusszytometrischer Analysen bestimmt. Umgekehrt konnte man sich dieses Verfahren zur Überprüfung des aufgereinigten CCL19-IgG zunutze machen. Hier wurde mithilfe CCR7-positiver HUT78-Zellen untersucht, ob das aufgereinigte Fusionsprotein an den CCR7-Rezeptor binden kann.

Prinzip der Durchflusszytometrie:

Zellen können mithilfe der Durchflusszytometrie anhand ihrer unterschiedlichen Streulichteigenschaften und emittierter Fluoreszenzstrahlung (über Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper) analysiert werden. Das Prinzip der durchflusszytometrischen Untersuchung basiert auf der Emission von Licht, wenn Zellen einen Laserstrahl (z.B. Argon-Ionen-Laser, 488 nm) passieren. Dabei ist es wichtig, dass die Zellen möglichst als Einzelzellsuspension in einem Flüssigkeitsstrom zugeführt werden (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung). Beim Passieren der Lichtquelle streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das Vorwärtstreulicht (FSC, forward scatter) wird in der Längsachse (Winkel 3-10°) des einfallenden Lichts gemessen und korreliert mit der Zellgröße. Das Seitwärtstreulicht (SSC, side scatter) ist proportional zur Komplexität der Zellen (Granularität) und wird senkrecht zum einfallenden Licht detektiert. Zur erweiterten Analyse können die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-

fen (Fluorochrome) markiert werden. Trifft Laserstrahlung auf Fluorochrome, wird die Lichtenergie absorbiert und dabei werden Photonen mit einer größeren Wellenlänge unter Energieverlust frei (Emission). Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wird im Durchflusszytometer mithilfe von Filtern und Spiegeln in die Spektren aufgeteilt, um es dann von photosensitiven Detektoren in den Fluoreszenzkanälen (FL1/grün, FL2/orange-rot, FL3/rot) zu messen, zu verstärken und schließlich in elektrische Signale umzuwandeln. In der vorliegenden Arbeit wurden PE-(Phycoerythrin) gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Das Absorptionsmaximum für PE liegt bei 565 nm und das Emissionsmaximum bei 578 nm. Im verwendeten Durchflusszytometer „Coulter Epics XL“ wurde das emittierte Licht schließlich im Fluoreszenzkanal FL2 bei 575 nm gemessen.

In dieser Arbeit wurde für die Durchflusszytometrie auf das Fusionsprotein CCL19-IgG zurückgegriffen, welches gewissermaßen als Primärantikörper diente. Das Prinzip liegt hier bei der Ligand-Rezeptor-Bindung, d.h. CCL19-IgG bindet über seinen CCL19-Anteil an CCR7. Diese Bindung konnte im Anschluss mithilfe eines PE-gekoppelten Sekundärantikörpers gegen humanes Immunglobulin sichtbar gemacht werden. Die Messung der fluoreszierenden CCR7-positiven Zellen wurde der Messung der unmarkierten Zellen (Kontrollen) gegenübergestellt.

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die Zellen gezählt und entsprechend auf die Durchflusszytometer-Röhrchen verteilt. Pro Zellart wurden drei Röhrchen mit je 4×10^5 Zellen bestückt. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer (PBS + 5% FBS, 4°C) folgte die Inkubation der Zellen mit CCL19-IgG (2 µg/100 µl), humanem Immunglobulin (Isotypkontrolle, 2 µg/100 µl) bzw. PBS (Vehikel, 100 µl) für 30 Minuten auf Eis. Zweimaliges Waschen mit 2 ml eiskaltem Puffer (Zentrifugation bei 300 x g, 10 Minuten, 4°C) beendete die Inkubation. Der nächste Schritt war die Zugabe des Sekundärantikörpers Goat Anti-Human-IgG-PE (1:100, 100 µl in eiskaltem Puffer) in alle Röhrchen und die erneute Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis. Anschließend mussten die Zellen zweimal mit eiskaltem Puffer gewaschen und zentrifugiert werden. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen im 500 µl Puffer resuspendiert. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer „Coulter Epics XL“, die Bearbeitung der Daten und deren graphische Darstellung wurden anschließend mithilfe der Software WinMDI 2.9 durchgeführt.

2.2.8 Proliferationsbestimmung mit dem BrdU-Proliferationsassay

Der Einfluss von CCL19-IgG auf die Zellproliferation wurde mithilfe des BrdU-Proliferationsassays („Cell Proliferations ELISA, BrdU[®]-Kit, Roche) gemessen.

2.2.8.1 Prinzip des BrdU-Proliferationsassays

Bei dem Assay handelt es sich um einen Chemilumineszenz-Immunoassay. Ihm liegt das Prinzip des Einbaus von Bromdesoxyuridin (BrdU) in die DNA proliferierender Zellen zugrunde. BrdU ist ein synthetisches Analogon des Thymidins. Es kann in die Zellen aufgenommen und in phosphorylierter Form schließlich während der Synthesephase des Zellzyklus anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in den neu entstehenden Synthesestrang eingebaut werden. Eine anschließende Fixierung macht die Zellen zugänglich für den enzymgekoppelten Antikörper (Anti-BrdU-POD[®]) und führt gleichzeitig zur Denaturierung der DNA. Es entsteht ein Immunkomplex, der über die gekoppelte Peroxidase mittels nachfolgender Reaktionen detektiert werden kann. Hier bedient man sich der Zugabe des Peroxidase-Substrates Wasserstoffperoxid, welches die Oxidation des parallel zugegebenen Luminols katalysiert (Chemilumineszenzreaktion). Die oxidierten Luminol-Moleküle sind sehr energiereich und zerfallen über weitere Reaktionsprodukte in den Grundzustand. Dabei werden Photonen emittiert, welche schließlich mit einem Luminometer gemessen werden können. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der DNA-Synthese über den Einbau des BrdU und der aus der Messung resultierenden „relative light units“ (rlu) pro Sekunde. Da das BrdU nur in proliferierende Zellen eingebaut wird, ist es mit dieser Methode möglich, die Proliferation von Zellen zu quantifizieren und darüber Aussagen über stimulierende oder hemmende Faktoren auf das Zellwachstum zu machen.

2.2.8.2 Genereller Versuchsaufbau des Proliferationsassays

1) Aussaat der Zellen: Für die Untersuchung der CCL19-IgG vermittelten Proliferationshemmung wurden die Tumorzellen in schwarzen 96-well-Versuchsplatten mit Flachboden bzw. T-Lymphozyten auf 96-well-Versuchsplatten mit Rundboden zusammen mit CCL19-IgG inkubiert. Als Kontrolle diente hier zusätzlich PBS (Vehikel des CCL19-IgG) und als Isotypkontrolle humanes IgG (Teil des Fusionsproteins). Für jede Versuchsbedingung wurden in der Auswertung aus vier Ansätzen Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Grundsätzlich wurden adhärente Zellen mit einer Zellzahl von 1×10^4 /well, Suspensionszellen mit 2×10^4 /well und primäre

T-Lymphozyten mit 1×10^5 /well zeitgleich mit CCL19-IgG oder Kontrollen ausplattiert. Als Ausnahme wurde für die eher langsam wachsenden HT29f die doppelte Menge an Zellen eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben, betrug die Konzentration von CCL19-IgG und hIgG (Isotypkontrolle) 200 µg/ml. Die eingesetzte Menge PBS (Vehikel) orientierte sich entsprechend am verwendeten Volumen von CCL19-IgG. Das Gesamtvolumen lag bei 100 µl/well (90 µl Zellen in Kulturmedium und 10 µl CCL19-IgG bzw. Vehikel oder hIgG). Es folgte die Inkubation bei 37°C.

2) Zugabe von BrdU: Im Mittel wurde 12 Stunden vor Ende des Assays BrdU in einer finalen Konzentration von 10 µM zu den Zellen gegeben. Die Gesamtinkubationsdauer belief sich auf 48 Stunden. Abweichungen sind unter den jeweiligen Abbildungen vermerkt.

3) Beendigung des Assays und Auswertung: Für die Messung der Zellproliferation wurden die Versuchsplatten zentrifugiert (300 x g, 10 Minuten), abgeschlagen und schließlich im Trockenschrank für ca. eine Stunde getrocknet. Es folgte die Auswertung des Proliferationsassays entsprechend der Herstellerangaben des Testkits und die abschließende Lumineszenz-Messung im Luminometer „Victor light 1420“ (Perkin Elmer). Die gemessenen Werte (vier Werte pro Versuchsbedingung) wurden gemittelt und zusammen mit den Standardabweichungen unter Verwendung von MS Excel graphisch dargestellt. Zur Bewertung des Mittelwertunterschiedes gegenüber der Vehikelkontrolle wurde der Student's t-Test (zweiseitig) herangezogen. Das erreichte Signifikanzniveau wurde in den Diagrammen angezeigt (* für p-Wert < 0,05; ** für p-Wert < 0,01).

2.2.8.3 Unterschiede im Versuchsaufbau der Proliferationsassays

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Proliferationsassays mit unterschiedlichen Fragestellungen eingesetzt, welche sich im Versuchsaufbau unterschieden:

- Überprüfung der CCL19-IgG-Aufreinigung bezüglich der biologischen Aktivität mit HUT78-Zellen (s. Abb. 1A)
- Bestimmung der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung von Tumorzellen (s. Abb. 1A) und primären T-Lymphozyten (s. Abb. 1B)
- Untersuchung beeinflussender Faktoren der CCL19-IgG-Wirkung, d.h. Konzentrationsabhängigkeit (s. Abb. 1A) sowie Darbietungsform von CCL19-IgG mit

FBS-beschichteten Versuchsplatten (für adhärente Zellen, s. Abb. 1C) und mit Nonbinding-Versuchsplatten (für Suspensionszellen, s. Abb. 1D)

Das folgende Diagramm soll die Unterschiede im Versuchsaufbau der einzelnen Proliferationsassays schematisch darstellen. Die jeweiligen Assays unterschieden sich dabei im Versuchsansatz, während der Versuchsablauf ab der BrdU-Zugabe und Auswertung mittels „Cell Proliferation ELISA, BrdU-Kit“ identisch war.

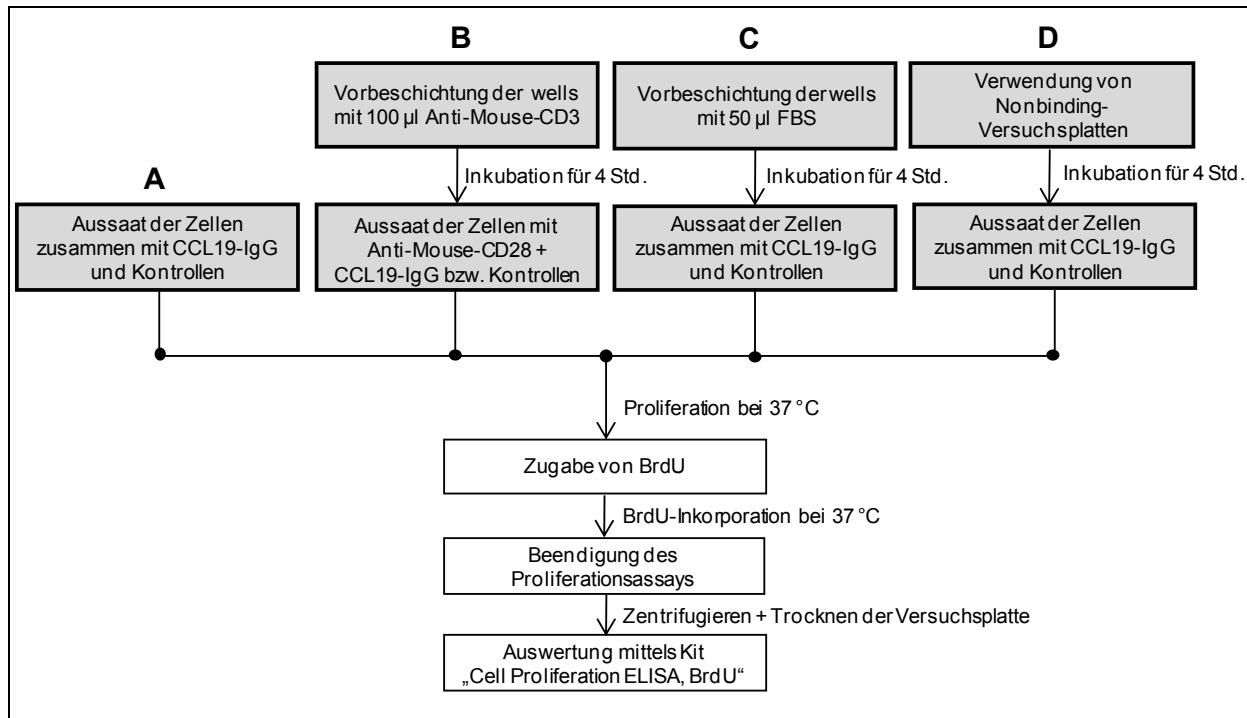


Abb. 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Versuchsaufbauten der durchgeführten Proliferationsassays. (A) gibt den üblichen Versuchsablauf der Proliferationsassays mit Tumorzellen (Zelllinien oder primäre Zellen) wieder. Hier wurden die Zellen zeitgleich mit CCL19-IgG (bzw. Vehikel oder hIgG) auf die 96-well-Versuchsplatten mit Flachboden gegeben. (B) zeigt den Versuchsaufbau der Proliferationsassays mit T-Lymphozyten. Voraussetzung für die Proliferation der T-Lymphozyten ist die Aktivierung mit Anti-Mouse-CD3 (vorgebunden) und Anti-Mouse-CD28 (direkt zur Zellsuspension gegeben). Es wurden 1×10^5 T-Lymphozyten/well auf 96-well-Versuchsplatten mit Rundboden ausgesät und insgesamt 72 Stunden inkubiert. (C) zeigt den Versuchsaufbau mit FBS-vorbeschichteten wells (s. Abschnitt 3.4.2) und (D) mit Nonbinding-Versuchsplatten (s. Abschnitt 3.4.1). Die Aufbauten von (C) und (D) wurden für die Untersuchung der Darbietungsform von CCL19-IgG gewählt und sollten die Immobilisierung des CCL19-IgG auf den Versuchsplatten verhindern.

Abbildung 1A zeigt die übliche Vorgehensweise eines Proliferationsassays zur Untersuchung der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung von Tumorzelllinien und primären Tumorzellen. Ebenso wurde auch die Überprüfung des aufgereinigten Fusionsproteins CCL19-IgG hinsichtlich seiner Aktivität mithilfe von HUT78-Zellen, welche bekanntermaßen eine Wachstumshemmung durch CCL19-IgG aufzeigten, entsprechend des hier abgebildeten Versuchsablaufs getestet (s. Abb. 6, S. 36).

Für die Untersuchung der primären T-Lymphozyten in Proliferationsassays (s. Abb. 1B, S. 30; Abb. 7, S. 37) mussten diese vorab zur Proliferation angeregt werden. Dies erfolgte über Stimulation des T-Zell-/CD3-Rezeptors und Kostimulation des CD28-Rezeptors mithilfe entsprechender Antikörper. Anti-Mouse-CD3 musste zuvor auf der Versuchsplatte (mit Rundboden) in 100 µl/well (1:1000) für 4 Stunden vorgebunden werden. Im Anschluss daran, mussten die Versuchsplatten mit PBS abgespült werden. Anti-Mouse-CD28 konnte dem Zellkulturmedium der T-Lymphozyten in einer Verdünnung von 1:500 direkt dazugegeben werden. Die Aussaat der T-Lymphozyten erfolgte auf 96-well-Versuchsplatten in einer Zellzahl von 1×10^5 /well. Die Zellen wurden vorab mit CCL19-IgG oder Vehikel bzw. hlgG und Anti-Mouse-CD28 im Kulturmedium vermischt und davon je 100 µl pro well pipettiert. Die Gesamtdauer der Proliferationsassays mit T-Lymphozyten betrug 72 Stunden, wobei den Zellen 24 Stunden vor Beendigung des Proliferationsassays BrdU zugegeben wurde.

In Abbildung 1C und 1D sind die beiden verwendeten Verfahren zur Immobilisierung von CCL19-IgG in Proliferationsassays dargestellt: Zum einen die Aussaat der Zellen gemeinsam mit CCL19-IgG nach vorheriger Vorbeschichtung der Versuchsplatte mit Serumproteinen (FBS), zum anderen die Verwendung von Nonbinding-Versuchsplatten anstelle üblicher 96-well-Versuchsplatten. Während in der erstgenannten Methode vorhandene Bindungsstellen der wells mit Protein abgesättigt werden, verfügen Nonbinding-Versuchsplatten laut Hersteller definitionsgemäß über keinerlei Bindungsmöglichkeiten für Proteine.

2.2.9 Fotodokumentation des Wachstumsverhalten von Zellen

Parallel zum BrdU-Proliferationsassay konnten die Zellen während der Behandlung mit CCL19-IgG auch lichtmikroskopisch (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss) betrachtet werden. Zur Fotodokumentation mussten die Zellen jedoch auf 6-well-Versuchsplatten zusammen mit CCL19-IgG bzw. Vehikel ausplattiert werden, da die im Labor verfügbare Kamera des Mikroskops (ApoTome, Carl Zeiss) nicht im Bereich der 96-well-Versuchsplatten funktionierte. Für die Fotodokumentation wurden 3×10^5 Zellen/well in 2 ml Kulturmedium mit CCL19-IgG (finale Konzentration 200 µg/ml) bzw. Vehikel auf 6-well-Versuchsplatten ausgesät. Nach 17-stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C wurden die Bilder mit einer 50- oder 100-fachen Gesamtvergrößerung erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des aufgereinigten Fusionsproteins CCL19-IgG

In diesem Abschnitt sollen die Eigenschaften des Fusionsproteins CCL19-IgG v.a. im Hinblick auf die Beschaffenheit, Spezifität und Wirkung dargestellt werden. Diese Ergebnisse sollen zur Charakterisierung des Fusionsproteins beitragen. Außerdem wurden diese Untersuchungen zur Qualitätskontrolle der Proteinaufreinigung (s. Abschnitt 2.2.2) herangezogen und waren Voraussetzung für die anschließende Verwendung in den Experimenten mit Tumorzellen. Als Basis der folgenden Untersuchungen wurden T-Lymphozyten aus murinen Milzen und zusätzlich HUT78 als eine humane Tumorzelllinie gewählt.

3.1.1 Untersuchung des aufgereinigten CCL19-IgG mittels Coomassie-Gel

CCL19-IgG hat ein berechnetes Molekulargewicht von 38,5 kDa (Monomer) und besteht nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus drei Komponenten, d.h. es handelt sich um kein homogenes Molekül. Im Coomassie-Gel zeigte sich ein reproduzierbares Muster aus drei Banden. Im Vergleich dazu weist humanes IgG lediglich zwei Banden auf (s. Abb. 2).

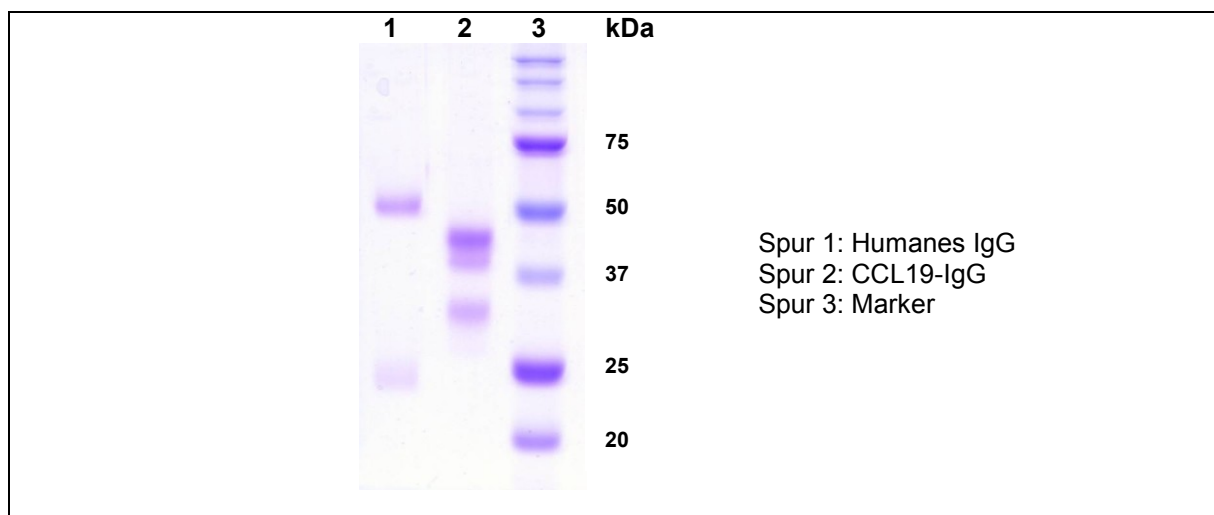


Abb. 2: Coomassie-Gel des aufgereinigten CCL19-IgG. Dargestellt ist ein 12%iges Gel mit jeweils 1 µg humanem IgG oder CCL19-IgG. Das Fusionsprotein CCL19-IgG zeigt im Coomassie-Gel typischerweise drei Banden. Für das hIgG ergeben sich zwei Banden, wobei die Bande bei ca. 25 kDa der leichten Kette und die Bande bei ca. 50 kDa der schweren Kette des IgG entspricht.

3.1.2 Untersuchung des aufgereinigten CCL19-IgG mittels Western Blot-Analyse

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das aufgetrennte Fusionsprotein mittels Western Blot weitergehend untersucht. Mittels zweier Antikörper sollten die Banden des aufgetrennten CCL19-IgG in seinen beiden Komponenten zugeordnet werden. Zunächst wurde die Membran mit einem Antikörper, welcher gegen das Fc-Fragment des humanen IgG (Goat Anti-Human-IgG-PE) gerichtet ist, gefärbt. Diesbezüglich zeigt Abbildung 3 (links), dass sich die Immunglobulin-Komponenten auf alle aufgetrennten Proteinbanden des Fusionsproteins verteilen. Für den Nachweis des CCL19-Anteils des Fusionsproteins wurde die Membran mit einem Antikörper gegen CCL19 (Anti-Mouse-CCL19/MIP-3 β) inkubiert. Demnach sind die CCL19-Anteile des Fusionsproteins nur in den beiden oberen Banden (s. Abb. 3, rechts) zu finden. Entsprechend stellt sich in der mitgeführten Kontrolle (humanes Immunglobulin) nur eine Bande nach Inkubation mit dem gegen das Fc-Fragment des humanen Immunglobulins gerichteten Antikörpers dar.

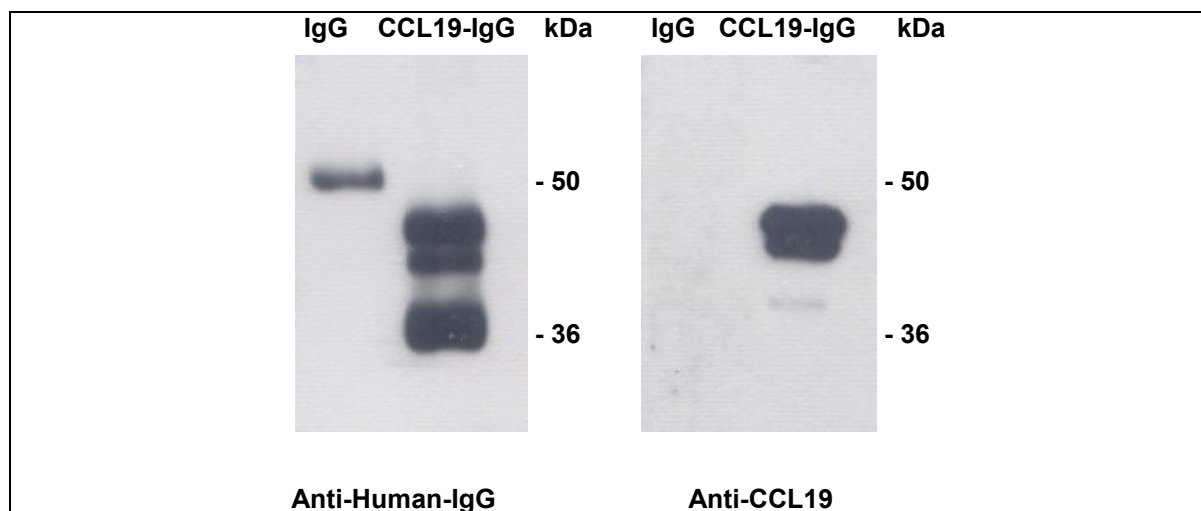


Abb. 3: Western Blot von CCL19-IgG im Vergleich zum humanen IgG markiert mit Anti-CCL19 und Anti-Human-IgG. Der abgebildete Western Blot wurde zunächst mit einem Antikörper gegen humanes IgG (Anti-Human-IgG) gefärbt. Nach Strippen des Western Blots, wurde dieser erneut mit einem Antikörper gegen CCL19 (Anti-CCL19) angefärbt. Als zweiter Antikörper wurde in beiden Fällen Anti-Goat-IgG-HRP verwendet. Das aufgetrennte CCL19-IgG zeigt in allen drei Banden IgG-Anteile, jedoch nur in den beiden oberen Banden lässt sich die CCL19-Komponente nachweisen.

3.1.3 Durchflusszytometrische Untersuchung des aufgereinigten CCL19-IgG

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Rezeptoren auf Zellen nachweisen. Das Fusionsprotein CCL19-IgG bindet wie auch die natürlichen Liganden CCL19 und CCL21 an seinen korrespondierenden Rezeptor CCR7. Arbeiten von Krautwald *et al.* (2004) zeigen, dass CCL19-IgG nicht mehr binden konnte, nachdem die CCR7-Rezeptoren zuvor mit CCL19 abgesättigt wurden. Dies bestätigt, dass CCL19-IgG nur über die CCL19-Komponente an den Rezeptor CCR7 bindet. Um zusätzlich sicherzustellen, dass keine Bindung über den IgG-Anteil des Fusionsproteins an die Zelloberfläche erfolgt, wurde bei jeder durchflusszytometrischen Untersuchung eine Kontrolle mit humanem IgG zum Vergleich mitbestimmt. Führt humanes IgG bereits zu einer Bindung, wie es beispielsweise beim Vorhandensein von Fc-Rezeptoren der Fall wäre, könnte das Fusionsprotein ebenfalls über den IgG-Anteil binden und nicht ausschließlich über CCL19 an CCR7. Diese spezifische Bindung von CCL19-IgG an CCR7 kann man sich auch hinsichtlich der Überprüfung des aufgereinigten Proteins zunutze machen, da dieses entsprechend an CCR7-positive Zellen binden muss. Als CCR7-positive Zellen wurden isolierte T-Lymphozyten aus murinen Milzen und HUT78 eingesetzt.

Abbildung 4 zeigt die Bindung von CCL19-IgG an die CCR7-exprimierende humane T-Zelllinie HUT78. Hier führte die Inkubation von CCL19-IgG in der durchflusszytometrischen Untersuchung zu einem deutlichen Shift, d.h. CCL19-IgG bindet an die Rezeptoren CCR7 der HUT78-Zellen.

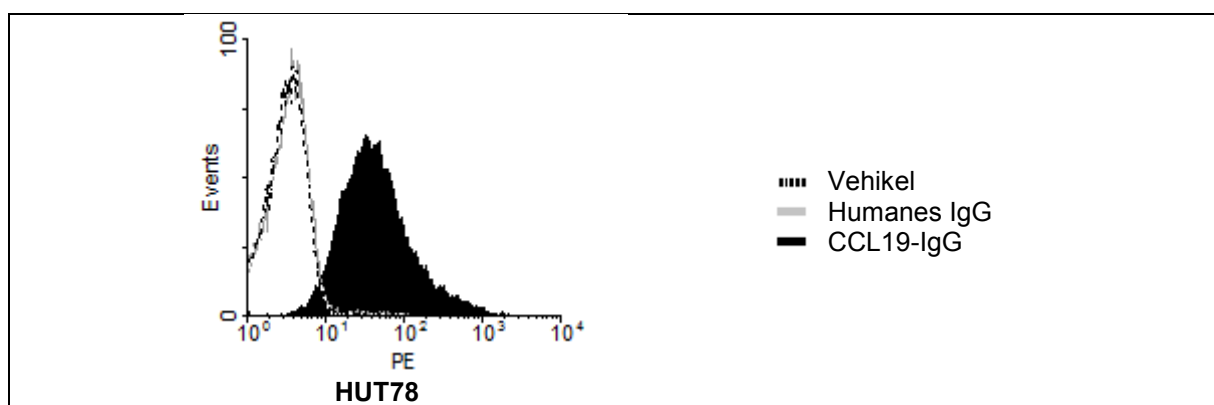


Abb. 4: CCL19-IgG-Bindung an HUT78 mittels Durchflusszytometrie. Die Bindung von CCL19-IgG an HUT78-Zellen bewirkt eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals.

Im Gegensatz zur Tumorzelllinie HUT78 handelt es sich bei primären T-Lymphozyten um nicht-transformierte Zellen, welche physiologisch einen hohen Besatz an CCR7

haben. Über der Verwendung von T-Lymphozyten konnte mittels zusätzlicher Isolierung von T-Lymphozyten aus Knockout-Mäusen ein direkter Vergleich zwischen CCR7-positiven und CCR7-negativen Zellen gemacht werden. In Abbildung 5 ist die Bindung von CCL19-IgG an murine T-Lymphozyten dargestellt. Die Inkubation mit CCL19-IgG induziert im Falle der CCR7-positiven T-Lymphozyten einen starken Shift, der im Kontrast zum deutlich geringeren Shift des Fluoreszenzsignals der CCR7-negativen T-Lymphozyten steht. Das Fusionsprotein CCL19-IgG bindet somit spezifisch an den Rezeptor CCR7.

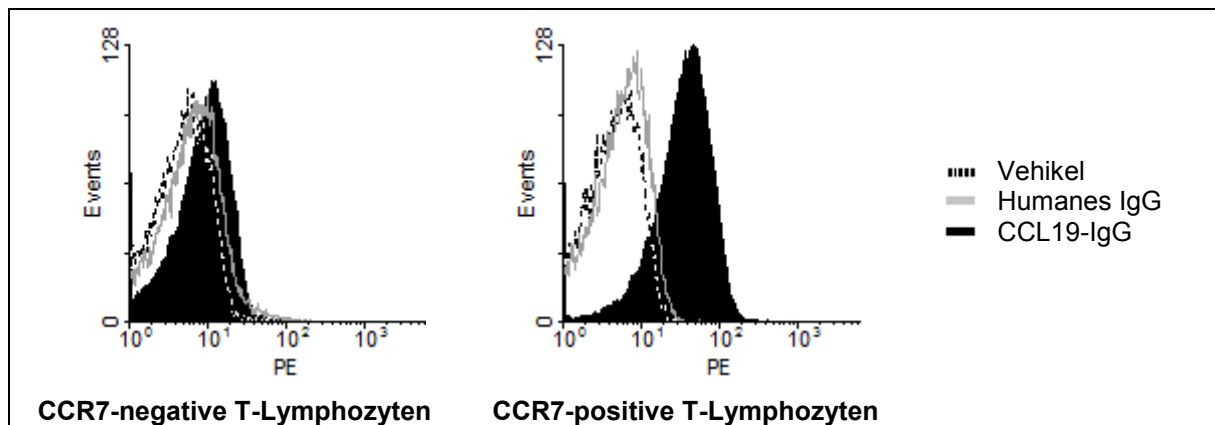


Abb. 5: CCL19-IgG-Bindung an T-Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie. Die T-Lymphozyten aus Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) zeigen im Gegensatz zu T-Lymphozyten aus CCR7-Knockout-Mäusen nach Inkubation mit CCL19-IgG einen deutlichen Shift.

3.1.4 Untersuchung der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung

Die Proliferation von Tumorzellen und auch von T-Lymphozyten wird durch die Zugabe von CCL19-IgG gehemmt (Krautwald *et al.* 2004). Die Proliferationshemmung von Zellen lässt sich mittels BrdU-Proliferationsassay messen. Wie oben dargestellt, binden sowohl die HUT78-Zellen als auch die primären T-Lymphozyten CCL19-IgG. In diesem Abschnitt soll nun der Effekt des CCL19-IgG auf die Proliferation dieser Zellen untersucht werden. Hierzu zeigt Abbildung 6 die signifikante Proliferationshemmung der HUT78-Zellen nach Zugabe von CCL19-IgG. Im Vergleich zur Kontrolle (Vehikel) weisen die CCL19-IgG inkubierten HUT78-Zellen eine Proliferationshemmung von etwa 70% auf.

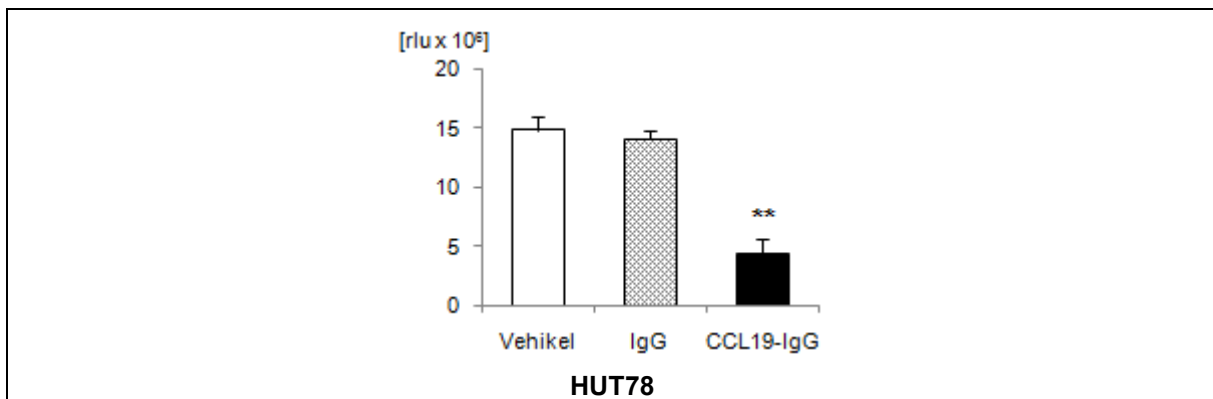


Abb. 6: CCL19-IgG vermittelte Proliferationshemmung von HUT-Zellen. HUT78 zeigen eine deutliche Proliferationshemmung nach CCL19-IgG-Zugabe im Vergleich zu Vehikel (PBS) und humanem IgG in äquimolarer Menge (** $p < 0,01$). Versuchsdauer: 48 Stunden, davon 12 Stunden mit BrdU; Zellzahl: 1×10^4 /well.

Für die Untersuchung der Proliferation von T-Lymphozyten müssen diese zuvor stimuliert werden. Ohne Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit Anti-CD3 und Kostimulation mit Anti-CD28 proliferieren die T-Lymphozyten nicht und integrieren somit kein BrdU in ihre DNA (vgl. „unstimuliert“ in Abb. 7). Die erforderliche Stimulation wurde hierfür über die gesamte Versuchsdauer von 72 Stunden aufrechterhalten. Es fällt auf, dass sich die beiden Typen von T-Lymphozyten, unabhängig von der Inkubation mit CCL19-IgG, in der Proliferationsrate unterscheiden. Die Zellen aus den Wildtyp-Mäusen proliferieren im Vergleich zu den Zellen aus den Knockout-Mäusen doppelt so stark. Die Anwesenheit von CCL19-IgG bewirkt jedoch nur bei den CCR7-positiven T-Lymphozyten aus den Wildtyp-Mäusen eine deutliche Proliferationshemmung. Diese Hemmung liegt bei 80% im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS (Vehikel). Die CCR7-negativen T-Lymphozyten zeigen hingegen keine signifikante Proliferationshemmung. Der beobachtete Effekt des CCL19-IgG lässt sich somit nur bei vorhandener CCR7-Expression nachweisen.

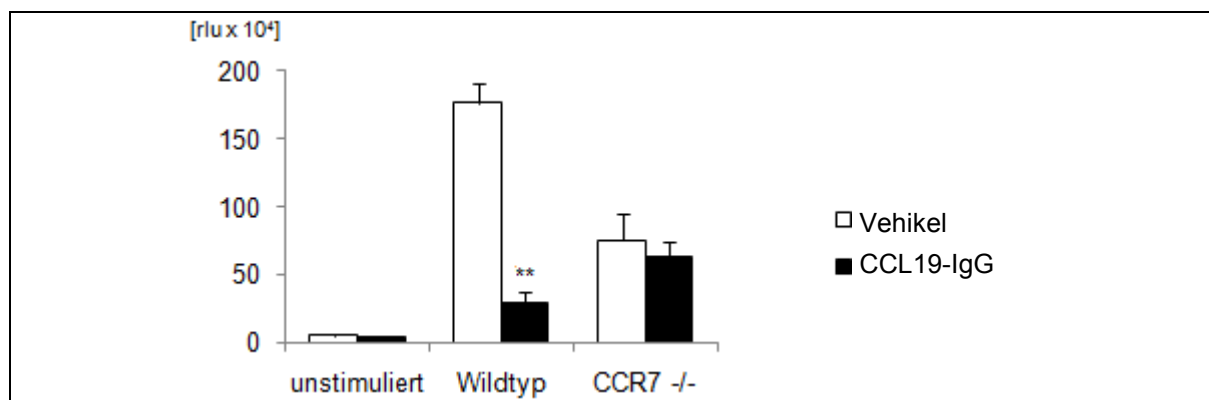


Abb. 7: CCL19-IgG vermittelte Proliferationshemmung CCR7-positiver T-Lymphozyten (Wildtyp-Maus) versus CCR7-negativer T-Lymphozyten (CCR7^{-/-} Maus). Unstimulierte T-Lymphozyten (ohne Stimulation des T-Zell-Rezeptors mit Anti-Mouse-CD3 und Anti-Mouse-CD28) zeigen keine Proliferation. Die CCL19-IgG-Zugabe bewirkt bei CD3/CD28-stimulierten T-Lymphozyten aus Wildtyp-Mäusen eine deutliche Proliferationshemmung (** p < 0,01). CCR7-negative T-Lymphozyten lassen sich nicht in ihrer Proliferation hemmen. Versuchsdauer: 72 Stunden, davon 24 Stunden mit BrdU; Zellzahl: 1 x 10⁵/well.

3.1.5 Untersuchung der CCL19-IgG-vermittelten MAPK-Aktivierung

Interaktionen mit dem Chemokinrezeptor CCR7 führen zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK 1 und ERK 2 (p44/42). Die Arbeiten von Krautwald *et al.* (2004) zeigen, dass eine Stimulation des Rezeptors mit seinem Liganden CCL19 (rekombinantes CCL19) zu einer Phosphorylierung der MAPK führt. Den gleichen Effekt kann man mit äquimolarer Menge von CCL19-IgG induzieren.

Somit kann der Nachweis der Phosphorylierung von ERK 1 und 2 auch zur Einschätzung der biologischen Aktivität des Fusionsproteins CCL19-IgG genutzt werden. Hierzu wurden HUT78-Zellen verwendet, die nach 24-stündiger Serumdeprivation für zehn Minuten mit CCL19-IgG inkubiert wurden. Es folgte die Auftrennung der zellulären Proteine mittels SDS-PAGE und anschließendem Westernblotting. Zur Detektion phosphorylierter ERK 1/2 wurde der Antikörper Anti-Phospho-p44/42 MAPK eingesetzt.

Abbildung 8 zeigt den Nachweis der CCL19-IgG-induzierten MAPK-Aktivierung durch das Vorhandensein von ERK1/2. Bei den nur mit PBS inkubierten Zellen sind diese Banden nicht zu finden. Diese Aktivierung zeigt somit die biologische Wirksamkeit des CCL19-IgG an.

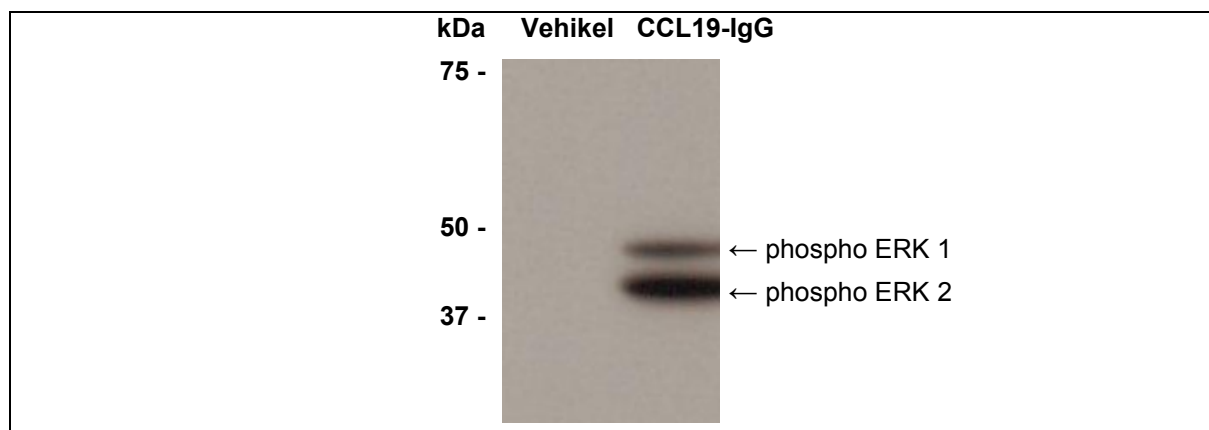


Abb. 8: Western Blot der ERK 1/2-Stimulation mit CCL19-IgG von HUT78. Aufgetragen sind HUT78-Zelllysate in identischen Mengen [20 µg/lane] nach zehnminütiger Stimulation mit Vehikel (Negativkontrolle) bzw. CCL19-IgG und anschließender Anfärbung mit Anti-phospho-p44/42 MAPK. CCL19-IgG ist in der Lage die MAP-Kinasen ERK 1/2 zu aktivieren.

3.1.6 Untersuchung der CCL19-IgG-vermittelten Chemotaxis

Die Untersuchung der Chemotaxis wird herangezogen, um die biologische Aktivität von Chemokinen nachzuweisen. Im vorliegenden Migrationsassay wurde die chemotaktische Wirkung von CCL19-IgG auf T-Lymphozyten untersucht. Dabei wanderten die T-Zellen vom oberen Teil des Transwell-Systems durch die 5 µm großen Poren in den unteren Teil des wells, welches das chemotaktisch-wirkende CCL19-IgG enthält. Nach einer Stunde wurden die Zellen, die sich unterhalb des Filtersystems befanden, durchflusszytometrisch gezählt.

Abbildung 9 zeigt das Ergebnis der Migrationsversuche mit murinen T-Lymphozyten. Die CCR7-positiven T-Lymphozyten aus den Wildtyp-Mäusen migrieren in Gegenwart von CCL19-IgG in deutlich größerem Ausmaß als die Negativkontrolle mit CCR7-negativen Zellen aus den CCR7^{-/-} Mäusen. Die CCL19-IgG-induzierte Chemotaxis verhält sich konzentrationsabhängig, wobei ab einer CCL19-IgG-Konzentration von 4 µg/ml eine Migration der T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnte. Eine Steigerung des chemotaktischen Effektes konnte zwischen 4 µg/ml und 40 µg/ml CCL19-IgG erreicht werden.

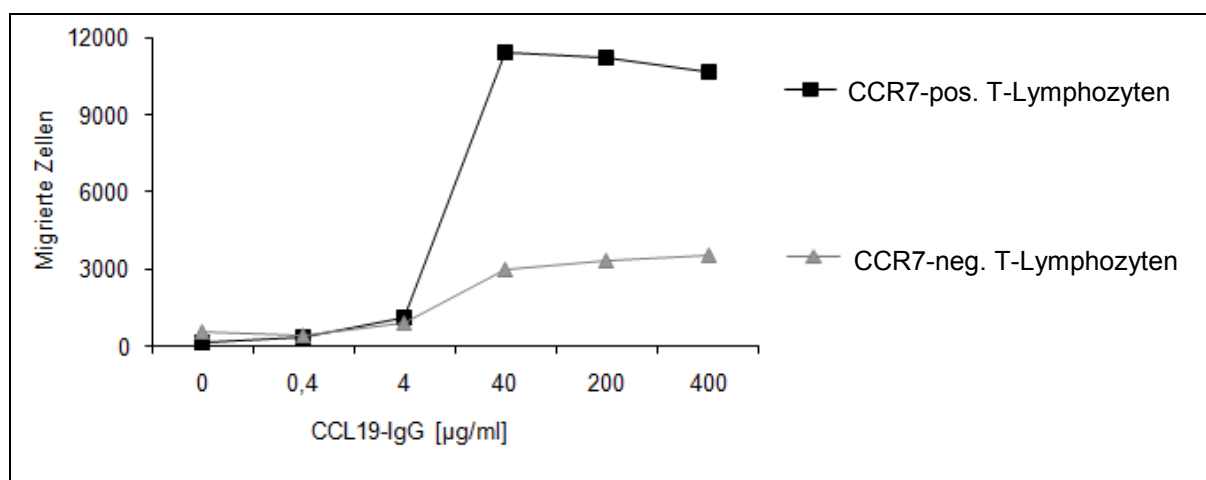


Abb. 9: CCL19-IgG-induzierte Chemotaxis von T-Lymphozyten. Dargestellt ist das Migrationsverhalten CCR7-positiver T-Lymphozyten aus Wildtyp-Mäusen sowie CCR7-negativer T-Lymphozyten aus CCR7^{-/-} Mäusen. Die Inkubation mit CCL19-IgG führt bei einer Konzentration von über 4 µg/ml zur deutlichen Chemotaxis seitens der CCR7-positiven Lymphozyten. Die chemotaktische Aktivität des Fusionsproteins verhält sich konzentrationsabhängig, wobei das Migrationsmaximum bei einer Konzentration von 40 µg/ml erreicht wird. Die Assay-Auswertung erfolgte mittels durchflusszytometrischer Zählung der migrierten Zellen für 30 Sekunden.

3.2 Untersuchung der CCR7-Expression und der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung von Tumorzelllinien

Das Fusionsprotein CCL19-IgG führt zur Proliferationshemmung CCR7-exprimierender Zellen. Dies wurde bereits von Ziegler *et al.* (2007) für humane und murine T-Lymphozyten sowie für die humane T-Zelllinie HUT78 gezeigt. Der nächste Abschnitt zeigt die Ergebnisse hinsichtlich des CCL19-vermittelten Effektes an einer Auswahl von Tumorzelllinien. Zur Bestimmung der CCR7-Expression wurde vorab das Bindungsvermögen von CCL19-IgG für die einzelnen Tumorzellen überprüft.

Die untersuchten Tumorzelllinien bestehen aus einer Gruppe unterschiedlichster Tumorentitäten humanen oder murinen Ursprungs. Im Einzelnen zählen zu den adhärent wachsenden Zelllinien: B16 (murines malignes Melanom), LLC (Lewis Lung Carcinoma, murines Bronchialkarzinom), HT29f (humanes kolorektales Adenokarzinom), PC3 (humanes Adenokarzinom der Prostata) und MDA-MB 231 (humanes Adenokarzinom der Mamma). Als Vertreter humaner Suspensionszelllinien wurden RPMI 8226 (Multiples Myelom), Daudi (Burkitt-Lymphom) und CHP-126 (Neuroblastom) gewählt.

3.2.1 Untersuchung der CCR7-Expression verschiedener Tumorzelllinien

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der untersuchten Tumorzelllinien hinsichtlich ihrer CCR7-Expression zusammengestellt. Methodisch wurde hier die durchflusszytometrische Analyse mittels CCL19-IgG-Bindung angewendet.

Abbildung 10 zeigt das CCL19-IgG-Bindungsvermögen der adhärenen Tumorzelllinien. Alle hier untersuchten Zellen binden CCL19-IgG und sind somit CCR7-positiv.

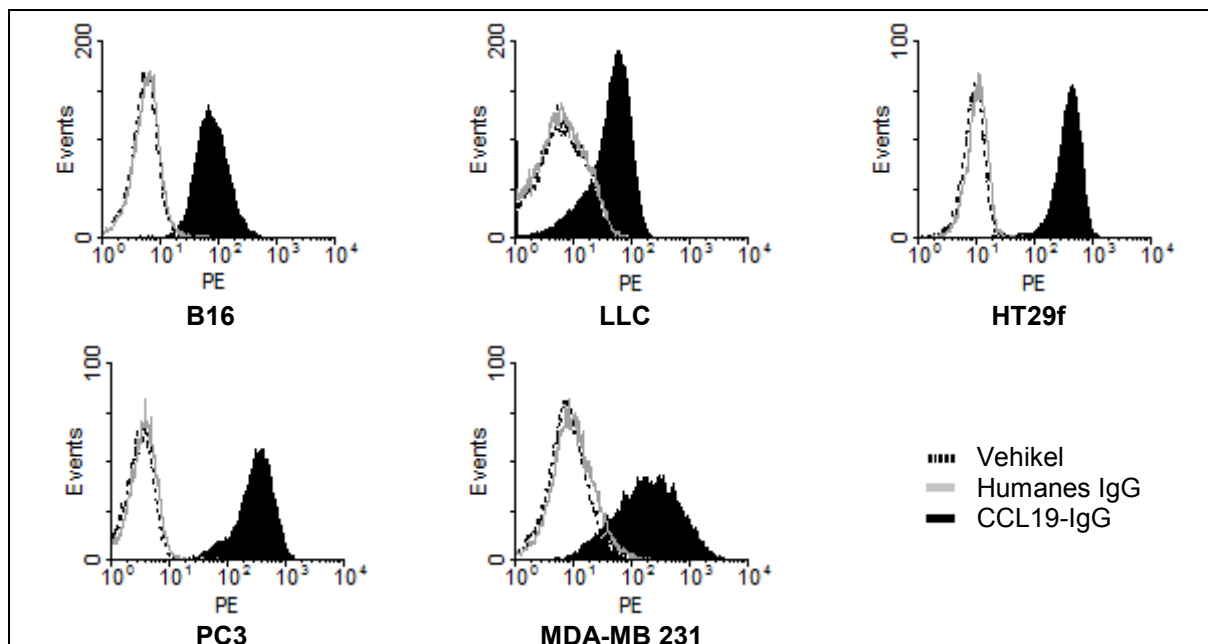


Abb. 10: CCR7-Expression adhärenter Tumorzelllinien mittels Durchflusszytometrie. Die untersuchten adhärenen Tumorzellen sind CCR7-positiv. Das Binden von CCL19-IgG an CCR7 und anschließende Zugabe des Anti-IgG-PE führen zum deutlichen Shift im FL 2.

Ähnlich der adhärenen Tumorzellen binden auch die Suspensionszellen CCL19-IgG (s. Abb. 11). Die Zellen wurden auf das Nichtvorhandensein von Fc-Rezeptoren für diese Arbeit selektiert, da in solchem Fall eventuelle Effekte über den IgG-Anteil des CCL19-IgG nicht ausgeschlossen werden könnte. Die Zugabe von humanem IgG (Isotypkontrolle) führte bei allen hier untersuchten Zellen zu keiner wesentlichen Verschiebung des Peaks gegenüber der reinen Negativkontrolle.

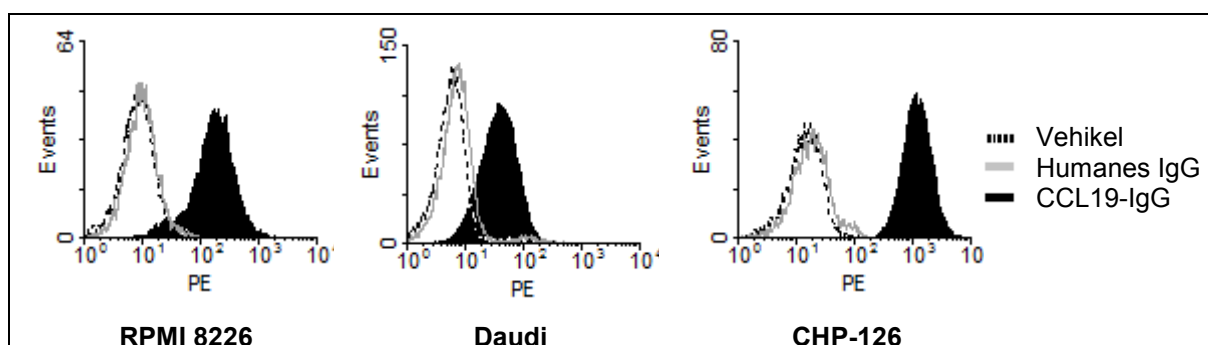


Abb. 11: CCR7-Expression von Suspensionszelllinien mittels Durchflusszytometrie. Die Suspensionszellen exprimieren CCR7. Über CCL19-IgG-Bindung und Anfärbung mit Anti-IgG-PE resultiert ein Shift im FL2. Die Isotypkontrolle ist negativ, d.h. die Zellen verfügen über keine IgG-Bindungsstellen.

3.2.2 CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung von Tumorzelllinien

Die unter Abschnitt 3.2.1 aufgeführten CCR7-positiven Tumorzelllinien wurden nachfolgend hinsichtlich der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung untersucht. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Proliferationsassays der adhärennten Tumorzelllinien. Eine durch CCL19-IgG-induzierte Proliferationshemmung ließ sich bei allen adhärennten Tumorzellen nachweisen. Es ergab sich durchgehend eine signifikante Proliferationshemmung von bis zu 80% (verglichen mit den unbehandelten Zellen der Vehikel-Bedingung).

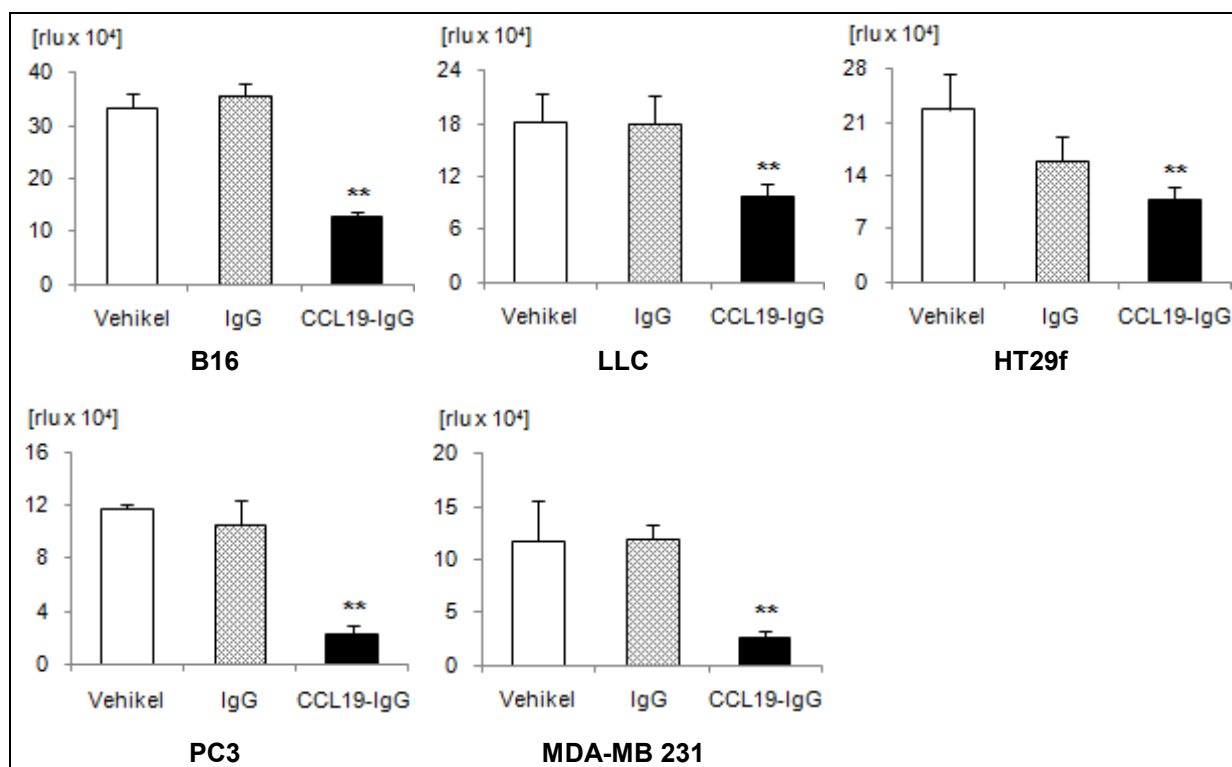


Abb. 12: CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung adhärennter Tumorzelllinien. CCL19-IgG hat einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation CCR7-positiver Tumorzellen (** p < 0,01). Versuchsdauer: 48 Stunden, davon 12 Stunden mit BrdU; Zellzahl: 1 x 10⁴/well bzw. für HT29f 2 x 10⁴/well.

Ergebnisse

Der proliferationshemmende Effekt von CCL19-IgG konnte ebenso für die untersuchten CCR7-positiven Suspensionszellen nachgewiesen werden. Sowohl die lymphatischen Tumorzelllinien RPMI 8226 und Daudi, als auch die Neuroblastom-Zelllinie CHP-126 ließen sich durch die Behandlung mit CCL19-IgG signifikant in ihrem Wachstum hemmen (s. Abb. 13). Die maximale Proliferationshemmung von 45% lag damit unter dem Maximum der adhärenenten Zellen.

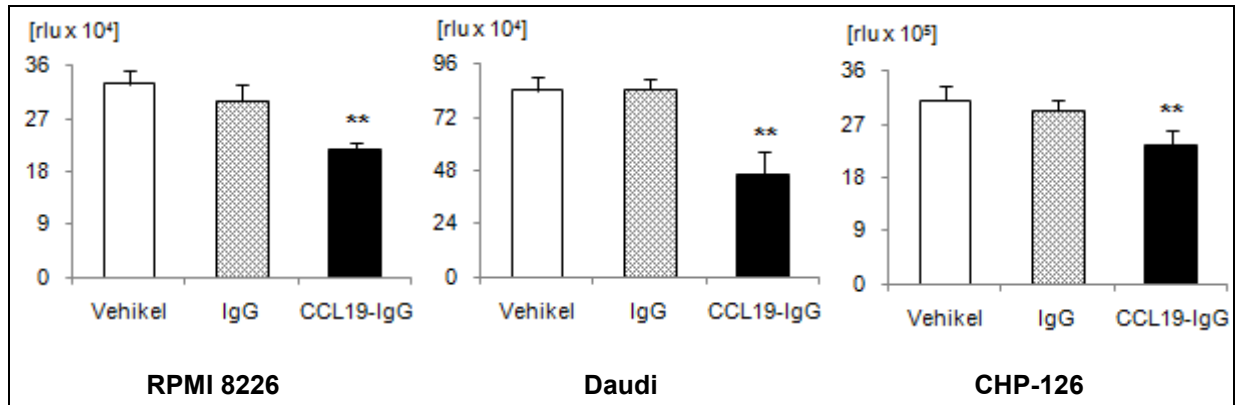


Abb. 13: CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung von Suspensionszellen. CCL19-IgG hemmt die Proliferation der hier dargestellten CCR7-positiven Suspensionszellen. Die Proliferationshemmung ist signifikant (** $p < 0,01$) und verglichen mit den adhärenenten Zellen etwas geringer. Versuchsdauer: 48 Stunden, davon 12 Stunden mit BrdU; Zellzahl: 2×10^4 /well.

Auch lichtmikroskopisch ließ sich der Effekt des CCL19-IgG auf die Zellen nachweisen (s. Abb. 14). Nach 20-stündiger Inkubation mit CCL19-IgG wiesen die PC3-Zellen, verglichen mit den unbehandelten Zellen, eine deutlich verminderte Zellzahl auf. Die Zellen wuchsen nicht mehr im adhärenen Zellverband, sondern lagerten sich losgelöst vom Boden in Zellaggregaten zusammen. Exemplarisch wurden hier nur die Bilder der PC3-Zellen abgebildet, wobei dieser Effekt bei allen adhärenen Zellen sichtbar war.

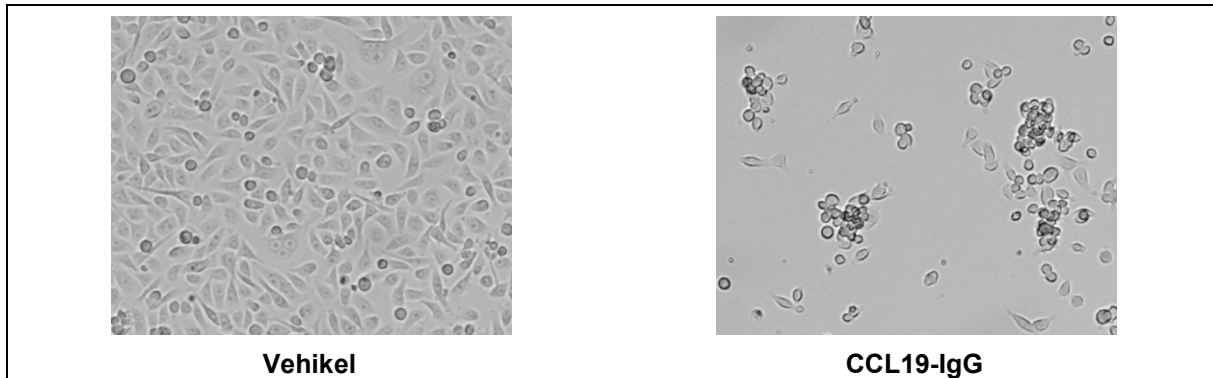


Abb. 14: Effekt des CCL19-IgG auf adhärenente Zellen (PC3) im Lichtmikroskop. Die mikroskopische Aufnahme der PC3-Zellen erfolgte nach 20-stündiger Inkubation mit Vehikel bzw. CCL19-IgG [200 µg/ml] in 50facher Vergrößerung. Die mit Vehikel inkubierten Zellen wuchsen adhärenent und bilden einen gleichmäßig-konfluenten Zellrasen aus. Hingegen führt die CCL19-IgG-Inkubation zu einer sichtbaren Proliferationshemmung und zur Ausbildung von Zellaggregaten.

Für Suspensionszellen ließen sich ähnlich der adhärenen Zellen bereits Unterschiede nach Inkubation mit CCL19-IgG im Lichtmikroskop nachweisen (s. Abb. 15). Die Suspensionszellen lagerten sich in Gruppen zusammen und auch die Zellzahl ist im Vergleich zur Kontrolle (Vehikel) sichtbar reduziert.

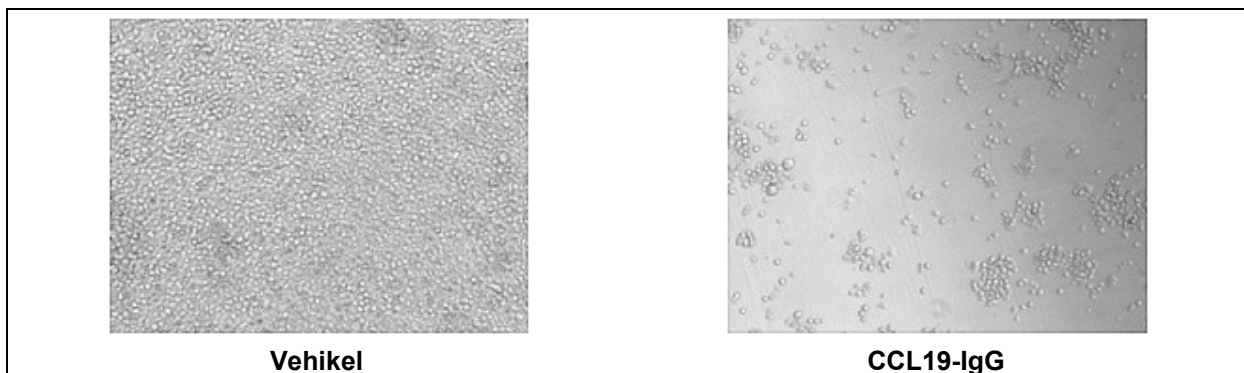


Abb. 15: Effekt des CCL19-IgG auf Suspensionszellen (HUT78) im Lichtmikroskop. Die mikroskopische Aufnahme der HUT78-Zellen erfolgte nach 20-stündiger Inkubation mit Vehikel bzw. CCL19-IgG [200 µg/ml] in 25facher Vergrößerung. CCL19-IgG führt zu einer sichtbaren Proliferationshemmung und zur Ausbildung von Zellaggregaten.

3.3 Konzentrationsabhängigkeit der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung

Üblicherweise wurde CCL19-IgG in einer Konzentration von 200 µg/ml eingesetzt. Das folgende Experiment mit HUT78-Zellen sollte zeigen, inwiefern sich der proliferationshemmende Effekt des CCL19-IgG konzentrationsabhängig verhält.

Abbildung 16 stellt das Ausmaß der Proliferationshemmung in Abhängigkeit von unterschiedlichen CCL19-IgG-Konzentrationen dar. Es konnte gezeigt werden, dass sich die CCR7-abhängige Proliferationshemmung konzentrationsabhängig verhält. Die Konzentration von 25 µg/ml CCL19-IgG hatte bei den HUT-Zellen bereits einen signifikanten Effekt auf die Proliferation. Durch Inkubation mit 200 µg/ml CCL19-IgG wurde eine Hemmung von etwa 70% erzielt, wobei eine Konzentrationserhöhung auf 400 µg/ml keine wesentliche Steigerung der Proliferationshemmung zufolge hatte.

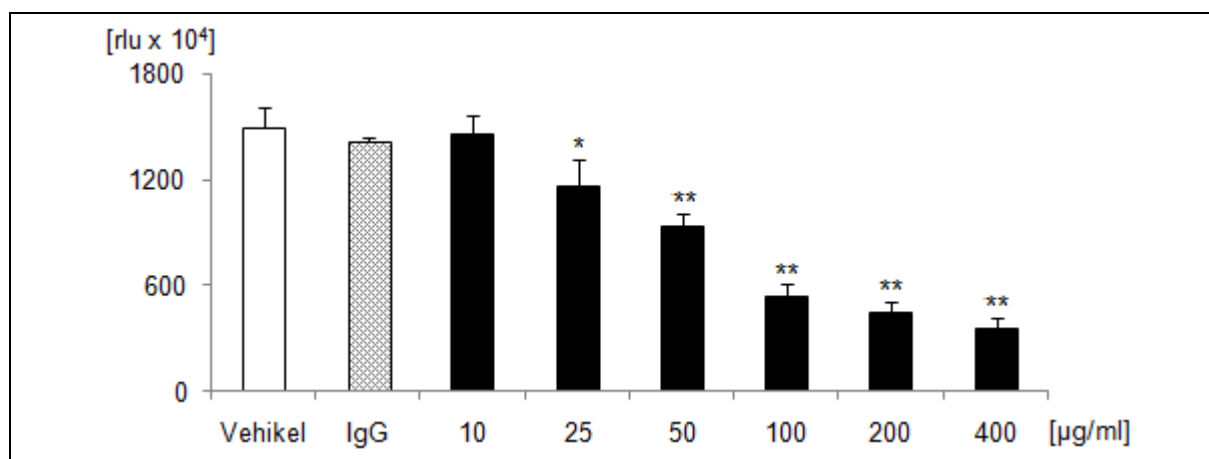


Abb. 16: Konzentrationsabhängigkeit der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung am Beispiel der HUT78-Zellen. Die CCL19-induzierte Proliferationshemmung verhält sich konzentrationsabhängig. Ab einer CCL19-IgG-Konzentration von 25 µg/ml ist die Proliferationshemmung signifikant (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$). Die standardmäßig verwendete Konzentration von 200 µg/ml CCL19-IgG führt zur deutlichen Proliferationshemmung, wobei eine Verdopplung auf 400 µg/ml zu keiner wesentlichen Steigerung führt. Versuchsdauer: 48 Stunden, davon 12 Stunden mit BrdU; Zellzahl: 2×10^4 /well.

3.4 Darbietungsform des CCL19-IgG

Es wurde beschrieben, dass der CCR7-Ligand CCL21 im Lumen hochendothelialer Venolen sekundärer Lymphorgane präsentiert wird (Förster *et al.* 2008). Demnach ist es möglich, dass die Liganden immobilisiert (an Oberflächen gebunden) dargeboten werden müssen, um wirken zu können. Diesbezüglich haben Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Hinweise geliefert, dass CCL19-IgG auch in immobilisierter Form effektiver eine Proliferationshemmung bewirkt als in parallelen Versuchen mit

löslicher Darbietung. Hierzu wurde das Fusionsprotein einige Stunden vor Versuchsbeginn an die Kunststoffoberfläche der wells gebunden. Vor allem adhärenz Zellen zeigten in den Versuchen mit vorgebundenem CCL19-IgG eine höhere Proliferationshemmung. Es ist durchaus denkbar, dass sich auch das zunächst in Lösung befindliche CCL19-IgG eigenständig an die Kunststoffoberfläche der wells bindet und dann ebenfalls in immobilisierter Form vorliegt. In den meisten Versuchen wurde CCL19-IgG in einer Konzentration von 200 µg/ml dem Zellmedium dazugegeben. Somit ist es möglich, dass das Fusionsprotein auch hier nur wirkt, nachdem es im Laufe des Experiments an die Versuchsplatte gebunden wurde und schließlich nur dieser so angebotene Anteil des CCL19-IgG auf die Zellen wirken kann.

In den folgenden Abschnitten wurde untersucht, ob Unterschiede in der Darbietungsform des CCL19-IgG die antiproliferative Wirkung beeinflussen. Dafür wurde in Lösung vorliegendes CCL19-IgG mit immobilisiertem CCL19-IgG verglichen.

3.4.1 Untersuchung der CCL-19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung unter Nonbinding-Bedingungen

Eine Möglichkeit zu untersuchen, ob CCL19-IgG gebunden vorliegen muss, um eine Proliferationshemmung in Tumorzellen zu induzieren, bietet die Verwendung nicht-bindender Oberflächen (Nonbinding-Versuchsplatten). Hier sollen speziell veränderte Eigenschaften der Kunststoffoberfläche das Binden von Proteinen verhindern.

Für die folgenden Versuche wurden die Suspensionszelllinien HUT78 und MM1.s ausgewählt und in diesem Zusammenhang gezielt auf die Untersuchung von adhärenz Zellen verzichtet. Im Rahmen von Vorversuchen (hier nicht abgebildet) fiel auf, dass adhärenz Zellen unter Verwendung von Nonbinding-Versuchsplatten generell geringere Proliferationsraten aufwiesen, als dies mit üblichen Versuchsplatten der Fall war. Somit musste davon ausgegangen werden, dass die veränderte Oberfläche der Nonbinding-Versuchsplatten einen negativen Einfluss auf die Zelladhäsion ausübt, sodass die adhärenz Zellen insgesamt weniger stark proliferierten. Aus diesem Grund, wurde der Einfluss der CCL19-IgG-Darbietung mit adhärenz Zellen alternativ mit einer anderen Methode untersucht (vgl. Abschnitt 3.4.2, FBS-vorbeschichtete Versuchsplatten).

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Proliferationsassays mit Suspensionszellen unter Nonbinding-Bedingungen zusammengestellt. Als Vorausset-

zung für die Experimente mit Nonbinding-Versuchsplatten wurde eine Kontrolle durchgeführt, welche zeigen sollte, ob das Fusionsprotein CCL19-IgG tatsächlich nicht an die speziell veränderte Kunststoffoberfläche der wells gebunden wird. Hierzu wurden die Versuchsplatten zuvor für drei Stunden mit CCL19-IgG vorgebunden und schließlich vorsichtig abgespült. Wenn das Fusionsprotein tatsächlich nicht an die Nonbinding-Platte binden konnte, würde es so wieder abgespült werden und dementsprechend keinen proliferationshemmenden Effekt auslösen. Im Falle, dass das Fusionsprotein trotzdem an die Nonbinding-Versuchsplatten bindet, würde es nicht abgespült werden und eine Proliferationshemmung der Zellen bewirken. Die in Abbildung 17 abgebildete Kontrolle bestätigt die Annahme, dass CCL19-IgG nicht an die Nonbinding-Versuchsplatten binden konnte, da der proliferationshemmende Effekt auf die Tumorzellen ausblieb.

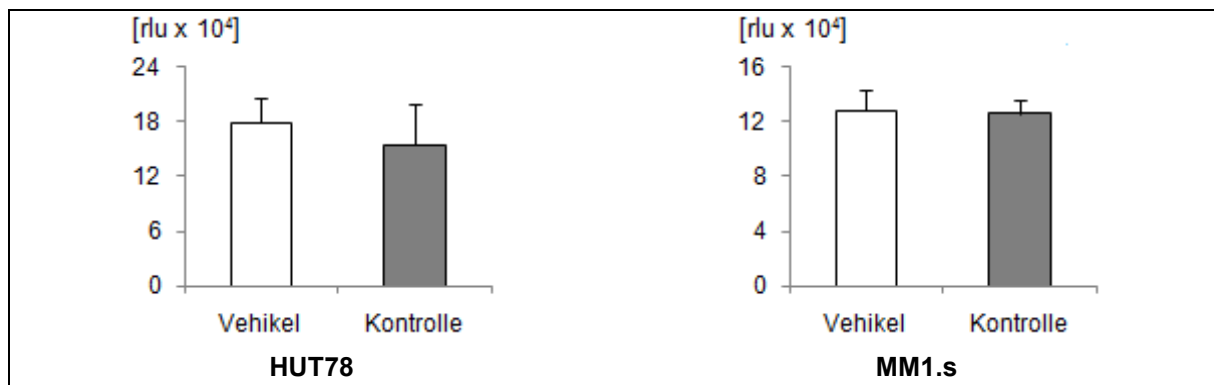


Abb. 17: Kontrolle der Nonbinding-Versuchsplatten mit den Suspensionszellen HUT78 und MM1.s. Nonbinding-Versuchsplatten sollen durch ihre speziell veränderte Kunststoffoberfläche das Binden von Protein verhindern. Die Versuchsplatte wurde zuvor für 3 Stunden mit CCL19-IgG [50 µg/ml] inkubiert und vor Zugabe der Zellen abgespült, um nicht gebundenes CCL19-IgG zu entfernen. Es zeigte sich keine signifikante Proliferationshemmung der CCR7-positiven Suspensionszellen HUT78 und MM1.s. Folglich wurde CCL19-IgG tatsächlich nicht an die Versuchsplatte gebunden und so durch das Abspülen entfernt. Versuchsdauer: 48 Stunden, davon 12 Stunden mit BrdU; Zellzahl: 2×10^4 /well.

Die eigentlichen Untersuchungsergebnisse der Experimente mit den Nonbinding-Versuchsplatten sind in Abbildung 18 zusammengestellt. Hier zeigt sich, dass CCL19-IgG auch in Lösung dargeboten, eine Proliferationshemmung von Suspensionszellen bewirkt. Die proliferationshemmende Wirkung des nicht-gebundenen CCL19-IgG ist größtmäßig vergleichbar mit der Proliferationshemmung, die unter üblichen Versuchsbedingungen (vgl. Proliferationshemmung der HUT78 in Abb. 6, S. 36) erzielt wurde.

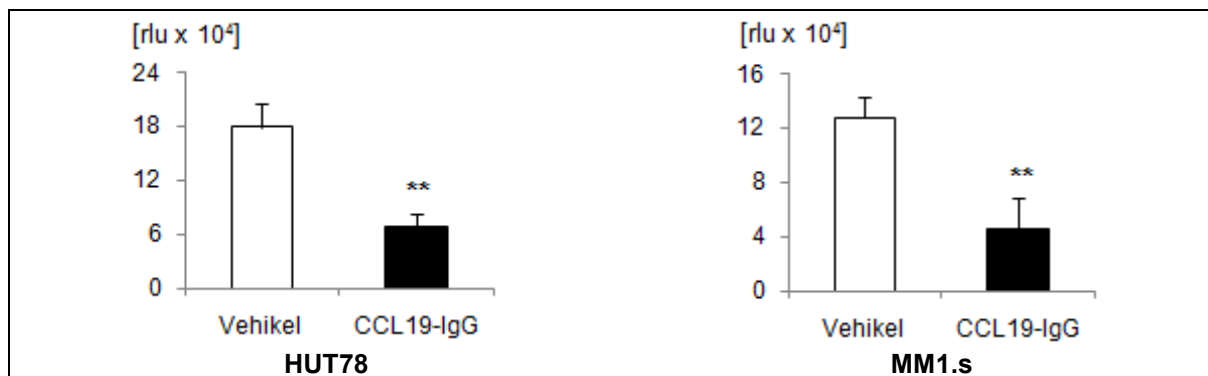


Abb. 18: CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung der Suspensionszellen HUT78 und MM1.s unter Verwendung von Nonbinding-Versuchsplatten. Die Beschichtung der Nonbinding-Versuchsplatten verhindert, dass CCL19-IgG immobilisiert werden kann. Auch unter diesen Bedingungen induziert CCL19-IgG weiterhin eine deutliche Proliferationshemmung von HUT78 und MM1.s. In beiden Fällen ist die Hemmung signifikant (** $p < 0,01$). Versuchsdauer: 48 Stunden, davon 12 Stunden mit BrdU; Zellzahl: 2×10^4 /well.

3.4.2 Untersuchung der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung mit vorbeschichteten Versuchsplatten

Anstelle der Verwendung von Nonbinding-Versuchsplatten besteht auch die Möglichkeit, übliche Versuchsplatten vorher mit Proteinen zu abzusättigen, um so das Binden von CCL19-IgG zu verhindern. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit herangezogen, um die proliferationshemmende Wirkung des CCL19-IgG speziell für adhärenzte Zellen im Hinblick auf die Darbietungsform zu untersuchen, da sich hier die Verwendung von Nonbinding-Versuchsplatten nicht anbot (vgl. Abschnitt 3.4.1).

Für den in Abbildung 19 dargestellten Versuch wurde die Oberfläche der wells zuvor mit FBS beschichtet, um die Absättigung der Versuchsplatte mit den Serumproteinen zu erzielen. Die Vorbeschichtung der Versuchsplatte wurde zwei Stunden vor dem Proliferationsassay mit 50 µl FBS (Proteinanteil ca. 0,45 g/l) durchgeführt. Vor der Zugabe der B16-Zellen wurde die Versuchsplatte abgespült, sodass nur noch das gebundene Protein zurückblieb. Im Vergleich zur Kontrolle führte die Absättigung mit FBS zur beinahe vollständigen Aufhebung der Proliferationshemmung durch CCL19-IgG.

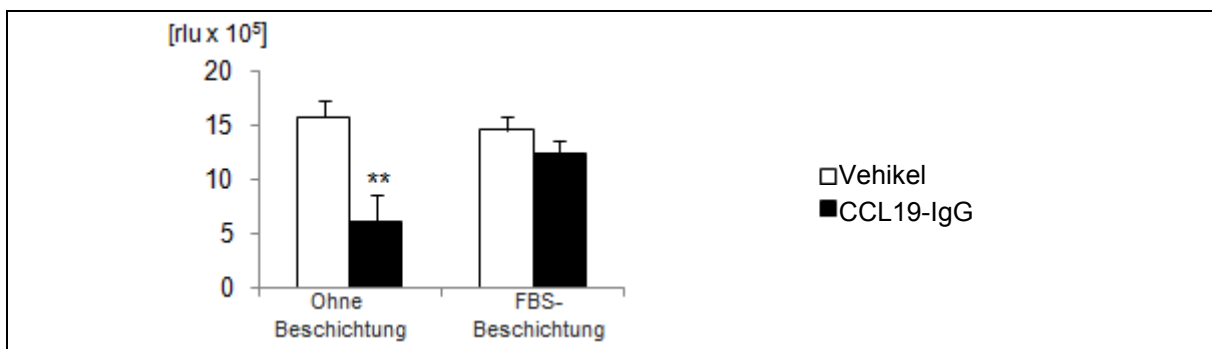


Abb. 19: Beschichtung der Versuchsplatte mit FBS. Die CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung von B16-Zellen wird durch die Absättigung der Versuchsplatte mit FBS nahezu aufgehoben. Für den Assay wurden die wells zuvor mit 50 µl FBS für zwei Stunden bei 37°C vorbeschichtet. Versuchsdauer: 48 Stunden, davon 12 Stunden mit BrdU; Zellzahl: 1×10^4 /well. (** $p < 0,01$)

3.5 Untersuchungen zur klinischen Übertragbarkeit der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung mit primären Tumorzellen

Die in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Untersuchungen zur CCR7-Expression und Proliferationshemmung wurden anhand etablierter Tumorzelllinien durchgeführt. Um zusätzlich Aussagen über die klinische Relevanz zu treffen, wurden primäre Tumorzellen untersucht. Dazu zählten zwei aus Aszites-Punktaten isolierte Ovarialkarzinome und zwei maligne Melanome, wobei das maligne Melanom II

aus Lebermetastasen gewonnen wurde. Die vier Primärtumore wuchsen adhärent und konnten in mehreren Zellkultur-Passagen gehalten werden.

3.5.1 Untersuchung primärer Tumorzellen auf ihre CCR7-Expression

Mittels durchflusszytometrischer Analysen ließ sich in den kultivierten primären Tumorzellen eine Expression von CCR7 nachweisen (s. Abb. 20). Außerdem zeigten die Zellen des malignen Melanoms II und der beiden Ovarialkarzinome zusätzlich einen geringen Shift in der Isotypkontrolle mit humanem Immunglobulin. Dieser Shift zeigt an, dass die Zellen über IgG-Bindungsstellen verfügen, beispielsweise Fc-Rezeptoren. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass das Fusionsprotein zusätzlich zum CCR7-Rezeptor eine weitere mögliche Bindungsstelle über seinen IgG-Teil besitzt. Aus diesem Grund kann das CCL19-IgG-Bindungsvermögen für diese Zellen nicht ausschließlich auf CCR7 zurückgeführt werden. Die Melanomzellen I weisen hingegen keinen Shift nach IgG-Inkubation auf.

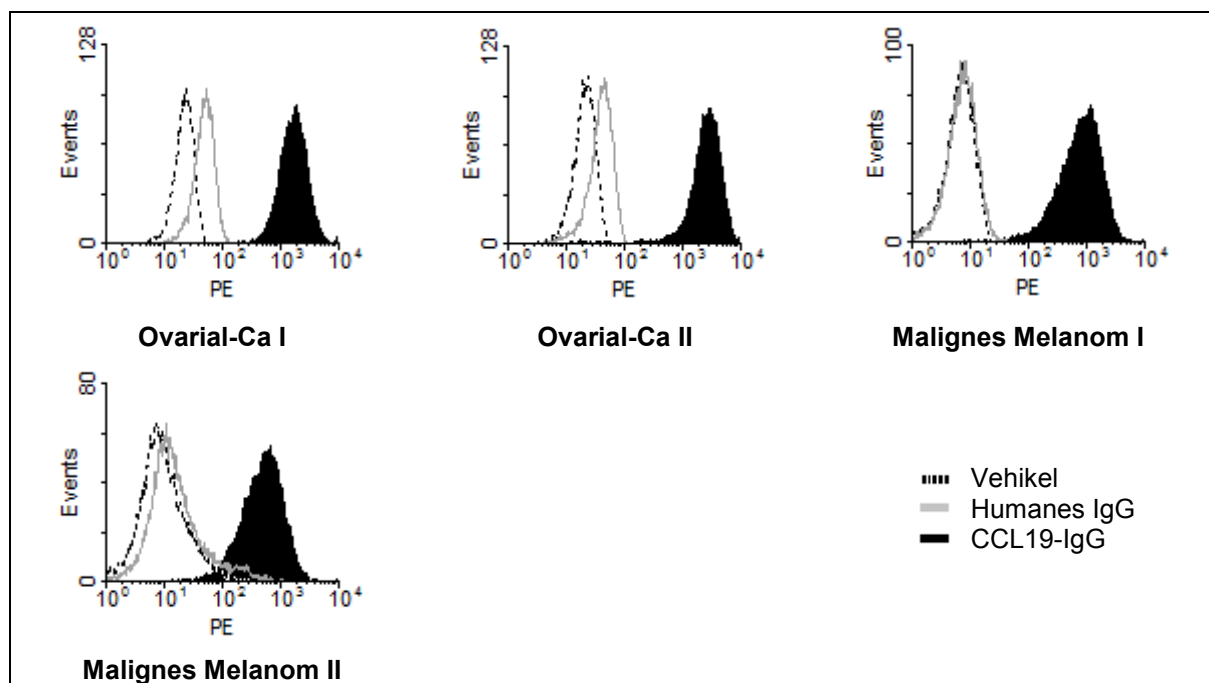


Abb 20: CCL19-IgG-Bindungsvermögen primärer Tumorzellen. Die durchflusszytometrisch untersuchten Primär-Tumorzellen sind CCR7-positiv. Die Inkubation mit humanem IgG führt bei den hier dargestellten Zellen, nicht beim malignen Melanom I, zum Shift gegenüber der Negativkontrolle. Dies bedeutet, dass die Zellen über IgG-Bindungsstellen verfügen, woran auch das CCL19-IgG zusätzlich zum CCR7-Rezeptor binden könnte.

3.5.2 CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung primärer Tumorzellen

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung primärer CCR7-positiver Tumorzellen. Einen auffallend starken Einfluss hatte CCL19-IgG auf die Proliferation der Melanom-Zellen I mit einer Hemmung von 81% gegenüber der Negativkontrolle. Auch bei den primären Ovarialkarzinomen konnte eine signifikante Proliferationshemmung (Ovarialkarzinom I: 58%, Ovarialkarzinom II: 39%) nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die Zellen des malignen Melanoms II nach Inkubation mit CCL19-IgG keine Proliferationshemmung.

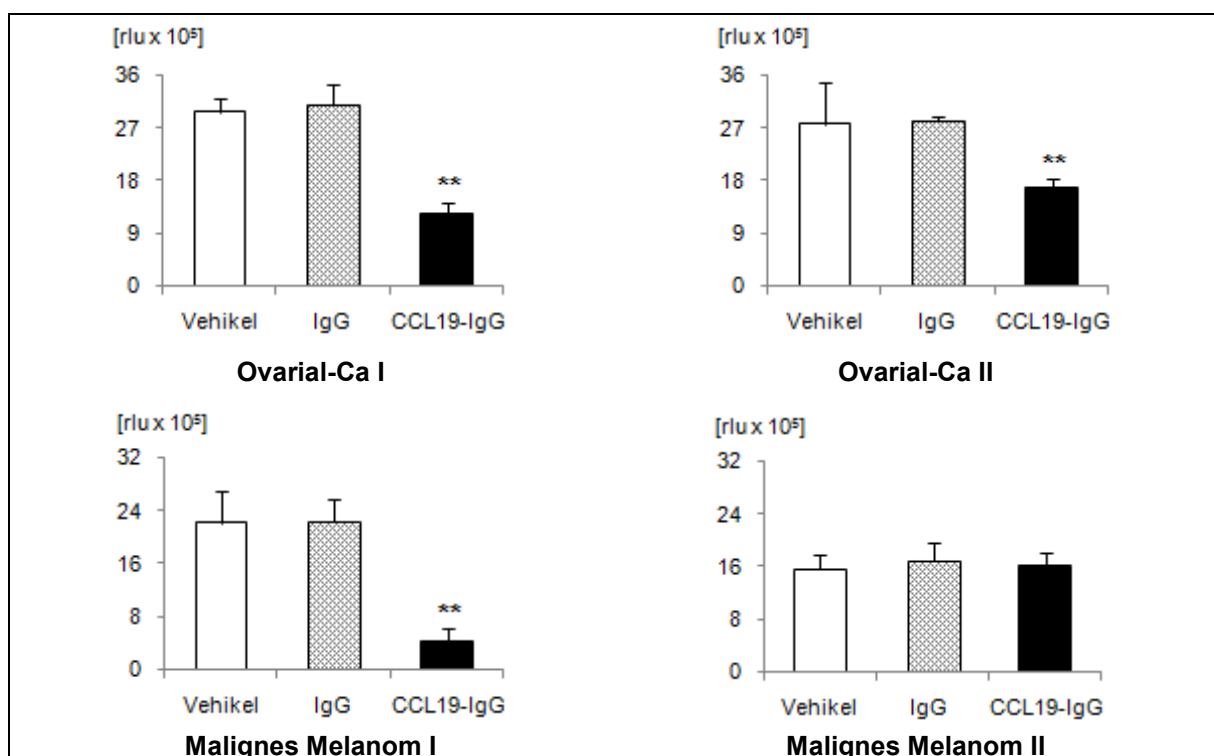


Abb. 21: CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung primärer Tumorzellen. CCL19-IgG führt zur Proliferationshemmung CCR7-positiver Primär-Tumorzellen. Die Hemmung gegenüber der Kontrolle mit Vehikel ist bei beiden Ovarialkarzinom-Zellen sowie beim malignen Melanom I signifikant (** p < 0,01). Ein proliferationshemmender Effekt von CCL19-IgG auf die primären Melanom-Zellen II konnte nicht nachgewiesen werden. Versuchsdauer: 48 Stunden, davon 12 Stunden mit BrdU; Zellzahl: 1 x 10⁴/well.

Der lichtmikroskopisch erkennbare Effekt von CCL19-IgG auf adhärenzte Tumorzelllinien (vgl. PC3-Zellen in Abb. 14, S. 44) war auch bei den untersuchten primären Zellen zu beobachten. Nach Inkubation mit CCL19-IgG präsentierten sich die Zellen in verminderter Zellzahl und zu Zellaggregaten zusammengelagert. Auch die Melanom Zellen II, welche im BrdU-Proliferationsassay keine CCL19-IgG-induzierte Proliferationshemmung aufwiesen, zeigten morphologisch deutliche Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Zellen. In Abbildung 22 ist dieser Effekt am Beispiel der Melanom-Zellen II dargestellt.

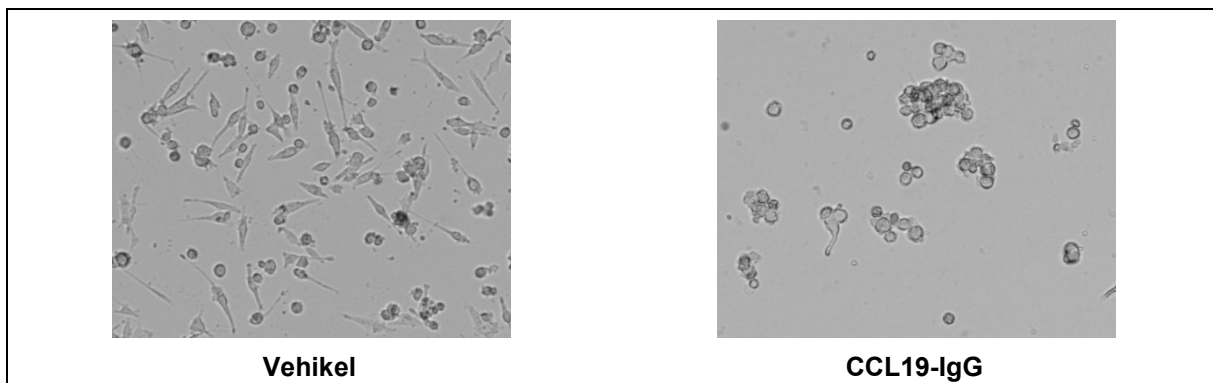


Abb. 22: Effekt des CCL19-IgG auf die Melanom-Zellen II im Lichtmikroskop. Die Aufnahme der Melanom-Zellen erfolgte nach 17-stündiger Inkubation mit Vehikel bzw. CCL19-IgG [200 µg/ml] in 50facher Vergrößerung. Die Inkubation mit CCL19-IgG führt zu einer sichtbaren Aggregation der Zellen.

4 Diskussion

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert und hinsichtlich der eingangs formulierten Fragestellung bewertet werden.

CCL19-IgG bindet an Tumorzellen und bewirkt eine Proliferationshemmung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob CCL19-IgG an Tumorzellen binden kann. Methodisch wurde die CCR7-Expression allein über die Bindung von CCL19-IgG und anschließender durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. In diesem Zusammenhang zählt diese Methode allgemein nicht zu den üblichen Vorgehensweisen, sondern ist eine Nachweismöglichkeit, welche in der Arbeitsgruppe etabliert wurde. Üblicherweise werden spezifische Antikörper verwendet und CCR7 dann über verschiedene Nachweismethoden detektiert, wie z.B. mittels Western Blot-Analysen, immunhistochemischer Färbungen (von Gewebeschnitten oder zytologischen Präparaten) und auch mithilfe durchflusszytometrischer Analysen (Wagner *et al.* 2008, Ghobrial *et al.* 2004). Ein weiteres gängiges Verfahren ist die Bestimmung von mRNA. Diesbezüglich ist jedoch zu beachten, dass allein der Nachweis von transkribierter RNA nicht anzeigt, dass der Rezeptor tatsächlich an der Zelloberfläche exprimiert wird (Taquet *et al.* 2009). Dieses Problem besteht bei der durchflusszytometrischen Untersuchung nicht. Im Rahmen dieser Arbeit war es allerdings vorteilhaft das das Binden des Fusionsproteins CCL19-IgG an Zellen direkt nachzuweisen, da im nächsten Schritt die Wirkung des Fusionsproteins auf diese Zellen bestimmt werden sollte.

Grundsätzlich bietet die Verwendung des Fusionsproteins zur Bestimmung von CCR7 mittels durchflusszytometrischer Analysen mögliche Fehlerquellen. CCL19-IgG kann z.B. über den Fc-Teil des Immunglobulins an sogenannte Fc-Rezeptoren binden und damit die eigentliche Bindung an CCR7 verfälschen. So könnten z.B. CCR7-negative Zellen irrtümlich als CCR7-positiv eingestuft werden, weil ihre Fc-Rezeptoren CCL19-IgG binden. Dies ist der Grund für das Mitführen einer Isotypkontrolle mit humanem Immunglobulin. Fc-Rezeptoren sind typischerweise auf Immunzellen, wie neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und Monozyten zu finden und können allerdings auch von Tumorzellen exprimiert werden (Shen *et al.* 1984). In solchen Fällen wäre das vorherige Blockieren der Fc-Rezepto-

ren mit Immunglobulin-haltigem Serum angezeigt bzw. das Ausweichen auf eine alternative Nachweismethode.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen zeigen, dass alle hier getesteten Tumorzelllinien sowie auch die primären Tumorzellen CCL19-IgG binden und somit CCR7 auf ihrer Oberfläche tragen. Dies passt zur aktuellen Datenlage, dass viele Tumore CCR7 exprimieren, obwohl die Ursprungszellen dies nicht taten (Balkwill 2012). Aufgrund der großen Anzahl CCR7-positiver Tumore ist es nicht überraschend, dass auch im Rahmen dieser Arbeit keine CCR7-negativen Tumorzellen gefunden wurden. Dies wiederum bedeutete, dass für die Bestimmung der CCL19-IgG-induzierten Proliferationshemmung keine „Negativkontrolle“ eingesetzt werden konnte. Ausschließlich die Versuche mit den CCR7-negativen T-Lymphozyten aus CCR7-Knockout-Mäusen konnten demonstrieren, dass CCL19-IgG keinen proliferationshemmenden Effekt auf CCR7-negative Zellen bewirkt und es sich dabei nicht um eine generelle Wirkung (unabhängig von CCR7) handelt (s. Abb. 7, S. 37).

Nach bestätigter CCR7-Expression sollte der antiproliferative Effekt des Fusionsproteins überprüft werden. Dabei konnten alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien, d.h. sowohl adhärenz als auch Suspensionszellen, durch CCL19-IgG in ihrer Proliferation statistisch signifikant gehemmt werden. Durchschnittlich lag die CCL19-IgG-vermittelte Proliferationshemmung der exemplarisch untersuchten adhärenz Zelllinien und Suspensionszelllinien bei 60% bzw. 35%. Es lässt sich anhand der Proliferationsergebnisse die Tendenz erkennen, dass CCL19-IgG auf die Proliferation adhärenz Zellen eine stärkere Wirkung hat als auf die der Suspensionszellen.

Im zweiten Schritt sollten auch primäre Tumorzellen untersucht werden, um damit die klinische Relevanz der CCL19-IgG-Behandlung besser einschätzen zu können. Primäre Tumorzellen sind Zellen, die erst kürzlich aus Patienten-Tumoren entnommen und nur über wenige Passagen in der Zellkultur gehalten wurden. Es ist somit anzunehmen, dass primäre Tumorzellen weniger Veränderungen bezüglich ihrer Rezeptorexpression erfahren haben. Mit Ausnahme der Melanom-Zellen II ließen sich auch die primären Tumore durch CCL19-IgG in ihrer Proliferation hemmen.

Regelmäßig zeigten sich lichtmikroskopisch erkennbare, morphologische Veränderungen der Zellen bei Inkubation mit CCL19-IgG. Besonders eindrucksvoll war dieser Effekt bei den adhärenz Zellen (exemplarisch dargestellt für PC3 und Melanom-

Zellen II, s. Abb. 14, S. 44 und Abb. 22, S. 52). Die Zellen wuchsen zu großen Anteilen nicht mehr adhären, sondern formten stattdessen Zellaggregate. Ähnliche Veränderungen waren auch bei Suspensionszellen in abgeschwächter Ausprägung zu beobachten (s. HUT78 in Abb. 15, S. 44). Liu *et al.* (2012) beschrieben diesbezüglich, dass der CCR7-Ligand CCL21 eine Formveränderung von Tumorzellen (Bronchial-Karzinomzellen, NSCLC) hervorruft. Wie einleitend erläutert, bewirken beide CCR7-Liganden physiologisch die Migration von Immunzellen (Förster *et al.* 2008) und spielen eine Rolle in der Metastasierung bzw. Migration maligner Zellen (Shields *et al.* 2007). In diesem Zusammenhang ist eine CCL19-IgG-induzierte „Adhärenzschwächung“ adhären-wachsender Zellen durchaus denkbar. Dafür sprechen auch die Arbeiten von Schumann *et al.* (2010), in denen CCL21 (in löslicher Form) nicht mehr zu einer Integrinaktivierung führte und damit eine Zelladhäsion von DCs ausblieb. Es lässt sich also festhalten, dass diese morphologischen Veränderungen offenbar durch CCL19-IgG bedingt und somit CCR7-vermittelt sind. In welchem Zusammenhang diese Formveränderungen allerdings mit der zeitgleich beobachteten Proliferationshemmung steht, lässt sich aktuell nicht beantworten. Die Tatsache, dass die Melanom-Zellen II (s. Abb. 22, S. 52) zwar morphologische Veränderungen zeigten, aber ihre Proliferation durch CCL19-IgG nicht gehemmt war (s. Abb. 21, S. 51), deutet daraufhin, dass es sich um zwei unabhängige Effekte handelt, die aber häufig korrelieren.

Außerdem könnte die CCL19-IgG-induzierte Adhäsionshemmung von Zellen im Zusammenhang mit der CCR7-assoziierten Metastasierung stehen, da aus dem Zellverband „herausgelockte“ Zellen (durch CCL19-IgG adhäsionsgeminderte Zellen) eher zur Metastasierung beitragen. In diesem Fall müsste man bei einer Behandlung mit CCL19-IgG auch mit einer höheren Metastasierungsrate rechnen. Deshalb sollte durch *in vivo*-Versuche geklärt werden, ob eine Behandlung mit dem Fusionsprotein neben der erhofften Tumorregression zu Metastasen führt.

Immobilisierte Darbietungsform von CCL19-IgG

Einen möglichen Einflussfaktor der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung könnte die Darbietungsform des Fusionsproteins darstellen. Hier gibt es grundsätzlich die beiden Möglichkeiten, dass CCL19-IgG entweder in Lösung oder immobilisiert (gebunden an Oberflächen) vorliegen kann. Schumann *et al.* (2010) beschrieben, dass der CCR7-Ligand CCL21 in gebundener Form eine andere Wirkung auf

DCs hat als die ungebundene Form. CCL21 in immobilisierter Form bewirkte eine Adhäsion der Zellen, während CCL21 in löslicher Form nur eine Chemotaxis (Zellmigration) auslöste. Dies unterstützt die These, dass die Darbietungsform von CCL19-IgG ebenfalls eine Auswirkung haben könnte.

Um dieser These nachzugehen, wurden Experimente mit Nonbinding-Versuchsplatten (s. Abb. 17, S. 47; Abb. 18, S. 48) und FBS-vorbeschichteten Versuchsplatten (s. Abb. 19, S. 50) durchgeführt. Das Ziel beider Versuchsaufbauten war es zu verhindern, dass CCL19-IgG auf den Versuchsplatten bindet und so in immobilisierter Form vorliegt.

Mit den Ergebnissen sollte beantwortet werden, ob CCL19-IgG immobilisiert vorliegen muss, um auf die Zellen antiproliferativ wirken zu können. Diesbezüglich konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- CCL19-IgG kann auch in löslicher Darbietung eine Proliferationshemmung von Suspensionszellen bewirken. Diese Aussage basiert auf den Ergebnissen der „Nonbinding“-Experimente mit HUT78 (und MM1.s). Hier wurde die Proliferation der Zellen durch „lösliches“ CCL19-IgG weiterhin in gleicher Stärke gehemmt wie unter normalen „Binding-Bedingungen“ mit immobilisiertem CCL19-IgG.
- CCL19-IgG kann nur in immobilisierter Form eine Proliferationshemmung von adhären Zellen bewirken. Dies zeigen die Versuche mit FBS-beschichteten Versuchsplatten am Beispiel der B16-Zellen.

Insgesamt scheint die Darbietungsform des CCL19-IgG also eine Rolle zu spielen, wobei aufgrund der Divergenz der Ergebnisse für Suspensionszellen und adhären Zellen keine konkreteren Aussagen getroffen werden können.

Mechanismus der CCL19-IgG-vermittelten Proliferationshemmung

Es konnte gezeigt werden, dass CCL19-IgG eine Proliferationshemmung von T-Lymphozyten und auch von Tumorzellen bewirkt. Welcher Mechanismus hinter der antiproliferativen Wirkung steht, ist gegenwärtig nicht geklärt. Es scheint insofern ein CCR7-vermittelter Signalweg zu sein, da sich nur CCR7-positive Zellen hemmen lassen. Die fehlende Proliferationshemmung der CCR7-positiven Melanom-Zellen II weist daraufhin, dass nicht von einem ubiquitären Proliferationshemmeffekt ausgegangen werden kann. Vielmehr lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Proliferationshemmung aus einem Zusammenspiel mehrerer Effekte resultiert. Dafür spre-

chen auch die beobachteten Unterschiede zwischen adhärennten Zellen und Suspensionszellen, wie z.B. Stärke der Proliferationshemmung und der erforderlichen Darbietungsform des CC19-IgG.

Arbeiten von Ziegler *et al.* (2007) mit CCL19-IgG und primären T-Lymphozyten lieferten bereits Hinweise, dass sich die beobachtete Proliferationshemmung auf der Zellzyklusebene abspielt. Die ersten Untersuchungen von Ziegler *et al.* (2007) zeigten einen vermehrten Anteil von Zellen in der G₂/M-Phase nach Behandlung mit CCL19-IgG. Xu *et al.* (2011) beobachteten bei NSCLC-Zellen ebenfalls eine Zunahme des G₂/M-Phasenanteils, die durch den CCR7-Liganden CCL21 vermittelt wurde. Ihren Ergebnissen zufolge ist diese Zunahme jedoch in einem pro-proliferativen Effekt von CCL21 auf NSCLC-Zellen begründet, der sich in einer Progression des Zellzyklus in die G₂/M-Phase widerspiegelte. Zwar sind die beiden hier referierten Arbeiten bezüglich der CCR7-vermittelten Wirkung auf die Proliferation genau gegensätzlich, verdeutlichen aber, dass sich die Aktivierung von CCR7 auch auf den Zellzyklus auswirkt. Zukünftig gilt es, die Signalwege der CCR7-vermittelten Proliferationshemmung genauer zu analysieren und schließlich den *in vitro*-gezeigten Effekt auch *in vivo* zu überprüfen.

In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass eine Zellzyklus-Arretierung in G₂/M potenziell einen weiteren Ansatz in der Tumorthherapie bedeutet. Zellen sind in diesen Zellzyklusphasen bekanntermaßen sehr sensibel für eine Radiotherapie (u.a. Tishler *et al.* 1992). Besonders vor dem Hintergrund, dass CCL19-IgG nur eine Proliferationshemmung erreicht und nicht zum Tod der Tumorzellen führt, könnte seine Verwendung als Kombinationspartner im Rahmen einer Radio- oder Radiochemotherapie vorteilhaft sein.

Zusammenfassend soll an dieser Stelle festgehalten werden, dass CCR7 erwie-sermaßen von vielen Tumoren exprimiert wird und dass dies im Rahmen der Arbeit mit einer kleinen Auswahl verschiedener Tumorzelllinien und primären Tumorzellen bestätigt werden konnte. Das Fusionsprotein CCL19-IgG ist in der Lage, an Tumorzellen zu binden und deren Proliferation zu hemmen. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse kommt CCL19-IgG als neue Therapiemöglichkeit maligner Erkrankungen in Betracht.

5 Zusammenfassung

Der Chemokinrezeptor CCR7 mit seinen Liganden CCL19 und CCL21 spielt eine Schlüsselrolle in der adaptiven Immunantwort und ist wichtig für die Migration von T-Lymphozyten und dendritischen Zellen. Seine Expression wurde zudem bereits in vielen malignen Tumoren nachgewiesen und steht im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose. Mit CCL19-IgG, einem Fusionsprotein bestehend aus dem CCR7-Liganden CCL19 und dem Fc-Teil des humanen Immunglobulins G, konnten im Vorwege primäre T-Lymphozyten und Lymphomzellen (HUT78) in ihrer Proliferation gehemmt werden.

Um die Relevanz der CCL19-IgG-induzierten Proliferationshemmung von Tumorzellen zu klären, wurde das Fusionsprotein in größeren Mengen aus stabil-transfizierten CHO-Zellen isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Tumorzellen CCR7 exprimieren und somit CCL19-IgG binden und ob sich ihr Wachstum durch CCL19-IgG hemmen lässt. Dafür wurde zunächst die CCR7-Expression von verschiedenen Tumorzelllinien (Kolon-, Ovarial-, Prostata- und Mammakarzinom, malignes Melanom, Neuroblastom, Lymphome) sowie zusätzlich von einigen primären Tumorzellen ermittelt. Anschließend folgte die Bestimmung der CCL19-IgG-induzierten Proliferationshemmung von Tumorzellen mittels Proliferationsassays. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit CCL19-IgG bei allen hier untersuchten CCR7-positiven Tumorzelllinien zu einer signifikanten Proliferationshemmung führte. Auch die Primärtumorzellen konnten mit Ausnahme von Zellen eines metastasierten malignen Melanoms durch CCL19-IgG in ihrem Wachstum gehemmt werden.

Im Überblick bleibt festzustellen, dass CCL19-IgG *in vitro* eine stärkere proliferationsinhibierende Wirkung auf Zellen solider Tumore hat als auf Suspensionszellen. Des Weiteren wurden mögliche Einflussfaktoren wie die Konzentrationsabhängigkeit der antiproliferativen CCL19-IgG-Wirkung untersucht, um diesen Effekt besser verstehen und optimal einsetzen zu können. Aufgrund dieser neu gewonnen Erkenntnisse kommt CCL19-IgG als mögliche Therapieoption maligner Erkrankungen in Betracht. Ein zielgerichteter Transfer dieser Erkenntnisse in murine Tumormodelle soll darüber hinaus im Anschluss für separate Studien vorbereitet werden.

6 Literaturverzeichnis

Balkwill, F. R. (2012): The chemokine system and cancer. *J Pathol*, 226:148-57

Boyden, S. V. (1962): The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 115 (3), 453-66

Bradford, M.M. (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

Cabioglu, N., Yazici, M. S., Arun, B., Broglio, K. R., Hortobagyi, G. N., Price, J. E., Sahin, A. (2005): CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res*, 11(16):5686-93

Cyster, J. G. (1999): Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs, *Science*, 286(5447):2098-102

Fang, L., Hwang, S. T. (2009): Roles for CCR7 in cancer biology. In: Fulton, A. M. (Hrsg.), *Chemokine receptors in cancer*, 93-109, *Cancer Drug Discovery and Development*, Humana Press, c/o Springer Science

Fernandez, E. J., Lolis, E. (2002): Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42:469-99

Förster, R., Davalos-Missslitz, A. C., Rot, A. (2008): CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*, 8(5):362-71

Förster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E., Lipp, M. (1999): CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 99(1):23-33

Ghobrial, I. M., Bone, N. D., Stenson, M. J., Novak, A., Hedin, K. E., Kay, N. E., Ansell, S. M. (2004): Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clin Proc*, 79(3):318-25

Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., Williams, L. T. (1998): A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(1):258-63

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(5):726-33

Kakinuma, T., Hwang, S.T. (2006): Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol*, 79(4):639-51

Kim, C. H., Broxmeyer, H. E. (1999): Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol*, 65(1):6-15

Kodama, J., Hasengaowa, Kusumoto, T., Seki, N., Matsuo, T., Ojima, Y., Nakamura, K., Hongo, A., Hiramatsu, Y. (2007): Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Ann Oncol*, (1):70-6

Krautwald, S., Ziegler, E., Förster R., Ohl, L., Amann, K., Kunzendorf, U. (2004): Ectopic expression of CCL19 impairs alloimmune response in mice. *Immunology*, 112, 301-9

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5

Liu, J., Zhang, L., Wang, C. (2012): CCL21 modulates the migration of NSCL cancer by changing the concentration of intracellular Ca²⁺. *Oncol Rep*, 27(2):481-6

Luster, A.D. (2002): The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 14(1):129-35

Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11, 231-8

Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., Förster, R. (2004): CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity*, 21(2):279-88

Olson, T.S., Ley, K. (2002): Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 283:R7-R28

Raman, D., Baugher, P.J., Thu, Y. M., Richmond, A. (2007): Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett*, 28; 256(2):137-65

Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., Richmond, A. (2011): Chemokines in health and disease, *Exp Cell Res*, 317(5):575-89

Richmond, A., Yang, J., Su, Y. (2009): The good and the bad of chemokines/chemokine receptors in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 22(2):175-86

Righi, E., Kashiwagi, S., Yuan, J., Santosuosso, M., Leblanc, P., Ingraham, R., Forbes, B., Edelblute, B., Collette, B., Xing, D., Kowalski, M., Mingari, M.C., Vianello, F., Birrer, M., Orsulic, S., Dranoff, G., Poznansky, M.C. (2011): CXCL12/CXCR4 blockade induces multimodal antitumor effects that prolong survival in an immunocompetent mouse model of ovarian cancer. *Cancer Res*, 71(16):5522-34

Rollins, B. J. (1997): Chemokines, *Blood* 90: 909-28

Rossi, D., Zlotnik, A. (2000): The biology of chemokines and their receptors, *Annu Rev Immunol*, 18:217-42

Sánchez-Sánchez, N., Riol-Blanco, L., Rodríguez-Fernández, J. L. (2006): The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J Immunol*, 176(9):5153-9

Schumann, K., Lämmermann, T., Bruckner, M., Legler, D. F., Polleux, J., Spatz, J. P., Schuler, G., Förster, R., Lutz, M. B., Sorokin, L., Sixt, M. (2010): Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity*, 32(5):703-13

Schweickart, V. L., Raport, C. J., Godiska, R., Byers, M.G., Eddy, R. L. Jr., Shows, T. B., Gray, P. W. (1994): Cloning of human and mouse EB11, a lymphoid-specific G-protein-coupled receptor encoded on human chromosome 17q12-q21.2. *Genomics*, 23(3):643-50

Shen, W. C., Ryser, H. J. (1984): Selective killing of Fc-receptor-bearing tumor cells through endocytosis of a drug-carrying immune complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(5):1445-7

Shields, J. D., Fleury, M. E., Yong, C., Tomei, A. A., Randolph, G. J., Swartz, M. A. (2007): Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling. *Cancer Cell*, 11(6):526-38

Smith, M.C., Luker, K.E., Garbow, J.R., Prior, J.L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., Luker, G.D. (2004): CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res*; 64(23):8604-12

Takeuchi, H., Fujimoto, A., Tanaka, M., Yamano, T., Hsueh, E., Hoon, D.S. (2004): CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res*, 10(7):2351-8

Taquet, N., Dumont, S., Vonesch, J.L., Hentsch, D., Reimund, J.M., Muller, C.D. (2009): Differential between protein and mRNA expression of CCR7 and SSTR5 receptors in Crohn's disease patients. *Mediators Inflamm*. doi:10.1155/2009/285812

Thelen, M. (2001): Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol*, 2: 129-134

Tishler, R. B., Schiff, P.B., Geard, C. R., Hall, E. J. (1992): Taxol: a novel radiation sensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 22(3):613-7

Wagner, P. L., Moo, T. A., Arora, N., Liu, Y. F., Zarnegar, R., Scognamiglio, T., Fahey, T. J. 3rd. (2008): The chemokine receptors CXCR4 and CCR7 are associated with tumor size and pathologic indicators of tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 15(10):2833-41

Wang, B., Hendricks, D. T., Wamunyokoli, F., Parker, M. I. (2006): A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. *Cancer Res*, 66:3071-7

Wiley, H. E., Gonzalez, E. B., Maki, W., Wu, M. T., Hwang, S. T. (2001): Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 93(21):1638-43

Willimann, K., Legler, D. F., Loetscher, M., Roos, R. S., Delgado, M. B., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1998): The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol*, 28(6):2025-34

Xu, Y., Liu, L., Qiu, X., Jiang, L., Huang, B., Li, H., Li, Z., Luo, W., Wang, E. (2011): CCL21/CCR7 promotes G2/M phase progression via the ERK pathway in human non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*, 6(6):e21119

Ziegler E., Oberbarnscheidt M., Bulfone-Paus S., Förster R., Kunzendorf U., Krautwald S. (2007): CCR7 Signaling Inhibits T Cell Proliferation. *J Immunol*, 179(10):6485-93

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 cell trafficking. *J Am Soc Nephrol*, 17:2521-32

Zlotnik, A. (2006): Chemokines and cancer. *Int. J. Cancer*, 119:2026-9

Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000): Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2):121-7

7 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof. Dr. Ulrich Kunzendorf dafür, dass ich meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen durfte, und für seine nützlichen Anregungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Stefan Krautwald für die Überlassung des Themas, die umfangreiche Unterstützung sowie das stetige Interesse am Verlauf meiner Promotionsarbeit.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Jan-Philip Steen und Dr. Kirsten Keyser für die vielen Ratschläge und Ideen sowie die praktischen Hilfestellungen während der gesamten Zeit meiner Arbeit bedanken.

PD Dr. Christian Schem aus der Universitätsfrauenklinik Kiel und Prof. Dr. Holger Kalthoff aus dem Labor der molekularen Onkologie des UK-SH Kiel danke ich für die Bereitstellung der primären Tumore.

Den technischen Assistentinnen danke ich für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre im Georges-Köhler-Haus.

Für die Durchsicht meiner Promotionsarbeit bedanke ich mich besonders bei Gert Starke, Jana Schlenk und Dr. Jan-Philip Steen.

Ein großer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für das entgegengebrachte Verständnis und die Unterstützung während meiner Arbeit und des Studiums.