

Aus dem Institut für Immunologie  
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Alexander Scheffold)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Charakterisierung der Chemokinrezeptor-  
Expression und -Signaltransduktion  
gesunder und neoplastischer  
T-Zellen**

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

vorgelegt von  
  
Thi Mai Dang-Pham  
  
aus Hanoi, Vietnam

Kiel 2023

1. Berichterstatter(in): Prof. Dr. rer. biol. hum. Ottmar Janßen
2. Berichterstatter(in): Prof. Dr. rer. nat. Karina Reiß

Tag der mündlichen Prüfung: 16. April 2024

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 07. Dezember 2023

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Hutloff

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Rolle der T-Lymphozyten im Immunsystem .....	1
1.1.1 Neoplasien der T-Lymphozyten.....	3
1.2 Chemokine und ihre Rezeptoren.....	6
1.2.1 Klassifizierung der Chemokine .....	6
1.2.2 Chemokinrezeptoren .....	10
1.3 Chemokinrezeptor-System SDF1 $\alpha$ /CXCR4 .....	10
1.4 Chemokine in der Tumorbilogie.....	14
1.4.1 Tumorwachstum und Progression .....	15
1.4.2 Angiogenese.....	17
1.4.3 Metastasierung.....	18
1.4.4 Chemokin- und Chemokinrezeptor-spezifische Therapieansätze.....	18
1.5 Das Adapterprotein HS1 .....	21
1.6 Fragestellung und Zielsetzung .....	24
2 Material.....	27
2.1 Materialien für zellbiologische Analysen.....	27
2.1.1 Zelllinien .....	27
2.1.2 Medien und Puffer .....	27
2.1.3 Immunfluoreszenz: Durchflusszytometrie .....	29
2.1.4 Verwendete Antikörper in der Immunfluoreszenz .....	29
2.1.5 Faktoren, Inhibitoren und weitere Reagenzien .....	31
2.2 Materialien für biochemische Analysen.....	31
2.2.1 Lyse von Zellen.....	31

2.2.2	Proteinbestimmung.....	32
2.2.3	SDS-PAGE: Protean II-System (Bio Rad) .....	32
2.2.4	SDS-PAGE: Nu-PAGE-System .....	34
2.2.5	Western Blot .....	34
2.2.6	Verwendete Antikörper für Western Blot.....	35
2.3	Geräte .....	36
2.4	Verbrauchsmaterialien .....	38
3	Methoden.....	40
3.1	Zellbiologische Methoden.....	40
3.1.1	Kultivierung der Zellen .....	40
3.1.2	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes .....	40
3.1.3	Herstellung von PHA-Blasten .....	41
3.1.4	Magnetische Zellseparation.....	41
3.1.5	Inkubation der Zellen im Kulturmedium X-Vivo .....	42
3.1.6	Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl .....	42
3.1.7	Durchflusszytometrie .....	43
3.2	Proteinbiochemische Methoden .....	44
3.2.1	Stimulation von Zellen und Herstellung von Zelllysaten.....	44
3.2.2	Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay .....	45
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	45
3.2.4	Western Blot .....	46
3.2.5	Stripping der Blotmembran .....	46
4	Ergebnisse.....	48
4.1	Expressionsanalyse der Chemokinrezeptoren von nicht-neoplastischen und neoplastischen T-Zellen .....	48
4.2	Etablierung und Optimierung einer Methode zur Analyse der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation.....	51

4.3	Identifizierung potenzieller Komponenten der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation .....	55
4.4	Das Adapterprotein HS1 und die Tyrosinkinase ZAP70 in der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signalkaskade.....	58
4.4.1	CXCR4-induzierte HS1-Phosphorylierung.....	58
4.4.2	CXCR4-induzierte ZAP70-Phosphorylierung.....	59
4.4.3	Charakterisierung der Phosphorylierung von ZAP70 und HS1 .....	60
5	Diskussion .....	62
5.1	Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 auf leukämischen und lymphatischen T-Zellen.....	62
5.2	Rolle der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signalkaskade in der Aktin-Reorganisation neoplastischer T-Zellen.....	64
5.3	Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion in neoplastischen T-Zellen.....	66
5.4	SDF1 $\alpha$ -induzierte HS1-Phosphorylierung .....	69
5.5	SDF1 $\alpha$ -induzierte ZAP70-Phosphorylierung .....	71
5.6	Charakterisierung der SDF1 $\alpha$ -induzierten Phosphorylierung von ZAP70 und HS1	72
6	Zusammenfassung .....	74
7	Literaturverzeichnis.....	76
8	Anhang .....	89
8.1	Chemokinrezeptor-Expression der gesunden und neoplastischen T-Zellen	89
9	Danksagung.....	105

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Chemokinfamilien. ....	7
Abb. 2: Schematische Darstellung eines Chemokinrezeptors.....	10
Abb. 3: Schematische Darstellung der Chemokin-induzierten Signalkaskade.....	13
Abb. 4: Chemokin-vermittelte Effekte in der Tumorbilogie. ....	15
Abb. 5: Schematische Darstellung des Adapterproteins HS1. ....	22
Abb. 6: Die Rolle der Adapterproteine Nck und HS1 in der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-vermittelten Migration primärer T-Zellen.....	23
Abb. 7: Chemokinrezeptor-Expression gesunder T-Zellen. ....	49
Abb. 8: Chemokinrezeptor-Expression neoplastischer T-Zellen. ....	50
Abb. 9: Zeitabhängigkeit der SDF $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation. ....	52
Abb. 10: Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien auf die SDF $\alpha$ /CXCR4-induzierte Aktin- Polymerisation von Je6.1 und Peer. ....	53
Abb. 11: Exemplarische Darstellung der SDF1 $\alpha$ -induzierten Aktin-Polymerisation in unterschiedlichen Kulturmedien.....	54
Abb. 12: Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren auf die Zellviabilität. ....	56
Abb. 13: Einfluss unterschiedlicher pharmakologischer Inhibitoren auf die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte Aktin-Polymerisation.....	57
Abb. 14: Nachweis der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Phosphorylierung von HS1. ....	59
Abb. 15 Nachweis der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Phosphorylierung von ZAP70. ....	60
Abb. 16: Einfluss unterschiedlicher pharmakologischer Inhibitoren auf die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte ZAP70- und HS1-Phosphorylierung.....	61
Abb. 17: SDF1 $\alpha$ -induzierte, G-Protein-unabhängige und Src-Tyrosinkinasen-abhängige Phosphorylierung von ZAP70 und HS1 in leukämischen T-Zellen.....	73

## Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: WHO-Klassifikation der T-Zell-Neoplasien .....</i>	<i>5</i>
<i>Tab. 2: Bekannte Chemokine und korrespondierende Chemokinrezeptoren .....</i>	<i>8</i>
<i>Tab. 3: Repräsentative Chemokinrezeptorspezifische Antikörper in der onkologischen Immuntherapie .....</i>	<i>20</i>

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACKR	<i>atypical chemokine receptor</i>
AITL	angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
ALCL	<i>anaplastic large cell lymphoma</i>
ALK	anaplastische Lymphomkinase
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APZ	Antigen-präsentierende Zelle(n)
ATLL	adulte T-Zell-Leukämie/Lymphom
Bad	<i>Bcl-2-antagonist of cell death</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTCL	<i>cutaneous T-cell lymphoma</i>
d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGF	epidermal growth factor
ELMO-1	<i>engulfment and cell motility protein 1</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated Kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FWP	FACS-Waschpuffer
g	Gramm
GDP	guanosindiphosphat
geo MFI	geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensität
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	Heparin-bindender EGF-ähnlicher Wachstumsfaktor
HCC	hepatocellular carcinoma
HCl	Salzsäure
HIF-1 $\alpha$	<i>hypoxia inducible factor</i>
HIV	Humaner Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS1	<i>hematopoietic lineage cell-specific protein 1</i>
i.e.	<i>id est</i> (das heißt)
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IL	Interleukin
in vitro	im Glas
in vivo	im Lebendigen
INF $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IP <sub>3</sub>	Inositol (1,4,5)-Triphosphat
JAK-STAT	<i>janus kinase-signal transducer and activator of transcription</i>
kDa	Kilodalton

K <sub>D</sub>	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
K <sub>i</sub>	Inhibitor konstante
Itk	<i>leukocyte receptor tyrosine kinase</i>
M	Molar
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
Mdm2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
N-WASP	neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
NaCl	Natriumchlorid
Nck	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells</i>
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NPF	<i>nucleation-promoting factor</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PDX	<i>patient-derived xenograft</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC-β	Phospholipase C-β
PS	Penicillin/Streptomycin

PTX	Pertussis Toxin
PTCL-NOS	<i>peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified</i>
R.E.A.L.	<i>Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms</i>
RDC	<i>orphan-Receptor</i>
Rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SDF1 $\alpha$	<i>stromal cell derived factor 1 <math>\alpha</math></i>
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis
SSC	<i>side scatter</i>
Tab.	Tabelle
TAM	<i>tumor-associated macrophages</i>
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TBST	<i>tris-buffered saline with Tween20</i>
TECK	<i>thymus-expressed chemokine</i>
TFH	<i>T follicular helper cells</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>units</i>
u. a.	unter anderem
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZAP70	<i>zeta chain of T-cell receptor associated protein kinase 70</i>
ZTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

# 1 Einleitung

## 1.1 Rolle der T-Lymphozyten im Immunsystem

Das Immunsystem umfasst angeborene und erworbene (adaptive) Abwehrmechanismen. Im Zentrum der erworbenen Immunabwehr steht das lymphatische System, dessen Hauptakteure die Lymphozyten sind. Die Lymphozyten unterteilen sich in B- und T-Lymphozyten sowie NK (Natürliche Killer) Zellen, wobei die letztere Gruppe funktionell zur angeborenen Immunabwehr zählt. Alle drei Zelltypen gehen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks hervor. Bevor B- und T-Lymphozyten ihre Abwehrfunktion aufnehmen, durchlaufen sie als Vorläuferzellen mehrere Reifungsprozesse in unterschiedlichen primären lymphatischen Organen. Während die Reifung der B-Lymphozyten im Knochenmark stattfindet, durchlaufen die T-Lymphozyten im Thymus unterschiedliche Reifestadien, welche im Wesentlichen in der Ausbildung und Differenzierung des T-Zell-Rezeptors (TZR) sowie der Expression von Ko-Rezeptoren bestehen. Der TZR besteht entweder aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette oder aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette. Hierbei machen die sogenannten  $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten etwa 90 % der T-Zellpopulation aus. Während der T-Zellreifung findet ein zufälliges *Rearrangement* der TZR-Gene (VDJ-Rekombination oder somatische Rekombination) statt, sodass eine hohe Diversität an Antigenpezifitäten erzielt wird. Nach unterschiedlichen Prüfungsmechanismen werden die T-Lymphozyten, die einen spezifischen Antigen-erkennenden, aber körpereigene Peptide tolerierenden TZR exprimieren, positiv selektiert. T-Lymphozyten, die auf körpereigene Peptide reagieren, erhalten hingegen Signale, die zum Zelltod führen (negative Selektion). Nachdem die T-Lymphozyten herangereift sind, verlassen sie den Thymus und zirkulieren zwischen dem Blutstrom und den peripheren lymphatischen Organen. Treffen naive T-Zellen auf ihr spezifisches Antigen, das prozessiert und im Kontext mit *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) präsentiert wird, werden sie aktiviert, klonal expandiert und unter dem Einfluss von Zytokinen zu T-Effektorzellen differenziert. Während ihrer Proliferation und Reifung zu T-Effektorzellen durchlaufen die T-Lymphozyten eine Reihe unterschiedlicher Schritte, zu denen auch die Expression der *Cluster of Differentiation* 4 und 8 (CD4/CD8) zählt. Zu Beginn exprimieren die Thymozyten weder CD4 noch CD8 und werden daher auch als

doppelt-negative Thymozyten bezeichnet. Zu dieser Population gehören auch Vorläuferzellen, die sich zu einen zu den weniger häufigen T-Zellen mit einem  $\gamma/\delta$ -TZR entwickeln können, welche selbst im reifen Zustand kein CD4 und nur in wenigen Fällen CD8 exprimieren. Zum anderen können sich die Vorläuferzellen zu den überwiegend vorkommenden T-Zellen mit einem  $\alpha/\beta$ -TZR entwickeln, welche zunächst sowohl CD4 als auch CD8 exprimieren (große doppelt-positive Thymozyten). Im weiteren Verlauf teilen sich die großen doppelt-positiven Thymozyten in kleine doppelt-positive Thymozyten, die anfänglich nur wenige TZR exprimieren. Während die Meisten der kleinen doppelt-positiven Thymozyten durch negative Selektion eliminiert werden, werden nur etwa 2 % der kleinen doppelt-positiven Thymozytenpopulation positiv selektiert, sodass sie weiter heranreifen, verstärkt den TZR exprimieren und sich zu einfach positiven CD4- oder CD8-T-Zellen entwickeln können (Murphy 2018). Die  $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten, die CD8 exprimieren, erkennen prozessierte Antigene im MHC 1-Kontext und differenzieren zu zytotoxischen Effektorzellen. CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ -T-Zellen können nach Aktivierung zytotoxische Substanzen wie Perforin und Granzyme sezernieren oder den Fas-Liganden auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und so Apoptose in entarteten oder Virus-infizierten Zellen induzieren. CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten erkennen spezifisch Antigenfragmente, die von MHC 2-Molekülen präsentiert werden, und können sich zu verschiedenen Subpopulationen von T-Helfer-Zellen oder regulatorischen Zellen (TH1, TH2, TH17 und Treg) entwickeln. TH1-Zellen sezernieren Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) oder *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ). Auf diese Weise stimulieren sie Makrophagen zur Phagozytose und unterstützen so die antigenspezifische Immunantwort. Aktivierte TH2-Zellen sezernieren Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und vermitteln die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Immunglobulin-produzierenden B-Effektorzellen (Plasmazellen). Sie unterstützen so die humorale Immunantwort. TH17-Zellen produzieren Zytokine wie beispielsweise IL-17 und IL-22 und sind funktionell in der frühen Abwehrphase gegen eindringende Pathogene an epithelialen Grenzflächen beteiligt. Die regulatorischen T-Zellen (Treg-Zellen) setzen anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 oder den *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) frei und sind maßgeblich an der Regulierung und Verhinderung überschießender oder autoimmuner Abwehrreaktionen beteiligt (Böcker 2008, Ganten und Ruckpaul 2013).

### 1.1.1 Neoplasien der T-Lymphozyten

Maligne Neoplasien sind in Deutschland mit etwa 25 % aller Todesfälle die zweithäufigste Todesursache nach den Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems. Die Neoplasien des lymphatischen und blutbildenden Systems repräsentieren hierbei die fünfthäufigste Todesursache im Bereich der Tumorerkrankungen („Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online“ 2021). Zu den Hauptvertretern der hämatoonkologischen Neoplasien zählen Leukämie- und Lymphom-Erkrankungen. Die Bezeichnung „Leukämie“ (weißes Blut) geht auf die charakteristische Verbreiterung der Leukozytenmanschette (*buffy coat*) nach der Zentrifugation von Blutproben und Anreicherung der Lymphozyten zurück. Im Rahmen der Leukämie findet eine unkontrollierte und übermäßige Bildung von Leukozyten statt. Die entarteten Leukozyten breiten sich dabei im Knochenmark aus, verdrängen dort andere Zellpopulationen, die der Blutbildung dienen, und treten vermehrt im peripheren Blut auf. Hierdurch können sie sich mit dem Blutstrom im gesamten Organismus verbreiten. Aus diesem Grund wird für diese Erkrankungen häufig die Bezeichnung „Blutkrebs“ verwendet. Leukämien werden je nach ihrem Verlauf und Zelltyp in die akute oder chronisch myeloische Leukämie (AML/CML) und in die akute oder chronische lymphatische Leukämie (ALL/CLL) unterschieden. Lymphome sind eine heterogene Gruppe lymphatischer Neoplasien und gehen aus Lymphknoten oder extranodalem lymphatischen Gewebe hervor. Im Frühstadium sind die Lymphome meist lokal begrenzt und gehen in den fortgeschrittenen Stadien in eine Systemerkrankung über, die sich auch in extralymphatischen Geweben manifestieren kann. Aufgrund ihrer primären Manifestation werden Lymphome auch als „Lymphdrüsenkrebs“ bezeichnet. Die Lymphome lassen sich zunächst in die Hodgkin-Lymphome (Morbus Hodgkin, Lymphogranulomatose) und die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) einteilen. Die Hodgkin-Lymphome leiten sich in der Regel von entarteten B-Lymphozyten ab und zeigen bei der histologischen Untersuchung mehrkernige Sternberg-Reed-Zellen, die durch eine Fusion von mehreren einkernigen Hodgkin-Zellen entstanden sind. Die Non-Hodgkin-Lymphome können von B- (90 %) oder T-Lymphozyten (10 %) ausgehen. Je nach klinischen, morphologischen, immunphänotypischen und molekularen Eigenschaften können Non-Hodgkin-Lymphome in indolente NHL (70 %) und in aggressive NHL (30 %) oder anhand der World Health Organization (WHO)-Kriterien klassifiziert werden. Hierbei unterscheidet die WHO-Klassifikation vorrangig zwischen Lymphomen der Vorläuferzellen von B-

und T-Zellen sowie Lymphomen der reifen B- und T-Zellen, wobei die letzteren mit den Neoplasien der NK-Zellen zunächst in einer übergeordneten Gruppe zusammen betrachtet werden (Campo et al. 2011, Swerdlow et al. 2016; Tabelle 1). Die Lymphome und Leukämien der T-Zell-Reihe zeigen im Vergleich zu den malignen B-Zell-Neoplasien mit wenigen Ausnahmen einen deutlich aggressiveren Verlauf mit Infiltration verschiedenster Gewebe und eine niedrige Ansprechrate auf eine konventionelle Therapie (Gisselbrecht et al. 1998, Pan et al. 2009, Jones 2010, Bajor-Dattilo et al. 2013, Ma und Abdul-Hay 2017). Die Neoplasien der T-Zell-Reihe leiten sich von T-lymphoiden Zellen unterschiedlicher Differenzierungsgrade ab und weisen dadurch eine sehr hohe Heterogenität auf (Coico und Sunshine 2015). Die Einteilung und Unterscheidung der T-Zell-Neoplasien finden sich in diversen Klassifikationen wieder. Die „*Proposed Classification*“ der WHO basiert auf der „*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*“ (R.E.A.L.) unter Berücksichtigung einer Kombination verschiedener Kriterien wie beispielsweise der Zellmorphologie, des Immunphänotyps, der genetischen Faktoren und der klinischen Krankheitsbilder, und unterscheidet im Allgemeinen die Gruppen der unreifen (lymphoblastischen) von den reifen (peripheren) T-Zell-Neoplasien (Jaffe et al. 1997, Jiang et al. 2017). Während die lymphoblastischen T-Zell-Neoplasien den T-Zell-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und dem Thymus entstammen, leiten sich die peripheren T-Zell-Neoplasien von den reifen T-Lymphozyten ab. Zu den weltweit häufigsten Vertretern der T-Zell-Lymphome und -Leukämien zählen die unspezifizierten peripheren T-Zell-Lymphome (PTCL-NOS; ca. 26 %), die angioimmunoblastischen T-Zell-Lymphome (AITL; ca. 18 %), die anaplastischen großzelligen Lymphome (ALCL; ca. 12 %) und die adulten T-Zell-Leukämien/Lymphome (ATLL; ca. 10 %) (Vose et al. 2008).

**Tab. 1: WHO-Klassifikation der T-Zell-Neoplasien**

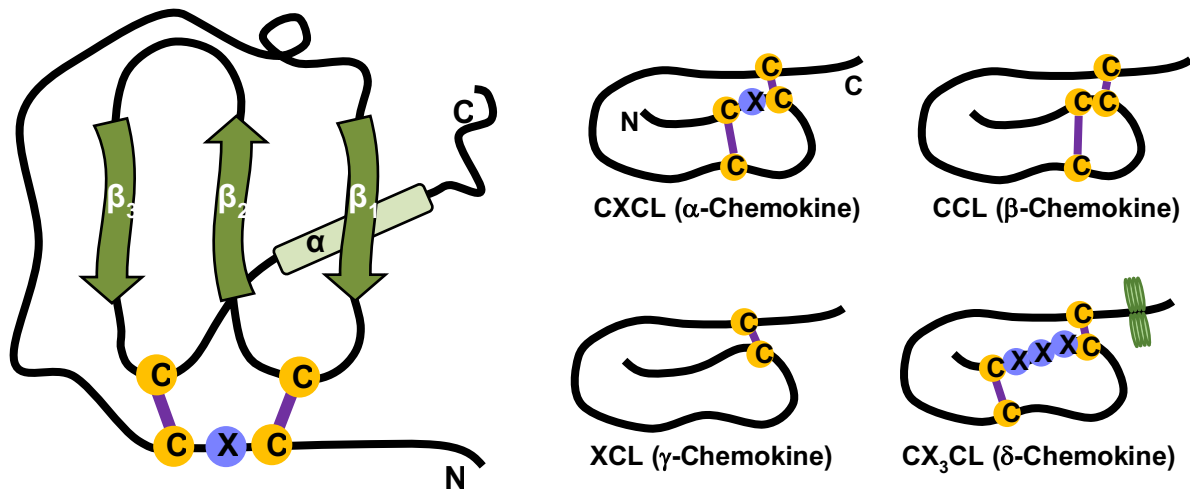
(Modifiziert nach Swerdlow et al. 2008, 2017).

WHO-Klassifikation der unreifen T-Zell-Neoplasien
Vorläufer-T-lymphoblastisches Lymphom/Leukämie
WHO-Klassifikation der reifen T-Zell- und NK-Zell-Neoplasien
<b>Nodal</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• angioimmunoblastisches T-Zell Lymphom</li> <li>• peripheres T-Zell Lymphom mit TFH-Phänotyp</li> <li>• peripheres T-Zell Lymphom, nicht weiter spezifizierbar</li> <li>• anaplastisches großzelliges T-/NK-Zell-Lymphom, ALK-positiv</li> <li>• anaplastisches großzelliges T-/NK-Zell-Lymphom, ALK-negativ</li> </ul>
<b>Extranodal</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• extranodales NK-/T-Zell Lymphom, nasaler Typ</li> <li>• subkutanes T-Zell-Lymphom vom Pannikulitis-Typ</li> <li>• Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom</li> <li>• hepatosplenisches T-Zell Lymphom</li> </ul>
<b>Leukämisch</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• T-Zell Prolymphozyten-Leukämie</li> <li>• T-Zell-Leukämie großer granulierter Lymphozyten</li> <li>• chronische lymphoproliferative Erkrankung der NK-Zellen</li> <li>• aggressive NK-Zell-Leukämie</li> <li>• adulte(s) T-Zell-Leukämie/Lymphom</li> </ul>
<b>Kutan</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mycosis fungoides</li> <li>• Sézary-Syndrom</li> <li>• primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom</li> <li>• lymphomatoide Papulose</li> <li>• primäres kutanes <math>\gamma/\delta</math>-T-Zell-Lymphom</li> <li>• primäres kutanes CD8-positives aggressives epidermotropes zytotoxisches T-Zell-Lymphom</li> <li>• primär kutanes CD4-positives klein- bis mittelgroßzelliges T-Zell-Lymphom</li> </ul>

## 1.2 Chemokine und ihre Rezeptoren

### 1.2.1 Klassifizierung der Chemokine

Als Signalmoleküle stellen Chemokine eine komplexe Gruppe chemotaktisch wirksamer Zytokine dar. Sie sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Chemokine regulieren neben der Zellmigration und Rekrutierung von Immunzellen die Proliferation und das Überleben einer Zelle und beeinflussen so maßgeblich biologische Prozesse des Immunsystems (Hughes und Nibbs 2018). Bisher sind etwa 50 humane Chemokine beschrieben (Tabelle 2), die bis auf wenige Ausnahmen 70 bis 130 Aminosäuren umfassen und ein Molekulargewicht von 8 bis 12 kDa aufweisen. Trotz einer Sequenzhomologie zwischen 20 % und 90 % besitzen alle Chemokine eine auffallend ähnliche Tertiärstruktur mit einer variablen N-terminalen Schleife, drei anti-parallel ausgerichteten  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix am C-Terminus (Clowse und Gronenborn 1995, Miller und Mayo 2017). Am N-Terminus liegt ein charakteristisches konserviertes Cysteinmuster vor. Hierbei bilden die N-terminalen Cysteinreste jeweils eine Disulfidbrücke zu den Cysteinresten in den Schleifen aus, die das erste und das zweite Faltblatt bzw. das dritte Faltblatt und die  $\alpha$ -Helix verbinden (Abbildung 1). Entsprechend der Anordnung und Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dritten sowie dem zweiten und vierten Cysteinrest können Chemokine strukturell in vier unterschiedliche Klassen (CXC oder  $\alpha$ , CC oder  $\beta$ , C oder  $\gamma$  und CX<sub>3</sub>C oder  $\delta$ ) eingeteilt werden. Während die ersten beiden N-terminalen Cysteine bei den CC-Chemokinen in direkter Nachbarschaft stehen, werden sie bei den CXC- bzw. CX<sub>3</sub>C-Chemokinen durch eine bzw. drei variable Aminosäuren (X) voneinander getrennt. Vertreter der C-Chemokine tragen lediglich ein Cystein am N-Terminus (Zlotnik und Yoshie 2000).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Chemokinfamilien.**

Chemokine besitzen eine variable N-terminale Schleife, darauffolgend drei anti-paralell ausgerichtete  $\beta$ -Faltblätter und eine  $\alpha$ -Helix vor dem C-terminalen Ende. Chemokine der  $\delta$ -Familie weisen zudem am N-Terminus einen hydrophoben Mucin-ähnlichen Anteil auf, welcher die Zellmembran durchspannt. (Modifiziert nach Miller und Mayo 2017.)

Neben der strukturellen Klassifizierung können Chemokine auch anhand ihrer Funktion und ihres Expressionsprofils in homöostatische und inflammatorische Chemokine unterteilt werden. Die homöostatischen Chemokine werden in den primären und sekundären lymphatischen Geweben konstitutiv sezerniert. Sie regulieren die zielgerichtete Migration von B- und T-Lymphozyten sowie weiterer Immunzellen im Rahmen der physiologischen Zellreifung und Differenzierung. Die inflammatorischen Chemokine werden bei Entzündungsprozessen unter Einwirkung von Wachstumsfaktoren und proinflammatorischen Stimuli lokal sezerniert. Sie rekrutieren spezifische Leukozyten-Subpopulationen und unterstützen auf diesem Weg die gezielte Immunreaktion an den Entzündungsorten (Bachelerie et al. 2014, Chen et al. 2018).

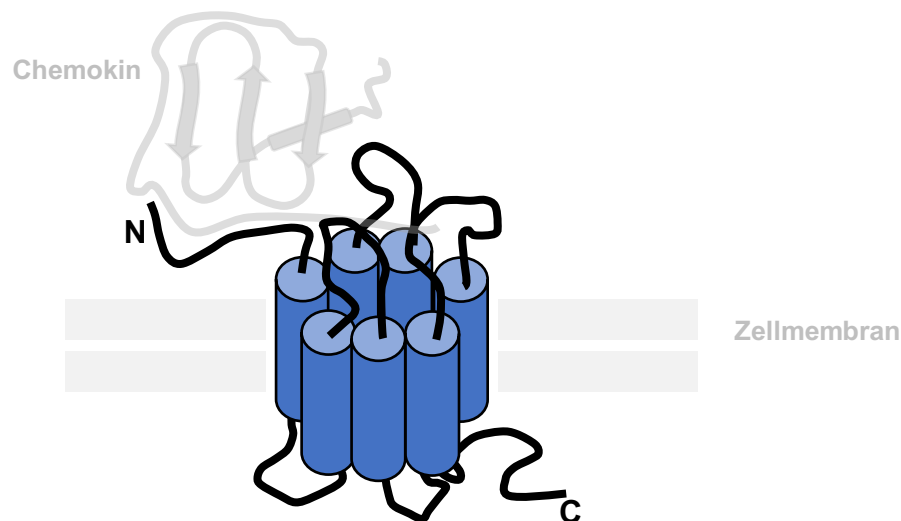
**Tab. 2: Bekannte Chemokine und korrespondierende Chemokinrezeptoren**  
(nach Zlotnik und Yoshie 2000).

Chemokin	Synonym	Rezeptor
<b>CXCL (<math>\alpha</math>-Chemokine)</b>		
CXCL1	Gro- $\alpha$ , GRO1, NAP-3	CXCR2
CXCL2	Gro- $\beta$ , GRO2, MIP-2 $\alpha$	CXCR2
CXCL3	Gro- $\gamma$ , GRO3, MIP-2 $\beta$	CXCR2
CXCL4	PF-4	CXCR3
CXCL5	ENA-78	CXCR1, CXCR2
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2, CTAPIII, $\beta$ -Ta, PEP	CXCR2
CXCL8	IL-8, NAP-1, MDNCF, GCP-1	CXCR1, CXCR2
CXCL9	MIG, CRG-10	CXCR3
CXCL10	IP-10, CRG-2	CXCR3
CXCL11	I-TAC, $\beta$ -R1, IP-9	CXCR3
CXCL12	SDF-1, PBSF	CXCR4
CXCL13	BCA-1, BLC	CXCR3, CXCR5
CXCL14	BRAK, bolekin	unbekannt
CXCL15	Lungkin, WECH	unbekannt
CXCL16	SRPSOX	CXCR6
CXCL17	DMC, VCC-1	unbekannt
<b>CCL (<math>\beta</math>-Chemokine)</b>		
CCL1	I-309, TCA-3	CCR8
CCL2	MCP-1	CCR2, CCR5
CCL3	MIP-1 $\alpha$	CCR1, CCR4, CCR5
CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR1, CCR3, CCR5, CCR8
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR4, CCR5,
CCL6	C10, MRP-2	CCR1, CCR3
CCL7	MARC, MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
CCL9/10	MCP-2, CCF18, MIP- $\gamma$	CCR1, CCR3
CCL11	Eotaxin	CCR3, CCR5

<b>CCL (<math>\beta</math>-Chemokine)</b>		
CCL12	MCP-5	CCR2
CCL13	MCP-4, NCC-1, Ck $\beta$ 10	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
CCL14	HCC-1, MCIF, Ck $\beta$ 1, NCC-2, CCL	CCR1, CCR5
CCL15	Leukotactin-1, MIP-5, HCC-2, NCC-3	CCR1, CCR3
CCL16	LEC, NCC-4, LMC, Ck $\beta$ 12	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR8
CCL17	TARC, dendrokinine, ABCD-2	CCR4, CCR8
CCL18	PARC, DC-CK1, AMAC-1, Ck $\beta$ 7, MIP-4	CCR8
CCL19	ELC, Exodus-3, Ck $\beta$ 11	CCR7
CCL20	LARC, Exodus-1, Ck $\beta$ 4	CCR6
CCL21	SLC, 6Ckine, Exodus-2, Ck $\beta$ 9, TCA-4	CCR7
CCL22	MDC, DC/ $\beta$ -CK	CCR4
CCL23	MPIF-1, Ck $\beta$ 8, MIP-3, MPIF-1	CCR1
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ck $\beta$ 6	CCR3
CCL25	TECK, Ck $\beta$ 15	CCR9
CCL26	Eotaxin-3, MIP-4 $\alpha$ , IMAC, TSC-1	CCR3
CCL27	CTACK, ILC, Eskine, PESKY, Skinkine	CCR10
CCL28	MEC	CCR3, CCR10
<b>XCL (<math>\gamma</math>-Chemokine)</b>		
XCL1	Lymphotactin- $\alpha$ , SCM-1 $\alpha$ , ATAC, SCYC1	CXCR1
XCL2	Lymphotactin $\beta$ , SCM-1 $\beta$ , SCYC2	CXCR1
<b>CX<sub>3</sub>CL (<math>\delta</math>-Chemokine)</b>		
CX <sub>3</sub> CL1	Fractalkine, Neurotactin, ABCD-3	CX <sub>3</sub> CR1

### 1.2.2 Chemokinrezeptoren

Chemokine vermitteln ihre Wirkung über die Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren. Aktuell sind mehr als 20 humane Chemokinrezeptoren bekannt, die ebenfalls entsprechend ihrer Liganden-Struktur in vier Klassen eingeteilt werden: CXCR, CCR, XCR und CX<sub>3</sub>CR. Mit einer Länge von 340 bis 370 Aminosäuren beträgt das Molekulargewicht der Chemokinrezeptoren etwa 40 kDa. Als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren besitzen sie sieben  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (Abbildung 2). Zusammen mit den extrazellulären Schleifen bildet das N-terminale Ende die Liganden-Bindungstasche. An dem intrazellulär liegenden C-Terminus befinden sich Serin- und Threoninreste. Diese vermitteln mit den intrazellulären Schleifen die Interaktion mit G-Proteinen und anderen an der Signaltransduktion beteiligten Molekülen (Murphy et al. 2000, Allen et al. 2007).



**Abb. 2: Schematische Darstellung eines Chemokinrezeptors.**

Chemokinrezeptoren bestehen aus sieben Transmembranbereichen und je drei intrazellulären sowie extrazellulären Schleifen (Modifiziert nach Murphy et al. 2000, Arimont et al. 2017.)

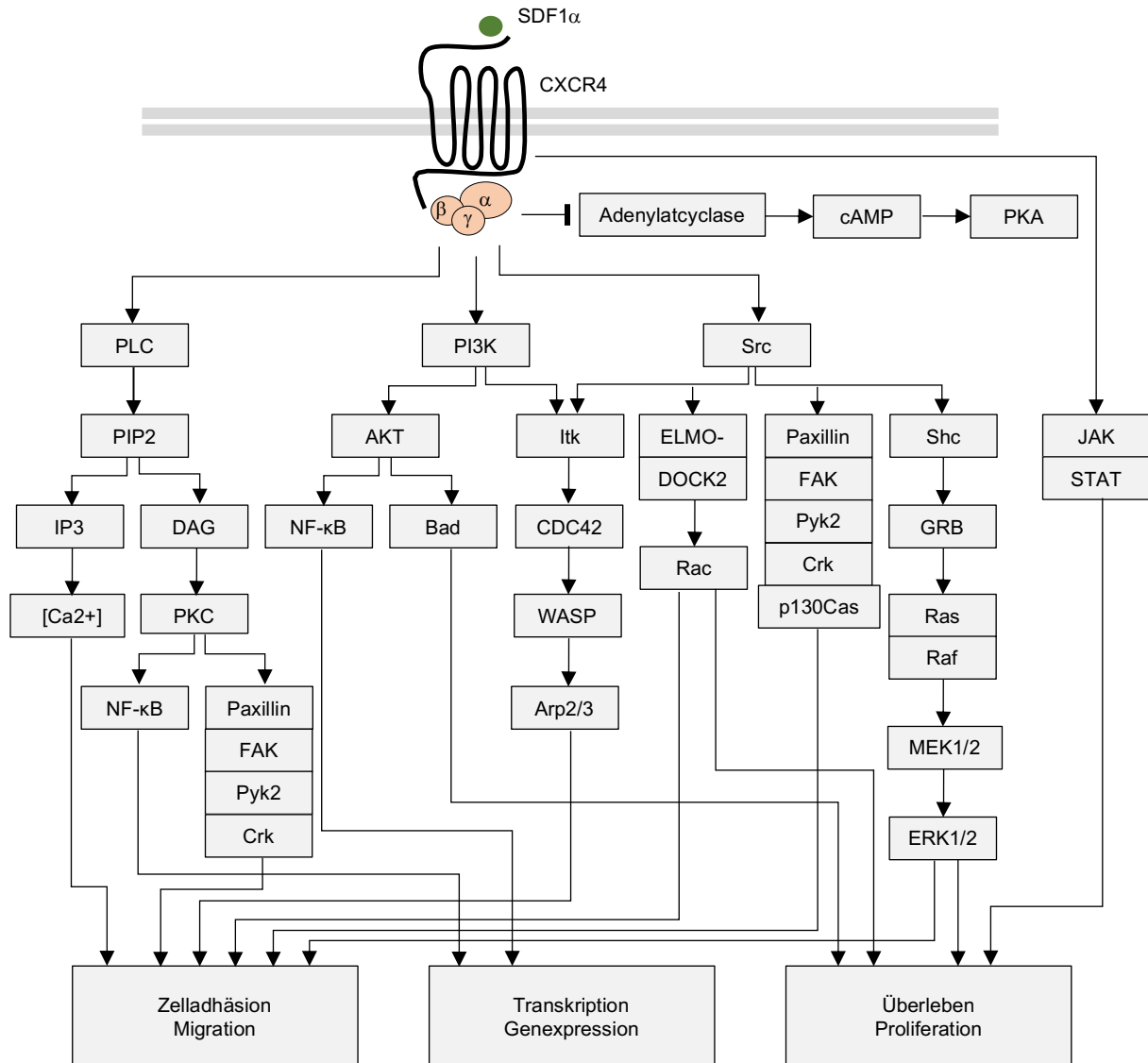
### 1.3 Chemokinrezeptor-System SDF1 $\alpha$ /CXCR4

Der Rezeptor CXCR4 wurde insbesondere durch seine Rolle als Ko-Rezeptor auf T-Zellen für den Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) bekannt und ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen. Er bindet selektiv das Chemokin SDF1 $\alpha$  (*stromal cell derived factor 1  $\alpha$* ; CXCL12) und ist sowohl an physiologischen als auch pathologischen Prozessen der kardiovaskulären

Organogenese, Hämatopoese, der Immunantwort und der Progression von Neoplasien beteiligt. Mutationen des CXCR4-Rezeptors oder Abweichungen der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-vermittelten Signalkaskade können daher in schweren Fehlbildungen oder Funktionsstörungen resultieren. So versterben *Knockout*-Mäuse, denen CXCR4 oder SDF1 $\alpha$  fehlen, aufgrund von schweren Organschäden bereits während der pränatalen Entwicklung. Malignome der Brust, Lunge, Niere und Prostata sowie des Ovars zeigen oft eine CXCR4-Überexpression, während die korrespondierenden nicht-neoplastischen Gewebe den Chemokinrezeptor nur gering oder gar nicht exprimieren. Bisher konnte in mehr als 23 verschiedenen Tumorentitäten des Menschen eine erhöhte Expression von CXCR4 nachgewiesen werden (Furusato et al. 2010, Nagasawa 2014, Kawaguchi et al. 2019a).

Nach Aktivierung und Homodimerisierung des Rezeptors führt die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte Signaltransduktion einerseits zu einer G-Protein-unabhängigen Signalkaskade über den JAK-STAT-Signalweg, welche durch die Rekrutierung verschiedener Enzyme und Substrate einen enormen Einfluss auf die Regulierung der Zellpolarität und der Zellmorphologie hat. Andererseits löst die CXCR4-Aktivierung über das gekoppelte G-Protein eine komplexe Signalkette mit mehreren nacheinander geschalteten Ebenen aus (Abbildung 3). Das heterotrimere G-Protein wird infolge der Ligand-Rezeptor-Interaktion durch den Austausch von GDP gegen GTP aktiviert und dissoziiert in eine GTP-bindende  $\alpha_i$ - und eine  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Hierbei aktiviert die  $\beta\gamma$ -Untereinheit Enzyme wie beispielsweise die Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) und die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Die aktivierte PLC spaltet Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP2) in Inositol (1,4,5)-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). Das IP3 bewirkt durch die Bindung an den entsprechenden Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum eine Freisetzung von Kalzium-Ionen aus den intrazellulären Speichern. Das zytosolische Kalzium beeinflusst wiederum als sekundärer Botenstoff direkt oder indirekt über die Bindung unterschiedlicher Effektormoleküle wie beispielsweise Calmodulin, Calcineurin, Proteinkinase C und Troponin C die Aktivität von Transportproteinen und Enzymen und die Transkription spezifischer Gene. So reguliert eine Steigerung des zytosolischen Kalziums die Ausschüttung von Neurotransmittern und Hormonen, die Zellproliferation und Apoptose sowie weitere zelluläre Prozesse wie z. B. Änderungen des Zytoskeletts und des Zellstoffwechsels (Cojoc et al. 2013, Heinrich et al. 2014). Über Kalzium-Ionen und DAG erfolgt zudem die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), welche wiederum die

Phosphorylierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase-Komplexes (IKK) induziert. Der IKK aktiviert seinerseits die I $\kappa$ B-Proteine und bewirkt so deren Ubiquitinylierung und proteasomalen Abbau. Dadurch werden NF- $\kappa$ B-Moleküle von ihren Inhibitoren freigesetzt und translozieren in den Zellkern. Durch Bindung an regulatorische Abschnitte der DNA können sie die Transkription verschiedener Gene induzieren. Des Weiteren interagiert die aktivierte PKC mit unterschiedlichen Proteinen des fokalen Zelladhäsionskomplexes wie z. B. FAK (*focal adhesion kinase*) und PYK2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*). Diese Kinasen rekrutieren und phosphorylieren im Anschluss wiederum eine Vielzahl von Substraten wie z. B. p130Cas, Crk, Nck und Paxillin, welche die Zelladhäsion koordinieren und das Zytoskelett regulieren. Die aktivierte PI3K phosphoryliert und aktiviert weitere Proteine wie z. B. Itk und AKT, welche ihrerseits Signalkaskaden auslösen, die eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts induzieren. AKT fördert zudem Proliferation und Zellüberleben, indem das pro-apoptotische Protein Bad (*Bcl-2-Antagonist of Cell Death*) inaktiviert und Beta-Catenin als Koaktivator der Transkription stabilisiert wird. Die dissoziierte  $\alpha_i$ -Untereinheit des G-Proteins bewirkt durch die Inhibition der Adenylatzyklase eine Verminderung des intrazellulären zyklischen Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP)-Spiegels und aktiviert Tyrosinkinassen der Src-Familie wie z. B. Lck, Lyn oder Fyn. Die Src-Kinasen rekrutieren und phosphorylieren wiederum weitere Proteine. Hierzu zählen Itk (*leukocyte receptor tyrosine kinase*), FAK, PYK2, ELMO-1 (*engulfment and cell motility protein 1*) und Shc. Während Itk, FAK, PYK2 und ELMO1 an der Zytoskelett-Umstrukturierung beteiligt sind, führt die Phosphorylierung von Shc zur Rekrutierung des Grb2/SOS-Protein-Komplexes und der Aktivierung der Ras-MAPK-vermittelten Signalkaskade. Diese Kaskade beeinflusst wiederum viele biologische Prozesse wie beispielsweise das Überleben, die Proliferation und die Migration der Zelle in Abhängigkeit der entsprechenden chemotaktischen Stimuli (Teicher und Fricker 2010, Cojoc et al. 2013, Xu et al. 2015, Mousavi 2020).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Chemokin-induzierten Signalkaskade.**

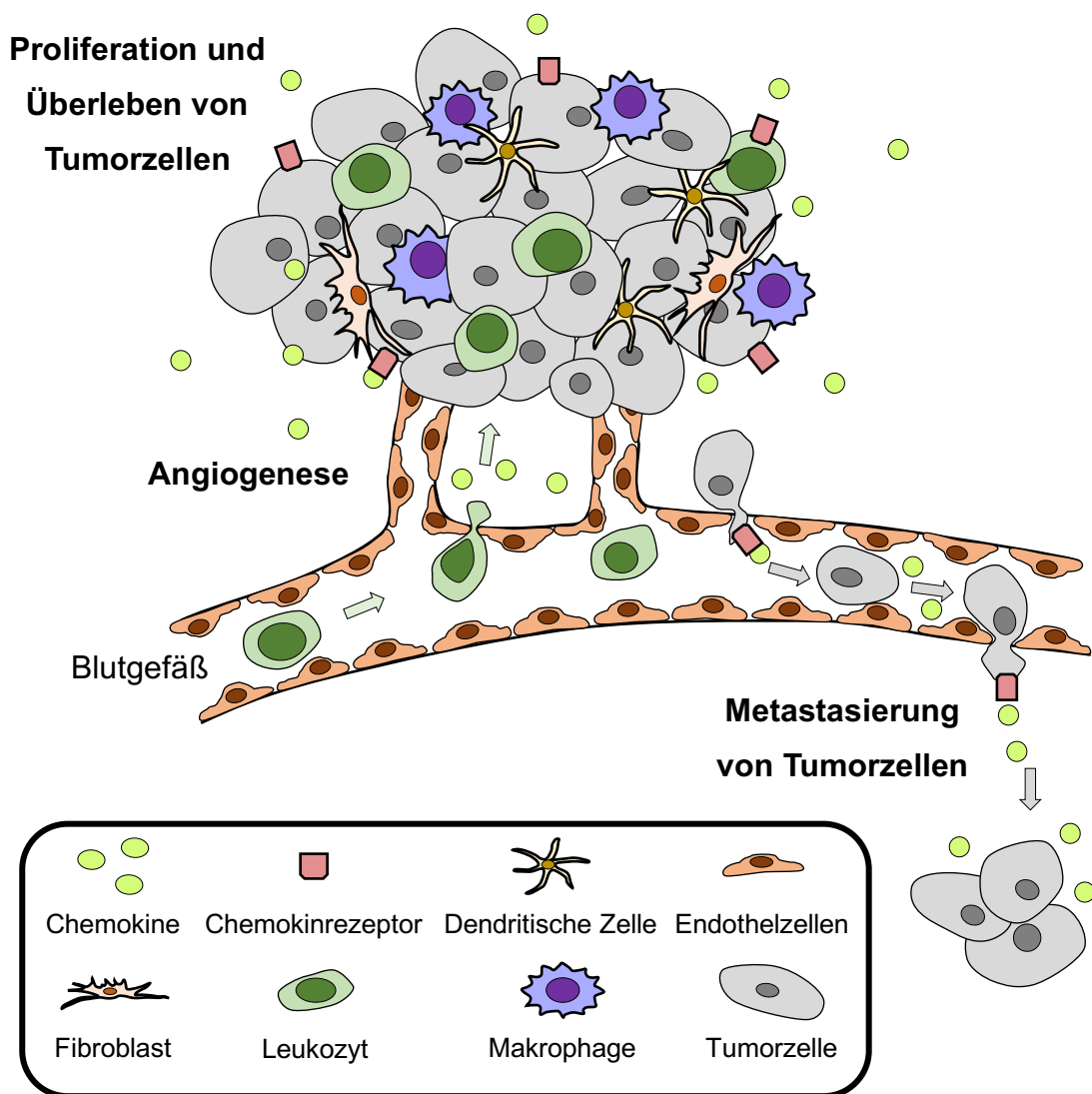
(Modifiziert nach Teicher und Fricker 2010, Xu et al. 2015)

Zusammenfassend beeinflusst die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte Signaltransduktion eine Vielzahl biologischer Prozesse auf unterschiedlichen Ebenen, einschließlich des Migrationspotentials, des Zellüberlebens und der Proliferation. Auf diese Weise nimmt die Interaktion zwischen SDF1 $\alpha$  und CXCR4 eine zentrale Rolle in der Tumorbilogie ein, indem sie zum unkontrollierten und invasiven Wachstum, zur Proliferation sowie zur organspezifischen Metastasierung von Tumorzellen beiträgt. In diesem Zusammenhang konnten Studien bereits in diversen Tumorerkrankungen wie des Mamma-, Prostata- oder kolorektalen Karzinoms eine Korrelation der CXCR4-Überexpression mit einem kürzeren tumorfreien Intervall und einer niedrigeren Überlebensrate nachweisen (Balkwill 2004). Die Inhibition von CXCR4 kann so unter

anderem beim Mammakarzinom die Tumorwachstumsrate und Metastasierung vermindern (Liang et al. 2004, Chen et al. 2011).

#### **1.4 Chemokine in der Tumorbilogie**

Tumore stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, welche insbesondere die Eigenschaft der unkontrollierten Zellproliferation gemeinsam haben. In den meisten Geweben und Organen wird die physiologische Homöostase durch ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod aufrechterhalten. Verlieren Zellen ihre Fähigkeit, auf wachstumsregulierende Mechanismen angemessen zu reagieren, können sie entarten, sich ausbreiten und sich als Metastasen in anderen Organen ansiedeln (Hanahan und Weinberg 2011). Durch die heutigen Methoden der Chirurgie und Chemo- sowie Radiotherapie kann in vielen Fällen eine Eradikation des Primärtumors erzielt werden. Metastasen sind jedoch nur eingeschränkt therapierbar und sind für etwa 90 % der tumorbedingten Todesfälle ursächlich (Bagley 2010, Chaffer und Weinberg 2011, Taketo 2011, Guan 2015). Der Verlauf einer Tumorerkrankung ist vorrangig von dem Wachstums- und Metastasierungspotential der entarteten Zelle abhängig. Beide Prozesse werden sowohl von den Eigenschaften der Tumorzelle als auch von den Umgebungsverhältnissen bestimmt. Während die Eigenschaften einer Tumorzelle vom Zelltyp und Rezeptorexpressionsprofil sowie dem entsprechenden Second Messenger-System geprägt werden, wird die Mikroumgebung einer Zelle durch die dort vorkommenden Endothelzellen, Stromazellen und Tumorzellen sowie einer Vielzahl von biologisch aktiven Molekülen, die verschiedene Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems rekrutieren und regulieren, stetig beeinflusst (Blonska et al. 2015). Eine besondere Stellung nehmen hierbei Chemokine und Chemokinrezeptoren ein (Bagley 2010 ff. Nagarsheth et al. 2017). Sie beeinflussen die Pathogenese zahlreicher Tumore und vermitteln unterschiedliche Effekte auf die Tumorentwicklung, die Angiogenese, die Invasion und Metastasierung (Koizumi et al. 2007; Abbildung 4).



**Abb. 4: Chemokin-vermittelte Effekte in der Tumorbiologie.**

Das Chemokin-Chemokinrezeptor-System nimmt in der Tumorbiologie eine zentrale Rolle ein. Einerseits tragen Chemokine zum lokalen Tumorwachstum bei, indem sie die Angiogenese und Tumorzellproliferation fördern und die Apoptose von Tumorzellen hemmen. Andererseits begünstigen sie über die Freisetzung spezifischer Chemokine die Fernmetastasierung der Tumorzellen durch die Gradienten-abhängige Wanderung und Adhäsion von Tumorzellen am Endothel sowie die Extravasation und Ansiedlung der Tumorzellen im Zielgewebe (Modifiziert nach Kakinuma und Hwang 2006).

#### 1.4.1 Tumorwachstum und Progression

Im Gegensatz zu gesunden Zellen haben Tumorzellen die Fähigkeit verloren, auf wachstumsregulierende Kontrollmechanismen angemessen zu reagieren. Sie wachsen und teilen sich unkontrolliert und haben die Fähigkeit, Gewebsgrenzen zu überschreiten und invasiv zu wachsen oder zu metastasieren. Tumore lösen dabei komplexe immunologische Reaktionen aus und können sowohl die Expression von

Entzündungsmediatoren, als auch die Einwanderung von Immunzellen bewirken. In zahlreichen Studien konnte eine abnorme Chemokin-Freisetzung oder Chemokinrezeptor-Expression mit einer modifizierten Signaltransduktion in den unterschiedlichsten Tumorerkrankungen beobachtet werden, die neben dem Überleben, auch die Proliferation und Motilität der Tumorzelle begünstigt (Bagley 2010). Nach der Bindung an einen korrespondierenden Rezeptor können Chemokine über den Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)- oder den "*Extracellular-signal Regulated Kinase*" (ERK)-vermittelten Signalweg die Expression wichtiger Wachstums-stimulierender Gene wie Cyclin D1, Fos und des Heparin-bindenden EGF-ähnlichen Wachstumsfaktors (HB-EGF) bewirken und das Überleben der Tumorzelle durch ein Ungleichgewicht zwischen den pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Proteinen begünstigen, indem sie die Aktivität der Caspase 3 und 9, sowie die Expression pro-apoptisch-wirkender BCL2-Proteine inhibieren oder die Expression des Tumorsuppressor p53-inhibierenden Proteins "*Mouse double minute 2 homolog*" (Mdm2) erhöhen. Über die Überexpression spezifischer Chemokinrezeptoren und einer gesteigerten Freisetzung verschiedener Chemokine können Tumorzellen des Weiteren ihre biologische Aktivität und ihre Mikroumgebung beeinflussen, um günstigere Überlebensbedingungen zu schaffen. Hierbei kann die Expression der Rezeptoren sowohl durch proinflammatorische Signale als auch durch den Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  (*Hypoxia inducible factor*) erhöht werden. Neoplastische Zellen sind darüber hinaus in der Lage, die lokale Konzentration bestimmter Chemokine hochzuregulieren, indem sie selbst Chemokine sezernieren oder die dort vorkommenden Stromazellen zur Chemokin-Synthese und Freisetzung stimulieren. Als zytotaktisch wirksame Mediatoren bewirken Chemokine die Einwanderung (*Homing*) von Immunzellen wie Granulozyten, Leukozyten und dendritischen Zellen. Einige Untergruppen der Immunzellen wie z. B. TAM (*tumor-associated macrophages*) oder Treg-Zellen (*regulatory T cells*) können jedoch durch die Suppression von Effektorzellen die Tumorprogression unterstützen, anstatt diese einzudämmen, sodass die Anwesenheit von Treg-Zellen beispielsweise in Primärtumoren des Ovarialkarzinoms mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Cassar et al. 2022). Nicht selten korreliert auch die erhöhte Expression spezifischer Chemokine und Chemokinrezeptoren mit einem kürzeren Rezidiv-freien Intervall oder einer schlechteren Prognose der Tumorerkrankung. Studien des malignen Melanoms zeigten so beispielsweise eine hohe Expression der Rezeptoren CCR7 und CCR10,

sowie eine verstärkte Freisetzung der Chemokine CXCL1-3, CXCL8, CCL12 und CCL5, die ihnen wiederum mittels autokriner oder parakriner Wirkung als Überlebenssignal dienen. Beim Mamma-, Kolon- und Prostatakarzinom ist die erhöhte Freisetzung von CCL5 mit einer fortgeschrittenen Tumorprogression und Metastasierung assoziiert. Auch beim hepatozellulären Karzinom (HCC) deutet eine hohe Expression von CXCR3 auf eine schlechtere Prognose hin (Luboshits et al. 1999, Niwa et al. 2001, Tsukishiro et al. 2006, Sarvaiya et al. 2013, Ren et al. 2018).

### 1.4.2 Angiogenese

Die Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, stellt einen unabdingbaren Schritt in zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen dar wie beispielsweise der Embryogenese, der Wundheilung, chronischen Entzündungsreaktionen und des Wachstums von Tumoren. Während die physiologische Angiogenese durch strikte Mechanismen und die An- oder Abwesenheit von angiogenetischen oder angiostatischen Mediatoren reguliert wird, läuft die Tumor-assoziierte Angiogenese übermäßig und oft unkontrolliert ab. Studien zeigten hierbei eine besondere Stellung der CXC-Chemokinfamilie, die in Abhängigkeit des Vorhandenseins des „ELR-Motivs“ die Angiogenese entweder stimuliert oder inhibiert. Das ELR-Motiv bezeichnet hierbei die Aminosäuresequenz Glutaminsäure (E), Leucin (L) und Arginin (R). Während ELR-negative Chemokine der CXC-Chemokinfamilie wie CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11 oder CXCL14 über die Rezeptoren CXCR3, CXCR4 und CXCR5 angiostatisch wirken, besitzen ELR-positive Chemokine einen angiogenetischen Effekt auf Endothelzellen. Hierbei sind CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 und CXCL8 wichtige Vertreter der angiogenetischen CXC-Chemokine. Über den CXCR1- und CXCR2-vermittelten Signalweg oder die Verstärkung des VEGF (*vascular endothelial growth factor*)-Effekts auf Endothelzellen fördern sie die Angiogenese, sodass das wachsende Gewebe gut vaskularisiert und ausreichend mit Blut versorgt wird. In Tumorerkrankungen tragen ELR-positive Chemokine durch die Stimulation der Angiogenese nicht nur zum stetigen Tumorwachstum bei, sondern auch zur Auswanderung und Metastasierung von Tumorzellen, indem sie deren Eintritt in das Kreislaufsystem erleichtern (Strieter et al. 1995, Gerber et al. 2009, Keeley et al. 2010, Raman et al. 2011).

### **1.4.3 Metastasierung**

Die Metastasierung bezeichnet die Absiedelung von Tumorzellen in entfernte Organe und stellt das Ergebnis einer komplexen Reihe von biologischen Prozessen dar. Sie beruht auf der Invasion zunächst lokaler Strukturen, gefolgt von einer Intravasation in das Kreislaufsystem und Zirkulation sowie der Extravasation der Tumorzellen in ein entferntes Gewebe, wo sie sich schließlich ansiedeln und wachsen können. Hierbei ist das Zielgewebe der Tumormetastasierung meist nicht zufällig. In einer Vielzahl von Studien konnte das Chemokin-Chemokinrezeptor-Netzwerk als ein bedeutsamer Faktor identifiziert werden. Zum einen begünstigen Chemokine die Intravasation von Tumorzellen, indem sie die Vaskularisierung des Primärtumors fördern und Immunzellen rekrutieren, die proinflammatorischen Zytokine, Chemokine und Gewebsproteasen freisetzen. So korreliert beispielsweise die hohe Konzentration des Chemokins CXCL8 beim malignen Melanom und Prostatakarzinom mit einem höheren Potential des Tumors zur Invasion und Metastasierung. Zum anderen können Chemokine die Zirkulation der Krebszellen regulieren und eine organspezifische Absiedelung vermitteln, wobei die Verfügbarkeit bestimmter Chemokinrezeptoren auf den Tumorzellen und deren Migration entlang des korrespondierenden Chemokingradienten als wesentlicher Mechanismus gelten. So wurden in diversen Studien eine organspezifische Metastasierung von CXCR4-exprimierenden Tumorzellen in Gewebe mit einer hohen Konzentration des CXCR4-Liganden SDF1 $\alpha$  (CXCL12) beschrieben. CXCR4-positive Brustkrebszellen und Melanomzellen metastasieren hierbei entsprechend der homöostatischen SDF1 $\alpha$ -Expression häufig in die Lymphknoten, Lunge, Leber oder in das Knochenmark (Mukherjee und Zhao 2013).

### **1.4.4 Chemokin- und Chemokinrezeptor-spezifische Therapieansätze**

In Anbetracht der essenziellen Rolle von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in der Tumorbilogie hat das Chemokin-Netzwerk nicht nur in der Tumordiagnostik, sondern auch in der spezifischen Immuntherapieforschung zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zur Entwicklung einer Chemokinrezeptor-gestützten Pharmakotherapie von Tumorerkrankungen als Mono- oder Kombinationstherapie wurden bisher unterschiedlichste Therapieansätze untersucht. Für die hämatopoetischen Neoplasien stehen gegenwärtig die Chemokinrezeptoren CCR1 (CCX721), CCR4 (KW-0761, Anti-

CCR4 CAR T-Zellen), CCR7 (MSM R707) und CXCR4 (AMD3100, AMD3100 + anti-PD-1, AMD3100 + Ara-C, BKT140 + Rituximab, LY2510924) als Zielstrukturen der pharmakotherapeutischen Ansätze im Fokus, wobei das SDF1 $\alpha$ /CXCR4-System als eines der erforschten Chemokinnetzwerke gilt (siehe Tabelle 5, Mollica Poeta et al. 2019). Zu den untersuchten CXCR4-Inhibitoren zählen PF-06747143 (Phase I) und AMD3100 bzw. Plerixafor (Phase I/II). Bei Patienten mit einem Rezidiv oder einer therapierefraktären Form der akuten myeloischen Leukämie konnte durch die Behandlung mit Plerixafor bereits eine Mobilisierung der leukämischen Blasten aus dem Knochenmark in die Peripherie und folglich eine verbesserte Wirksamkeit der konventionellen Chemotherapie beobachtet werden (Uy et al. 2012). Präklinische *in vivo* Studien des CXCR4-Antagonisten PF-06747143 zeigten bei der akuten myeloischen Leukämie ebenfalls eine signifikante Ausschwemmung der leukämischen Zellen aus dem Knochenmark in das periphere Blutsystem (Zhang et al. 2017). Zudem konnte in "*Patient-derived xenograft*" (PDX)-Mausmodellen, in denen Tumorgewebe von Patienten mit Multiplem Myelom in eine immundefiziente Maus implantiert wurde, durch eine PF-06747143-Behandlung eine Reduktion des Tumorwachstums und eine höhere Überlebensrate erzielt werden (Liu et al. 2017). In Tabelle 3 sind weitere Antikörper gegen unterschiedliche Chemokinrezeptoren aufgelistet, die im Rahmen der onkologischen Immuntherapieforschung aktuell in der Erprobung oder im Einsatz sind.

**Tab. 3: Repräsentative Chemokinrezeptorspezifische Antikörper in der onkologischen Immuntherapie**

(modifiziert nach Mollica Poeta et al., 2019 und Vela et al., 2015).

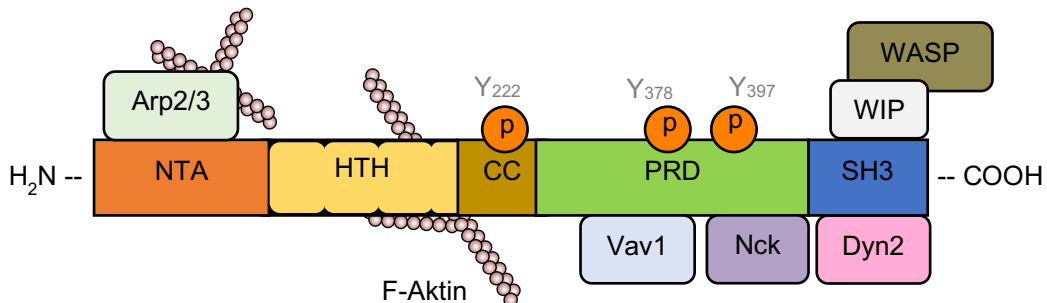
Präklinische Phase		
Zielstruktur	Inhibitor	Tumorentität
CCR1	CCX721 BL5923  CCX9588 + anti-PD-L1	Multiples Myelom hepatisch metastasiertes Kolonkarzinom Mammakarzinom
CCR2	PF-04136309 + GEM CCXC872 + anti-PD-1 RDC018 747 + Sorafenib iCCR2	Pankreaskarzinom Pankreaskarzinom HCC HCC Ovarialkarzinom
CCR4	Anti-CCR4 CAR-T cells Affi 5 AF399/420/1802	T-Zell-Malignome Nierenzellkarzinom Melanome, Bronchialkarzinome, Kolorektales Karzinom
CCR5 CCR7	Maraviroc siRNA  MSM R707	Kolorektales Karzinom metastasiertes kolorektales Karzinom und Prostatakarzinom T-ALL
CXCR2	CXCR2 <sup>-/-</sup> + PTX Navarixin + anti-MEK SB225002 + Sorafenib Reparixin + 5-fluorouracil CXCR2 <sup>-/-</sup> CXCR2 <sup>-/-</sup> + anti-PD-1 SB225002 + RS504393 + FX SB265610 + Docetaxel	Mammakarzinom Melanom Ovarialkarzinom Magenkarzinom Pankreaskarzinom Pankreaskarzinom Pankreaskarzinom Prostatakarzinom
CXCR4	AMD3100 + Ara-C LY2510924 BKT140 + Rituximab AMD 3465 POL5551 + anti-VEGFR AMD3100 AMD3100 + anti-PD-1 AMD3100 + VIC-008 PRX177561 + Bevacizumab + Sunitinib	AML AML NHL Glioblastom und Medulloblastom Glioblastom Ovarialkarzinom Pankreaskarzinom Mesotheliom Glioblastom

Klinische Phase		
Zielstruktur	Zielstruktur	Zielstruktur
CCR2	PF-04136309 + nab-PTX + GEM PF-04136309 + FX  CCX872 + FX	Pankreaskarzinom Duktales Adenokarzinom des Pankreas Pankreaskarzinom
CCR4	KW-0761 (Mogamulizumab)	Adulte T-Zell-Leukämie/ Lymphom-Rezidiv
CCR5 CXCR2	Maraviroc + Chemotherapie AZD5069 Reparixin + PTX	Kolorektales Karzinom Pankreaskarzinom Mammakarzinom
CXCR4	AMD3100 (Plerixafor) LY2510924  BMS-936564 PF-06747143 USL311 + Lomustine Balixafotide + Eribulin  MDX-1338	AML oder Glioblastom-Rezidiv Kolorektales Karzinom, Bronchialkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom AML Hämatopoetische Malignome Solide Tumore, Glioblastom metastasiertes HER <sup>-</sup> Mammakarzinom Multiples Myelom

## 1.5 Das Adapterprotein HS1

Das in den hämatopoetischen Zellen exprimierte Adapterprotein HS1 (*hematopoietic lineage cell-specific protein 1*) ist homolog zu dem Protein Cortactin und besteht aus einer sauren Region (*nitrilotriacetic acid*, NTA) am N-terminalen Ende, welche mit dem Arp2/3-Komplex interagieren kann, gefolgt von einer F-Aktin-bindenden Domäne mit 3,5 *helix-turn-helix* (HTH)-Motiven mit jeweils 37 Aminosäuren und einer *coiled-coil*-Domäne sowie einem Prolin-reichen Bereich, welcher die Interaktionen mit Src- und Syk-Kinasen ermöglicht. Am C-Terminus befindet sich die SH3-Domäne (Urano et al. 2003, Bendell et al. 2017; Abbildung 5). Durch seine zahlreichen Interaktionspartner gilt HS1 als ein Mediator der Aktin-Reorganisation und ist in einer Vielzahl biologischer Prozesse involviert, wie beispielsweise der Aktivierung von B- und T-Zellen sowie der Migration von Natürlichen Killerzellen. Studien zeigten zudem in Tumorerkrankungen wie des Ovarialkarzinoms oder der chronischen lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ eine Korrelation der HS1-Überexpression mit einem aggressiveren

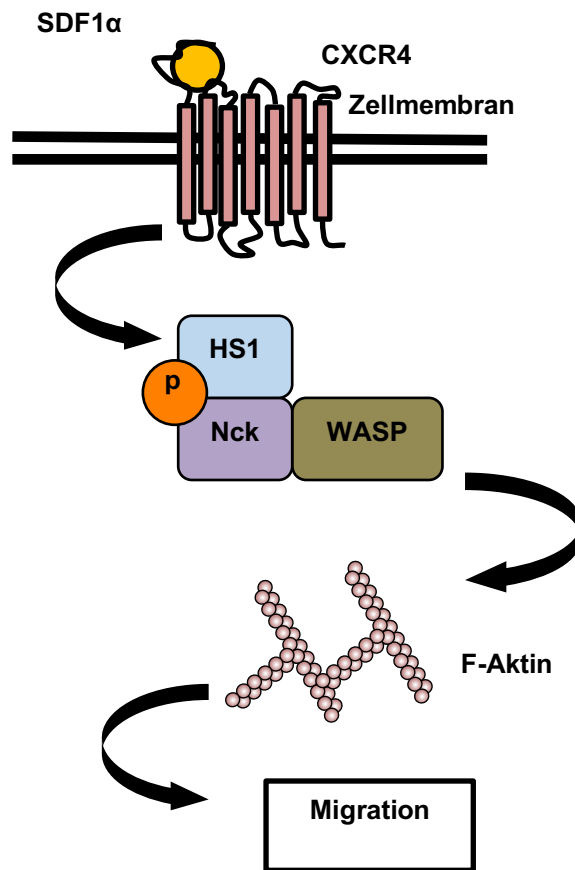
Krankheitsverlauf und einhergehend damit mit einer schlechteren Prognose (Butrym et al. 2012, Frezzato et al. 2012).



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Adapterproteins HS1.**

HS1 besteht aus einer sauren Region (nitrilotriacetic acid, NTA) am N-terminalen Ende, welche das Arp2/3-Komplex binden kann, darauffolgend eine F-Aktin-bindende Domäne mit 3,5 *helix-turn-helix* (HTH)-Motiven mit jeweils 37 Aminosäuren und eine *coiled-coil*-Domäne (CC) sowie eine Prolin-reiche Domäne (PRD), welche die Interaktion mit SH2-Domänen verschiedener Signalproteine wie beispielsweise Vav1, Nck und CK2 (*casein kinase 2*) oder Src-Tyrosinkinasen ermöglicht. Am C-terminalen Ende befindet sich eine SH3-Domäne, welche mit Proteinen wie Dyn2 (Dynamamin 2) und WIP (*WASP-interacting protein*) interagieren kann. (Modifiziert nach Kitamura et al. 1989 und Castro-Ochoa et al. 2019.)

Vorarbeiten der Forschungsgruppe identifizierten in den nicht-transformierten, humanen T-Zellen die Adapterproteine Nck (*Non-catalytic region of tyrosine kinase*) und HS1 als wichtige Mediatoren zwischen der SDF1 $\alpha$ -induzierten Signaltransduktion und der molekularen Maschinerie der Aktin-Reorganisation. In gesunden T-Zellen resultiert die Aktivierung von CXCR4 in einer Phosphorylierung von HS1, wodurch die Bindung von Nck ermöglicht wird. Nck wiederum rekrutiert weitere Proteine wie WASP und den Arp2/3-Komplex, welche das Aktinzytoskelett direkt oder indirekt regulieren. Auf diese Weise nimmt die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte und Nck/HS1-vermittelte Aktin-Polymerisation eine wichtige Rolle in der Zellmigration nicht-transformierter T-Zellen ein (Lettau et al. 2015; Abbildung 6).



**Abb. 6: Die Rolle der Adapterproteine Nck und HS1 in der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-vermittelten Migration primärer T-Zellen.**

(Modifiziert nach Lettau et al. 2015).

## 1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Chemokine und Chemokinrezeptoren spielen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch in der Tumorbilogie eine essenzielle Rolle für die Migration, Proliferation und das Überleben der Zelle. Die Charakterisierung der Chemokinrezeptor-Expression und -Signaltransduktion stellt daher einen wichtigen Aspekt dar, um ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen von T-Zell-Leukämien und Lymphomen zu erlangen und um prognostische Faktoren zu ermitteln und spezifische Therapieoptionen mit einer besseren Verträglichkeit und höherer Überlebensrate zu entwickeln.

In diesem Zusammenhang sollen die im Folgenden aufgeführten Aspekte näher charakterisiert werden:

- **Wie unterscheidet sich die Chemokinrezeptor-Expression leukämischer und lymphatischer T-Zellen von denen gesunder Probanden?**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Expression einer ausgewählten Anzahl von Chemokinrezeptoren auf gesunden und neoplastischen T-Zellen untersucht werden. Anhand von Literaturrecherchen wurden Chemokinrezeptoren mit potenziellem Einfluss auf die Tumorbilogie ausgewählt (CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR3 und CXCR4) (Chow und Luster 2014, Mollica Poeta et al. 2019). Mittels Durchflusszytometrie sollte die Chemokinrezeptor-Expression gesunder und leukämischer Zelllinien vergleichend charakterisiert werden.

- **Beeinflusst die Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren die Aktin-Reorganisation neoplastischer T-Zellen?**

In den durchgeführten Experimenten zeigten die neoplastischen T-Zellen eine veränderte Expression der Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR7 und insbesondere von CXCR4 auf. Da das Migrationspotenzial einer Tumorzelle auf der molekularen Ebene auf der Polymerisation, Depolymerisation und Stabilisierung von Aktinfilamenten beruht, soll nach der Etablierung eines geeigneten Verfahrens zur CXCR4-Stimulation mittels SDF1 $\alpha$  der resultierende Einfluss auf das Zytoskelett mittels Messung der Aktin-Polymerisation charakterisiert werden.

- **Welche Proteine und Enzyme sind in der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation involviert?**

Um die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte Aktin-Polymerisation in neoplastischen T-Zellen näher zu charakterisieren, sollten im Weiteren potenzielle Komponenten der Signalkaskade mit Hilfe unterschiedlicher pharmakologischer Inhibitoren identifiziert werden.

- **Ist das Adapterprotein HS1 an der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion beteiligt?**

In Vorarbeiten der Forschungsgruppe wurden in nicht-transformierten, humanen T-Zellen die Adapterproteine Nck und HS1 als wichtige Mediatoren zwischen der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Signaltransduktion und der molekularen Maschinerie der Aktin-Reorganisation identifiziert. In gesunden T-Zellen führt die Ligation von CXCR4 durch SDF1 $\alpha$  zu einer Phosphorylierung von HS1, wodurch die Bindung von Nck möglich ist. Nck wiederum rekrutiert weitere Interaktionspartner wie WASP und den Arp2/3-Komplex, welche das Aktin-Zytoskelett regulieren. Somit nimmt die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte und Nck/HS1-vermittelte Aktin-Polymerisation eine besondere Rolle in der Zellmigration gesunder T-Zellen ein (Lettau et al. 2015; Abbildung 6). In der vorliegenden Arbeit soll daher die mögliche Beteiligung von HS1 in der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion in neoplastischen T-Zellen untersucht werden.

- **Welche Enzyme sind für die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte Phosphorylierung von HS1 verantwortlich?**

Im Rahmen der Arbeit konnte eine SDF1 $\alpha$ /CXCR4-vermittelte Phosphorylierung von HS1 in neoplastischen T-Zellen nachgewiesen werden. Zur weiteren Charakterisierung der Signalkaskade sollen daher Enzyme identifiziert werden, die in die Phosphorylierung von HS1 involviert sind. Hierbei soll vor allem die Rolle von ZAP70 (*Zeta Associated Protein Kinase of 70 kDa*) untersucht werden. Die Tyrosinkinase ZAP70 ist für ihre Interaktionen mit den  $\zeta$ -Ketten des T-Zell-Antigen-Rezeptor-Komplexes während der T-Zell-Aktivierung bekannt und ist in den letzten Jahrzehnten zunehmend in den Vordergrund der hämatoonkologischen Forschung gerückt. Bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie konnte bereits eine

Überexpression von ZAP70 nachgewiesen werden, welche mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf einhergeht und mit einer niedrigeren Überlebensrate korreliert (Crespo et al. 2009, Rassenti et al. 2009).

## 2 Material

### 2.1 Materialien für zellbiologische Analysen

#### 2.1.1 Zelllinien

Linie	Beschreibung	Patient	Bezugsquelle
Jurkat	Akute lymphatische Leukämie; Klon E6-1 (Je6.1)	14/m	ATCC; TIB-152
J16/Rapo	CD95-negativ; Apoptose-resistente Jurkat-Variante		Peter Krammer, Heidelberg
JFL39.1	CD95L-transfizierte J16/Rapo		AG Janßen
HuT78	Kutanes T-Lymphozyten Sezary-Syndrom	53/m	ATCC; TIB-161
H9	Subklon von HuT78	53/m	ATCC; HTB-176
Ke37	Akute lymphatische Leukämie	27/m	DSMZ; ACC-46
MKB-1	Akute lymphatische Leukämie	17/f	AG Janßen
Molt-4	Akute lymphatische Leukämie	19/m	DSMZ; ACC-362
Molt-13	Akute lymphatische Leukämie	2/f	DSMZ; ACC-436
Molt-17	Akute lymphatische Leukämie	5/f	DSMZ; ACC-36
Peer	Akute lymphatische Leukämie	4/f	DSMZ; ACC-6
P12	Akute lymphatische Leukämie	7/m	DSMZ; ACC-34
Ichikawa			

#### 2.1.2 Medien und Puffer

Medien und Medienzusätze	Hersteller
RPMI 1640-Kulturmedium	Life Technologies, Carlsbad, USA
X-VIVO™ 15-Kulturmedium	Lonza Group Ltd, Basel, SUI
Penicillin/Streptomycin (10000 U/10000 µg)	Biochrom GmbH, Berlin, GER

Fetal Calf Serum (FCS)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Rekombinantes Interleukin 2 (IL-2)	Chiron GmbH, Marburg, GER
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, GER

Die Zellkultivierung erfolgte unter Verwendung des Zellkulturmediums mit 1 % Penicillin/Streptomycin und mit oder ohne 10 % FCS, welches zuvor bei 56 °C für 30 min inaktiviert und steril filtriert (0,22 µm) wurde. Zum Einfrieren der Zellen wurde Zellkulturmedium mit 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid verwendet.

Puffer und Lösungen	Hersteller
Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Biochrom GmbH, Berlin, GER
Zellzahl-Bestimmung	
Trypan blue solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zellseparation	
Ficoll Hypaque (1,077 g/ml)	Biochrom GmbH, Berlin, GER
MACS Waschpuffer:	
0,5 % BSA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
2 mM EDTA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
CD4 <sup>+</sup> T-Zell-Isolationskit, Microbeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, GER
CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Isolationskit, Microbeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, GER

### 2.1.3 Immunfluoreszenz: Durchflusszytometrie

Puffer und Lösungen	Hersteller
PBS (pH 7,3)	
1,3 M NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
20 mM KCl	Merck KGaA, Darmstadt, GER
60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, GER
15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
Waschpuffer	
1 % BSA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
0,1 % NaN <sub>3</sub>	Merck KGaA, Darmstadt, GER
in PBS	
Permeabilisierungspuffer	
1 % (v/v) Triton X 100	Merck KGaA, Darmstadt, GER
in PBS	
Cytofix/Cytoperm-Kit	Becton Dickinson, Heidelberg, GER
Fixierungspuffer	
1 % oder 8 %	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Paraformaldehyd	
in PBS	
Propidiumjodid-Lösung	
Propidiumjodid (3 µg/ml)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
in PBS	

### 2.1.4 Verwendete Antikörper in der Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Hersteller
α-CD2-FITC	ImmunoTools, Friesoythe, GER
α-CD3-PE	ImmunoTools, Friesoythe, GER
α-CD4-FITC	ImmunoTools, Friesoythe, GER
α-CD8-PE	ImmunoTools, Friesoythe, GER
α-CCR3-PE	BioLegend, San Diego, USA

$\alpha$ -CCR4-PE	BioLegend, San Diego, USA
$\alpha$ -CCR5-PE	BioLegend, San Diego, USA
$\alpha$ -CCR6-PE	BioLegend, San Diego, USA
$\alpha$ -CCR7-PE	BioLegend, San Diego, USA
$\alpha$ -CCR8-PE	BioLegend, San Diego, USA
$\alpha$ -CCR9-PE	BioLegend, San Diego, USA
$\alpha$ -CCR10-PE	BioLegend, San Diego, USA
$\alpha$ -CXCR3-PE	BioLegend, San Diego, USA
$\alpha$ -CXCR4-PE	BioLegend, San Diego, USA
Alexa Fluor® 555 Phalloidin	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Alexa Fluor® 488 Phalloidin	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
$\alpha$ -Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 ( $\alpha$ -HS1)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
$\alpha$ -HS1 (Phospho-Y <sub>378</sub> )	EnoGene Biotech, New York, USA
$\alpha$ -HS1 (Phospho-Y <sub>397</sub> )	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
$\alpha$ -ZAP70	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
$\alpha$ -ZAP70 (Phospho-Y <sub>493</sub> )	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Isotypkontrollen	Hersteller
IgG1-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, GER
IgG1-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, GER
IgG2a-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, GER
IgG2a-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, GER
IgG2b-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, GER
IgG2b-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, GER

Sekundärantikörper	Hersteller
Goat Anti-Maus IgG H&L (Alexa Fluor® 555)	Abcam, Cambridge, UK

### 2.1.5 Faktoren, Inhibitoren und weitere Reagenzien

	Hersteller
Bay 61-3606	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CK-666	Tocris, Bristol, UK
Emodin	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Jasplakinolide	Tocris, Bristol, UK
Latrunculin A	Tocris, Bristol, UK
Piceatannol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PP1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pertussis Toxin	Tocris, Bristol, UK
SDF1 $\alpha$ (CXCL12)	ImmunoTools, Friesoythe, GER
Wiskostatin	Tocris, Bristol, UK

## 2.2 Materialien für biochemische Analysen

### 2.2.1 Lyse von Zellen

Puffer und Lösungen	Hersteller
NP40-Lysepuffer	
1 % (v/v) Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
20 mM Tris	Merck KGaA, Darmstadt, GER
150 mM NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
5 mM EDTA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER

**Inhibitor-Zusätze für NP40-****Lysepuffer**

2 µg/mL Aprotinin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2 µg/mL Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1 mM Phenylmethyl-Sulfonyl-Fluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1 mM Natriumorthovanadat	Merck KGaA, Darmstadt, GER
10 mM Natriumfluorid	Merck KGaA, Darmstadt, GER
1 mM Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2 µg/mL Pepstatin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

**2.2.2 Proteinbestimmung**

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>
Coomassie Protein Assay Reagent	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER

**2.2.3 SDS-PAGE: Protean II-System (Bio Rad)**

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>
Trenngel 10 % (30 ml)	
8,7 ml ddH <sub>2</sub> O	
10 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
11,2 ml 1 M Tris/HCl pH 8,8	Merck KGaA, Darmstadt, GER
0,3 ml 10 % SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
100 µl 20 % APS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
20 µl TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Trenngel 15 % (30 ml)	
3,2 mL ddH <sub>2</sub> O	

15 mL 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
11,2 mL 1 M Tris/HCl pH 8,8	Merck KGaA, Darmstadt, GER
0,3 mL 10 % SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
100 µL 20 % APS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
20 µL TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Sammelgel 7,5 % (10 mL)	
7,03 mL ddH <sub>2</sub> O	
1,67 mL 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
1,25 mL 1 M Tris/HCl pH 6,8	Merck KGaA, Darmstadt, GER
0,1 mL 10 % SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
50 µL 20 % APS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
5 µL TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Laufpuffer	
25 mM Tris	Merck KGaA, Darmstadt, GER
192 mM Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
3,5 mM SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
3x Probenpuffer	
200 mM Tris	Merck KGaA, Darmstadt, GER
6 % SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
30 % Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, GER
3x Probenpuffer, reduzierend	
200 mM Tris	Merck KGaA, Darmstadt, GER

6 % SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
30 % Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
2-5 % $\beta$ -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Protein-Standards	
Low Range-Standard	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Precision Plus Protein All Blue	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

### 2.2.4 SDS-PAGE: Nu-PAGE-System

Puffer und Lösungen	Hersteller
NuPAGE-MES 20x SDS-Laufpuffer	Life Technologies, Carlsbad, USA

Der Laufpuffer wurde mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

### 2.2.5 Western Blot

Puffer und Lösungen	Hersteller
Transferpuffer	
25 mM Tris	Merck KGaA, Darmstadt, GER
192 mM Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, GER
0,15 % (v/v) 10 %iges SDS	Merck KGaA, Darmstadt, GER
20 % (v/v) MeOH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Protein-Färbelösung	
Ponceau-S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Waschpuffer TBS	
10 mM Tris	Merck KGaA, Darmstadt, GER
150 mM NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Waschpuffer TBST	
10 mM Tris	Merck KGaA, Darmstadt, GER

150 mM NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
0,05 % (v/v) Tween-20	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Blockierungslösung	
5 % BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, GER
in TBST	
Strippinglösung	
62,5 mM Tris	Merck KGaA, Darmstadt, GER
20 % (v/v) 10 %iges SDS	Merck KGaA, Darmstadt, GER
0,7 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, GER
ECL-Detektionsreagenz	
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	General Electric Company, Fairfield, USA

## 2.2.6 Verwendete Antikörper für Western Blot

Primärantikörper	Hersteller
$\alpha$ -WASP (Phospho-Y290)	Abcam, Cambridge, UK
$\alpha$ -Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
$\alpha$ -HS1 (Phospho-Y <sub>378</sub> )	EnoGene Biotech, New York, USA
$\alpha$ -HS1 (Phospho-Y <sub>397</sub> )	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
$\alpha$ -Phospho-Paxillin	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
$\alpha$ -ZAP70	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
$\alpha$ -Phospho-ZAP70	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
$\alpha$ -pTyr (Klon 4G10)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Sekundärantikörper	Hersteller
$\alpha$ -Maus-HRP	General Electric, Fairfield, USA
$\alpha$ -Kaninchen-HRP	General Electric, Fairfield, USA

## 2.3 Geräte

Gerät	Hersteller
Blot-System	
Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Durchflußzytometer	
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, GER
ImageStream X mkII	Merck Millipore, Billerica, USA
Filmentwicklungsmaschine Agfa Curix60	AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, BEL
Heizblöcke	
HB-2	Wealtec Corp., Sparks, USA
Dri-Block DB3A	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Inkubatoren	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER
Magnetrührer Ikamag® RCT	IKA-Werke GmbH, Staufen, GER
Mikroskop	
Zeiss ID03	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Zeiss Axiovert 200M	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Netzgerät PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Spektrometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Pipetten	
Eppendorf Research®	Eppendorf AG, Hamburg, GER
Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg, GER

## Pipettierhilfen

Accu-jet® pro

Brand GmbH, Wertheim, GER

Matrix

Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER

## Schüttler

Rocky®

Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, GER

Ultrarocker™

Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

## SDS-PAGE System

Novex Mini-Cell

Life Technologies, Carlsbad, USA

Protean® II XL Cell

Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

Amersham Ettan DALTSix

General Electric Company, Fairfield, USA

## Sterilbank

Heraeus™ LaminAir®  
HB2472K

Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER

## Ultrazentrifugen

XL-80

Beckman Coulter GmbH, Krefeld, GER

TL-100

Beckman Coulter GmbH, Krefeld, GER

Avanti J-25I

Beckman Coulter GmbH, Krefeld, GER

## Vortex

Vortex Genie-2

Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

MS1 Minishaker

IKA-Werke GmbH, Staufen, GER

## Waagen

BP 110S

Sartorius AG, Göttingen, GER

Scout II

Ohaus Europe GmbH, Nänikon, SUI

## Wasserbad GFL 1083

GFL Labortechnik GmbH, Burgwedel, GER

## Zählkammer Neubauer advanced

Laboroptik Ltd, Lancing, UK

## Zentrifugen

5415C

Eppendorf AG, Hamburg, GER

HeraeusTM Varifuge 3.0R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER
HeraeusTM Biofuge 15R	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER
HeraeusTM Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Acrylamid-Gele	
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel	Life Technologies, Carlsbad, USA
Blot-Membran	
Protran™ Supported 0,2 µm NC	General Electric Company, Fairfield, USA
Protran™ Supported 0,45 µm NC	General Electric Company, Fairfield, USA
Deckgläser	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Objektträger	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Pipettenspitzen	
1-10 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
1-200 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
1-1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
Reaktionsgefäße	
0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
Röhrchen	
Polypropylen Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, GER

Polypropylen Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, GER
Round Base Test Tube 40x6 mm	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER
Röntgenfilme	
Amersham Hyperfilm ECL	General Electric Company, Fairfield, USA
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, GER
Spektrometer-Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, GER
Sterilvakuumfilter	Merck Millipore, Darmstadt, GER
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, GER
Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, GER

---

### **3 Methoden**

#### **3.1 Zellbiologische Methoden**

Für die Charakterisierung der Chemokinrezeptor-Expression und -Signaltransduktion wurden humane nicht-transformierte sowie neoplastische T-Zelllinien untersucht. Die Blutproben für die Gewinnung der T-Zellen wurden von der Klinik für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein-Campus Kiel bezogen. Ein entsprechendes Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät liegt unter AZ 485/14 vor.

##### **3.1.1 Kultivierung der Zellen**

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit RPMI 1640-Kulturmedium unter Zusatz von 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen hinsichtlich ihrer Zellvitalität, Dichte und eventueller Kontaminationen begutachtet und gegebenenfalls passagiert.

##### **3.1.2 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

Die Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) erfolgte mittels Dichtegradienten-Zentrifugation, bei der sich unterschiedliche Zellfraktionen entsprechend ihrer spezifischen Dichte auftrennen. Hierzu wurden die heparinisierten Blutproben zunächst mit PBS verdünnt. Anschließend wurden jeweils 13 ml Ficoll (d=1,077 g/ml) vorsichtig unter 22,5 ml Blut geschichtet. Nach einer ungebremsten Zentrifugation bei 2000 rpm für 20 min bei Raumtemperatur reichern sich die mononukleären Zellen (v.a. Lymphozyten und Monozyten) in der Interphase zwischen der Plasma- und Ficoll-Lösung an, während die Erythrozyten und Granulozyten mit ihrer höheren Dichte das Zellsediment bilden. Die Thrombozyten verbleiben aufgrund ihrer geringeren Größe und Dichte in der Plasmafraktion. Der überstehende Plasmaanteil wurde bis etwa 1 cm über dem Interphasering abgesaugt. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und zweimal mit PBS sowie einmal mit Kulturmedium gewaschen, um die Thrombozyten, Serum- und Ficoll-Rückstände zu entfernen.

Anschließend wurden die mononukleären Zellen in RPMI 1640-Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl sowie die Zellvitalität bestimmt.

### 3.1.3 Herstellung von PHA-Blasten

Zur Etablierung von PHA-Blasten wurden isolierte PBMC in RPMI 1640-Medium mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin aufgenommen und mit PHA (0,5 µg/ml) stimuliert. Nach drei- bis fünftägiger Kultivierung erfolgte eine Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten-Zentrifugation, um tote Zellen und Zellfragmente zu entfernen. Die vitalen Zellen wurden nach mehreren Waschschritten unter Zusatz von IL-2 (10 U/ml) für weitere 7 bis 21 Tagen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 3.1.4 Magnetische Zellseparation

Die Isolierung der Lymphozyten-Subpopulationen aus PHA-Blasten anhand spezifischer Oberflächenantigene erfolgte mittels Magnetischer Zellseparation (*Magnetic Activated Cell Sorting*, MACS) über eine direkte bzw. indirekte Markierung und Selektion der Zellen. Für die negative Isolierung von CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten bzw. positive Isolierung von CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten wurden CD8<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe der an Magnet-Partikel gekoppelten anti-CD8 Antikörpern markiert. Während diese Zellen beim Durchfluss der Säule im Magnetfeld des MACS-Separators verbleiben, kann die unmarkierte Zellfraktion die Säule ungehindert passieren. Für die Separation wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und die Zellsuspension gewaschen. Hierzu wurden die Zellen in MACS-Puffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die pelletierten Zellen in 40 µl MACS-Puffer und 10 µl Biotin-Antikörper Cocktail pro 10<sup>7</sup> Zellen sorgfältig suspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl anti-Biotin MicroBeads pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzugegeben. Die Suspension wurde für 10 Minuten bei 2 bis 8 °C inkubiert und nach einem weiteren Waschschriff in 500 µl MACS-Puffer pro 10<sup>8</sup> Zellen aufgenommen. Anschließend wurde die magnetisierte Trennsäule am MACS-Separator mit 3 ml MACS-Puffer equilibriert und die Zellsuspension sorgfältig auf die Trennsäule gegeben. Es folgen drei weitere Waschschriffe der magnetisierten Säule mit MACS-Puffer. Die im Durchfluss gesammelten Zellen wurden anschließend gezählt und die Zellvitalität begutachtet. Nach einer Reinheitsüberprüfung der

Zellsuspension mittels Nachweis spezifischer Oberflächenantigene in der Durchflusszytometrie wurden die CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen für Analysen verwendet oder in RPMI 1640-Kulturmedium aufgenommen und mit einem sogenannten „Feeder-Cocktail“ stimuliert. Der Feeder-Cocktail beinhaltet 10<sup>6</sup> isolierte PBMZ und 10<sup>5</sup> EBV-transformierte B-Zellen (B-LCL) pro ml. Die PBMZ und B-LCL wurden zuvor mit 40 bzw. 60 Gy bestrahlt und mehrfach gewaschen. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von IL-2 (10 U/ml) und PHA (0,5 µg/ml). Um die toten Zellen und Zellfragmente zu entfernen, wurde nach einer dreitägigen Kultivierung eine Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt.

### 3.1.5 Inkubation der Zellen im Kulturmedium X-Vivo

Aufgrund der beobachteten, geringeren Abweichung der SDF1 $\alpha$ -induzierten Aktin-Polymerisation zwischen den einzelnen Untersuchungsreihen, wurden die benötigten Zellen vor den SDF1 $\alpha$ -Stimulationsanalysen nach einmaligem Waschen mit PBS in Kulturmedium X-Vivo mit 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin aufgenommen und in einer definierten Dichte ausgesät. Anschließend wurden sie bei 37 °C für ca. 12 bis 16 Stunden kultiviert.

### 3.1.6 Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl

Die Zählung der Zellen erfolgte unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden die Zellen für 5 min bei 1400 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in einem definierten Volumen aufgenommen. Für die Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität unter dem Mikroskop wurden 25 µl der Zellsuspension entnommen und mit 75 µl Trypanblau gefärbt. Da der blaue Farbstoff bei Zellen mit einer geschädigten Membran in das Zellinnere eindringt, wurden angefärbte Zellen als geschädigt oder tot gewertet. Die Anzahl der vitalen Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl in gezählten Quadranten}}{\text{Anzahl der gezählten Quadranten}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Kammerfaktor} = \text{Zellzahl/ml}$$

### 3.1.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Messung der Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen in einer Einzelzellsuspension. Die Zellsuspension wird hierbei über ein Flüssigkeitssystem in die Messzelle transportiert und hydrodynamisch fokussiert, sodass einzelne Zellen nacheinander auf mehrere Laserstrahlen treffen und dabei Streu-/Fluoreszenzlicht emittieren. Diese optischen Signale werden über unterschiedliche Spiegel, Filter und Detektoren in elektronische Signale umgewandelt. Während das Streulicht mit der Größe (*Forward Scatter*, FSC) und Granularität (*Side Scatter*, SSC) korreliert, gibt die Intensität der Fluoreszenz Aufschluss über die Häufigkeit der mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern nachgewiesenen Antigene.

#### Nachweis von Zelloberflächenantigenen

Für den Nachweis von Zelloberflächenantigenen wurden pro Färbung  $1\text{--}2,5 \times 10^5$  Zellen in eine 96-Well Spitzboden-Mikrotiterplatte transferiert und zunächst mit kaltem FACS-Waschpuffer (FWP) gewaschen. Hierzu wurden sie in  $150 \mu\text{l}$  FWP aufgenommen und für 2 Minuten bei 1200 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit einer Fluorochrom-konjugierten Antikörper-Lösung oder einer entsprechenden Isotypkontrolle gleicher Konzentration in einem Volumen von  $10 \mu\text{l}$  suspendiert und für 20 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  und Dunkelheit inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen weitere zwei Male mit FWP gewaschen, in  $100 \mu\text{l}$  1 %iger PFA-Lösung aufgenommen und in beschriftete FACS-Röhrchen überführt. Für die Detektion von Chemokinrezeptoren erfolgten die Arbeitsschritte analog mit  $2,5 \times 10^5$  Zellen und  $5 \mu\text{l}$  der Fluorochrom-konjugierten Chemokinrezeptor-spezifischen Antikörper.

#### Nachweis intrazellulärer Antigene

Für die Analyse der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation wurden zunächst  $2 \times 10^6$  Zellen bei 1200 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Suspension des Zellpellets in 4 ml PBS. Nach erneuter Zentrifugation bei 1200 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten wurde das Zellpellet in 1 ml X-Vivo Kulturmedium gelöst. Pro Probe wurden  $90 \mu\text{l}$  mit  $1,8 \times 10^5$  der

vorbehandelten Zellen verwendet. Die Zellsuspension mit oder ohne Inhibitoren wurde in eine 96-Well V-Platte überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei Verwendung von Inhibitoren wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiträume bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen zu definierten Zeitpunkten (ca. 30 Sekunden, 1 Minute, 2 Minuten, 5 Minuten, 10 Minuten und 20 Minuten) mit 10 µl der SDF1 $\alpha$ -Lösung (1000 nM) stimuliert und anschließend mit 100 µl 8 % PFA in PBS (7 pH) für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Zentrifugieren bei 1200 rpm und 4 °C für 5 Minuten wurden die Zellen mit FWP gewaschen. Nach Permeabilisierung mit 100 µl 0,1 % Triton X 100 in PBS und einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein weiterer Waschschrift. Die pelletierten Zellen wurden in 50 µl der Fluorochrom-konjugierten Antikörper-Lösung aufgenommen und für 20 Minuten bei 4 °C und Dunkelheit inkubiert. Anschließend folgten zwei weitere Waschschriffe mit FWP und die Zellen wurden in 100 µl bzw. 50 µl PFA in PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für die Messung in beschriftete FACS-Röhrchen oder 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

### **Ermittlung des Anteils an toten Zellen mittels Propidiumjodid**

Propidiumjodid ist ein Farbstoff, der selektiv von Zellen mit Membrandysfunktionen aufgenommen wird und in die DNA interkaliert. Da interkaliertes Propidiumjodid stärker fluoresziert als lösliches, können die toten Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen und deren Anteil an der Zellpopulation bestimmt werden. Die Zellen wurden hierfür zunächst mit FACS-Waschpuffer gewaschen, anschließend in 100 µl Propidiumjodid-Lösung (0,5 µg/ml in PBS) aufgenommen und nach 20 Minuten im Durchflusszytometer gemessen.

## **3.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.1 Stimulation von Zellen und Herstellung von Zelllysaten**

Zunächst wurden die Zellen mittels Quickspin pelletiert. Die sedimentierten Zellen wurden im Anschluss in Medium, für die Stimulation in 100 ng/ml SDF1 $\alpha$  bzw. für die Positivkontrolle in Pervanadat (0,1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mit einem Volumen von 100 µl durchmischt und entsprechend der definierten Zeiten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml kaltem PBS mit Protease-Inhibitoren und

ein erneuter Quickspin. Nach dem Suspendieren in 30  $\mu$ L 1 % NP40-Lysepuffer und anschließender Inkubation für 20 Minuten auf Eis wurden die Zellen für 10 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für weitere Analysen genutzt oder bei -80 °C gelagert.

### **3.2.2 Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden zu 995  $\mu$ L Coomassie Protein Assay Reagent 5  $\mu$ L Zelllysate gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurde die Lösung in eine Messküvette gegeben und bei 595 nm im Spektrophotometer vermessen. Als Referenz diente der verwendete Lysepuffer.

### **3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichtes. Dazu werden die Proteine in der Regel mit Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und mit  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert. Das im Überschuss vorliegende SDS ist ein anionisches Detergenz, das sich an die Proteine anlagert, diese entfaltet und sie proportional zu ihrer Masse mit einer einheitlichen, negativen Ladung versieht. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol, um kovalente Bindungen wie Cystein-Brücken aufzulösen. Dadurch wird das elektrophoretische Wanderungsverhalten ausschließlich durch das Molekulargewicht und nicht durch die Eigenladung oder die Faltung der Proteine beeinflusst. Für die SDS-PAGE wurde das NuPAGE-System von Invitrogen und 4-12 % Bis-Tris-Fertiggele verwendet. Bei Benutzung von Minigelen (NuPAGE-System, Invitrogen) wurde pro Probe eine Proteinmenge von 5-15  $\mu$ g verwendet. Zunächst wurden die Volumina der Proben durch Zugabe von 1 % NP40-Lysepuffer angeglichen und auf zwei Drittel des Gesamtvolumens eingestellt. Anschließend wurde die Probe mit einem Drittel des Gesamtvolumens 3x NuPAGE-Probenpuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. In der Regel betrug das Gesamtvolumen einer Probe bei 10-Well-Gelen etwa 57  $\mu$ L und bei 15-Well-Gelen 24  $\mu$ L pro Geltasche. Die Proben wurden im Anschluss bei 100 °C für 5 Minuten erhitzt, zentrifugiert und in Geltaschen überführt. Die

elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 45-60 Minuten bei 200 V und Raumtemperatur.

### **3.2.4 Western Blot**

Western Blot ist ein Verfahren, um Proteine innerhalb eines Proteingemisches mit Hilfe von Antikörpern spezifisch nachzuweisen und näherungsweise zu quantifizieren. Nach erfolgter Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die hierfür benötigte Membran hatte eine Porengröße von 0,2 µm oder 0,45 µm, wobei die kleine Porengröße insbesondere bei dem Transfer von kleineren Proteinen verwendet wurde. Alle Komponenten der Transferkammer wurden zuvor im Western Blot-Transferpuffer equilibriert und anschließend von der Kathode zur Anode in folgender Reihenfolge positioniert: ein Schwamm, zwei Whatman-Papiere, Gel, Membran, zwei Whatman-Papiere und ein Schwamm. Anschließend wurde die Transferkammer nach dem Einsetzen der Transferkassette mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Proteintransfer erfolgte bei 4 °C und 0,8 A für zwei Stunden oder bei Raumtemperatur und 100 V für eine Stunde unter Eiskühlung. Um den Transfer der Proteine zu überprüfen, wurde die Nitrocellulose-Membran nach kurzem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O für 5 Minuten mit Ponceau S überschichtet und die Proteine somit gefärbt. Nachfolgend wurde die Membran mehrfach mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und die Färbung wurde dokumentiert. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran mittels TBS entfärbt und mit einer 5 %igen BSA-Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu sättigen. Zur Detektion von Proteinen wurde die Membran eine Stunde mit dem spezifischen Primärantikörper und nach drei 10-minütigen Waschschritten mit TBST 45-60 Minuten mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran eine Minute mit dem ECL-Detektionsreagenz inkubiert und die Chemilumineszenz durch Belichtung von Hyperfilm ECL Filmen erfasst.

### **3.2.5 Stripping der Blotmembran**

Die Stripping-Methode dient der Entfernung der Primär- und Sekundärantikörper von der Western Blot-Membran, um diese für die Detektionen von weiteren Proteinen verwenden zu können. Dazu wurde die Blot-Membran zunächst mit einer TBST-

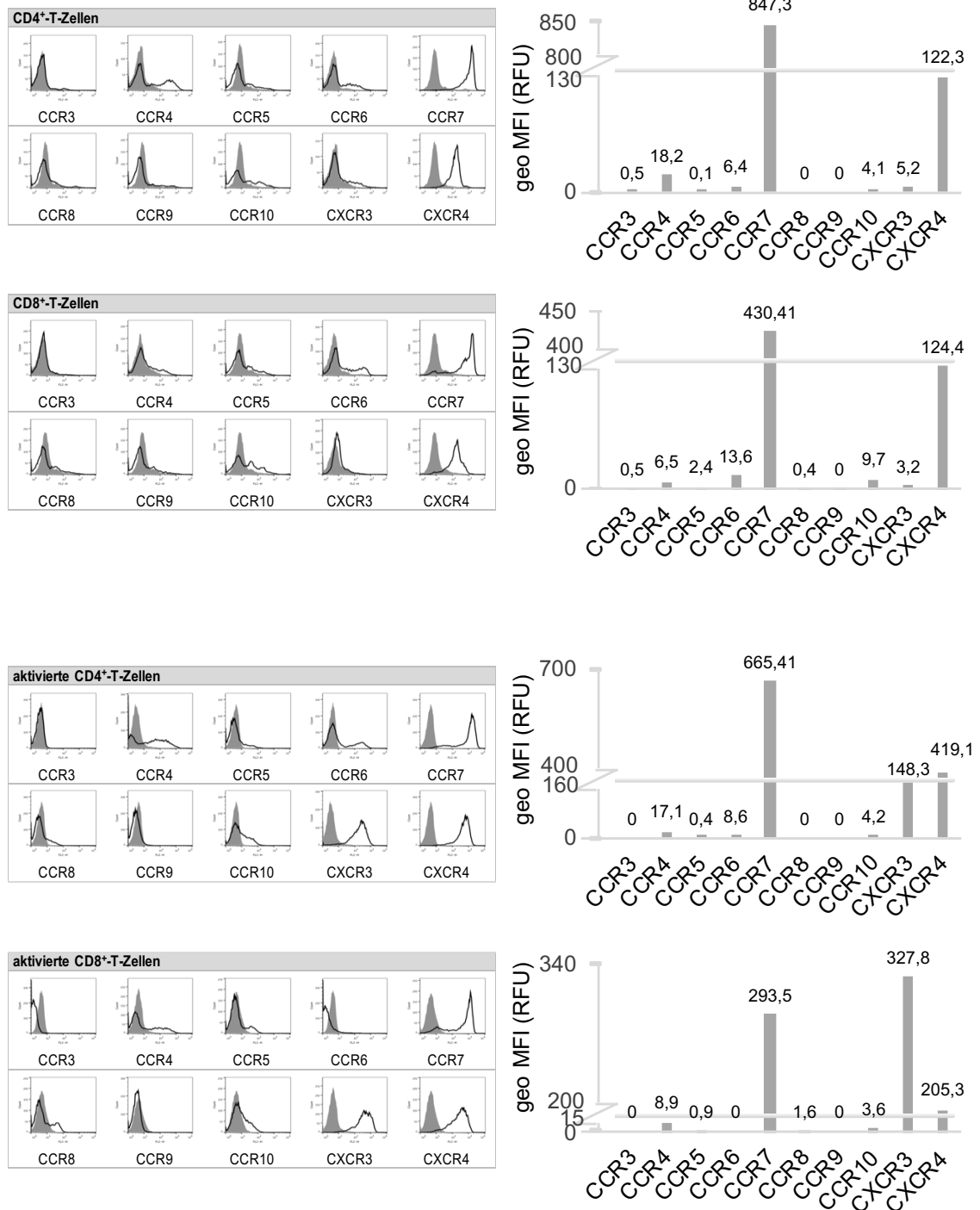
Lösung gewaschen und 25 Minuten mit der Stripping Solution bei 56 °C schwenkend inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschschritten mit TBST folgte die Inkubation mit einer 5 %igen BSA-Lösung für 20 Minuten und ein weiterer Waschschr. Anschließend wurde die Western Blot-Membran erneut mit einem spezifischen Primärantikörper und dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expressionsanalyse der Chemokinrezeptoren von nicht-neoplastischen und neoplastischen T-Zellen

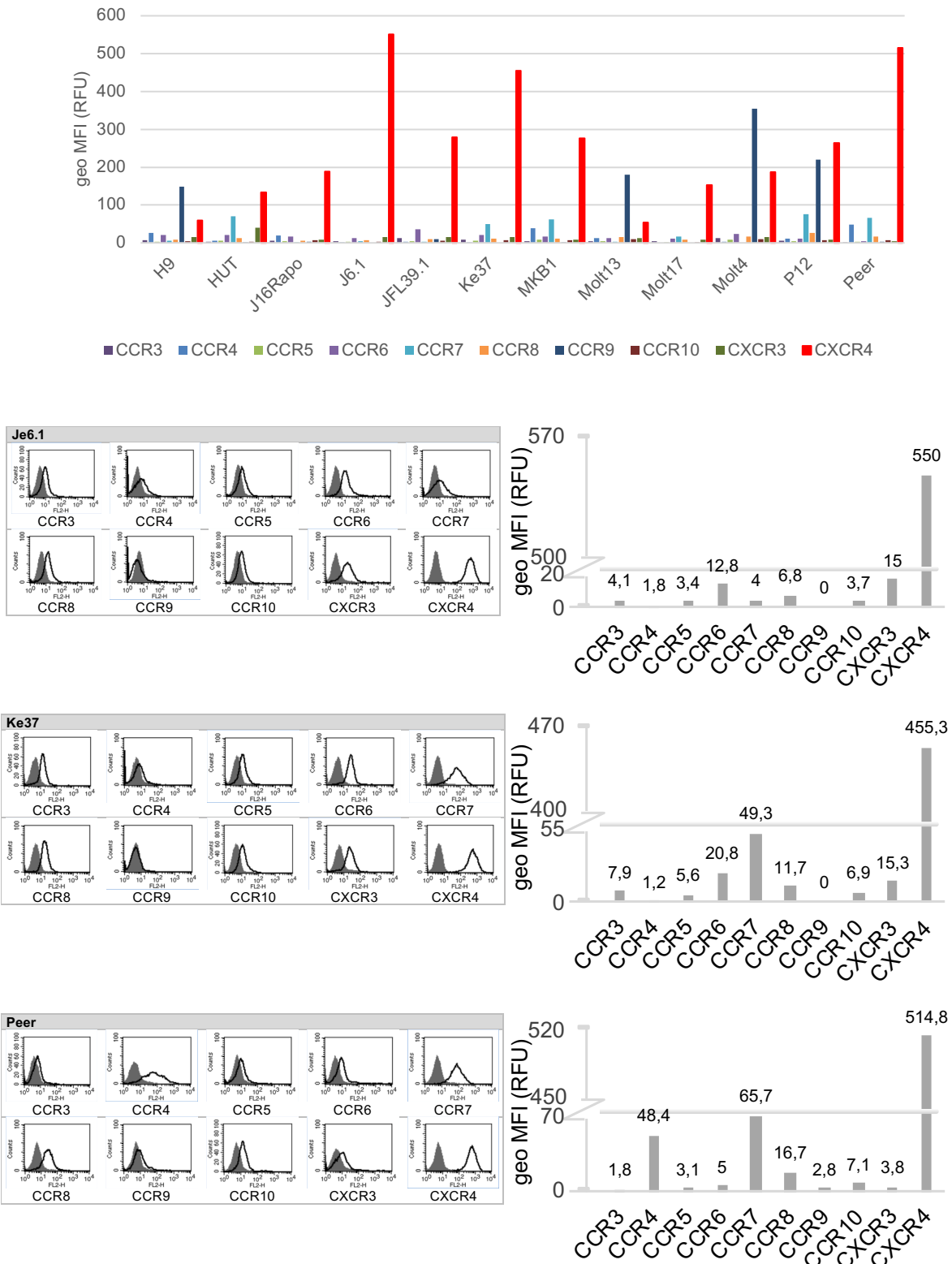
In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Expression ausgewählter Chemokinrezeptoren auf leukämischen T-Zellen charakterisiert und mit dem Expressionsprofil nicht-neoplastischer T-Zellen verglichen werden. Dazu wurde die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 und CXCR3 sowie CXCR4 durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden primäre T-Zellen aus Blutproben von gesunden Probanden isoliert, mit PHA stimuliert und mit IL-2 expandiert. Nach der magnetischen Separation in CD4+- und CD8+-T-Zellpopulationen wurden die Zellen mit unterschiedlichen Chemokinrezeptor-spezifischen Antikörpern markiert und anschließend fixiert. Bei den neoplastischen Zelllinien handelte es sich um T-Zelllinien, die entweder aus Zellen von Patienten mit akuten lymphoblastischen Leukämien (T-ALL) oder Sézary-Syndrom etabliert wurden.

Während die frisch isolierten T-Zellen vorrangig eine Expression von CCR7 und CXCR4 zeigten, exprimierten die expandierten T-Zellen die Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR4 und zusätzlich CXCR3. Im Vergleich hierzu zeigten die zwölf verschiedenen leukämischen T-Zelllinien eine divergente Expression der Rezeptoren CCR7, CCR9, CXCR3 und CXCR4. Während die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR3 auf niedrigem Niveau exprimiert wurden, konnte eine deutliche Expression des Rezeptors CXCR4 auf den neoplastischen T-Zellen detektiert werden. Das höchste Expressionsniveau von CXCR4 wurde hierbei auf den Zelllinien Je6.1, Ke37 und Peer beobachtet. In weiteren Analysen wurden daher vor allem diese Zelllinien untersucht. In Abbildung 7 und Abbildung 8 sind exemplarisch die Ergebnisse der Chemokinrezeptor-Expressionsanalyse von den nicht-transformierten T-Zellen und den neoplastischen T-Zellen zusammengefasst. Weitere repräsentative Ergebnisse der Chemokinrezeptor-Expressionsanalyse aller untersuchten Zelllinien sind im Anhang zu entnehmen.



**Abb. 7: Chemokinrezeptor-Expression gesunder T-Zellen.**

Für die durchflusszytometrische Expressionsanalyse der Chemokinrezeptoren wurden jeweils 250.000 Zellen fixiert und mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen den entsprechenden Rezeptor oder einer entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt. Nachfolgend wurden 10.000 Zellen pro Probe durchflusszytometrisch aufgenommen und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität mit der korrespondierenden Isotyp-Kontrolle (in grau dargestellt) quantifiziert.

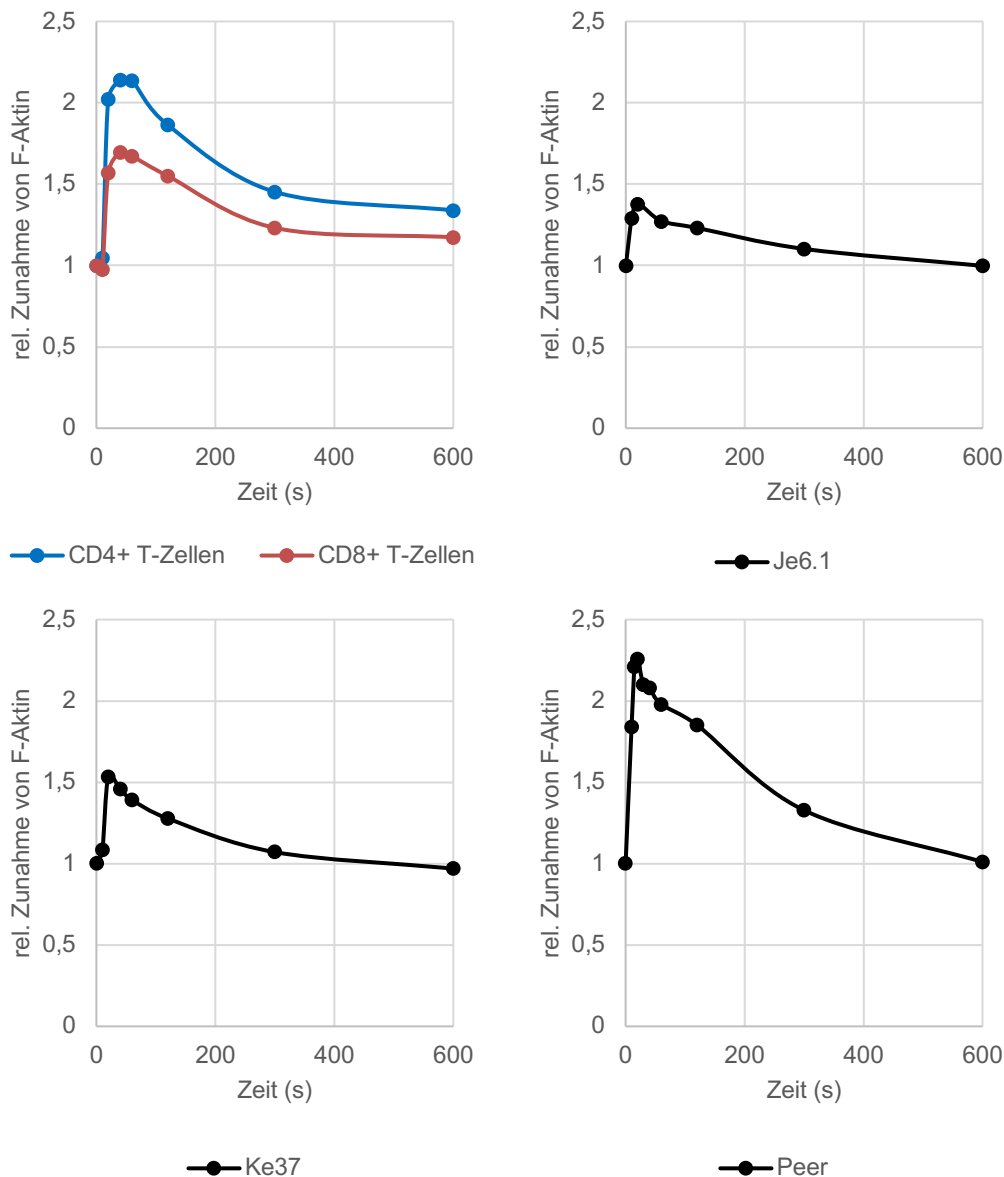


**Abb. 8: Chemokinrezeptor-Expression neoplastischer T-Zellen.**

Für die durchflusszytometrische Expressionsanalyse der Chemokinrezeptoren wurden jeweils 250.000 Zellen fixiert und mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen den entsprechenden Rezeptor oder einer entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt. Nachfolgend wurden 10.000 Zellen pro Probe durchflusszytometrisch aufgenommen und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität mit der korrespondierenden Isotyp-Kontrolle (in grau dargestellt) quantifiziert.

## 4.2 Etablierung und Optimierung einer Methode zur Analyse der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation

Da die Regulation der Aktin-Polymerisation als Voraussetzung für kontrollierte dynamische Veränderungen der Zellpolarität, -morphologie und des Migrationsverhaltens gilt und somit einen enormen Einfluss auf die Tumorprogression nimmt, sollte in weiteren Untersuchungen die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-vermittelte Aktin-Polymerisation in den neoplastischen T-Zellen analysiert werden. Hierfür wurden die kultivierten primären T-Zellen und die neoplastischen T-Zelllinien zunächst mit rekombinantem SDF1 $\alpha$  für unterschiedliche Zeitintervalle stimuliert, unmittelbar fixiert, anschließend permeabilisiert und zur durchflusszytometrischen Detektion von F-Aktin mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Phalloidin markiert. Zur Quantifizierung und Auswertung wurde das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität (geo MFI) der stimulierten Proben in Relation zu unstimulierten Proben betrachtet. Die neoplastischen und nicht-neoplastischen T-Zelllinien zeigten hierbei eine vergleichbare Kinetik mit einer schnellen und transienten Zunahme der Aktin-Polymerisation innerhalb der ersten 10 Minuten nach SDF1 $\alpha$ -Stimulation, wobei die induzierte Aktin-Polymerisation nach 15-20 Sekunden das Maximum erreichte und nach etwa 10 Minuten auf das Grundniveau abfiel (Abbildung 9). Die Amplituden der Aktin-Polymerisation unterschieden sich in den verschiedenen Zellpopulationen.

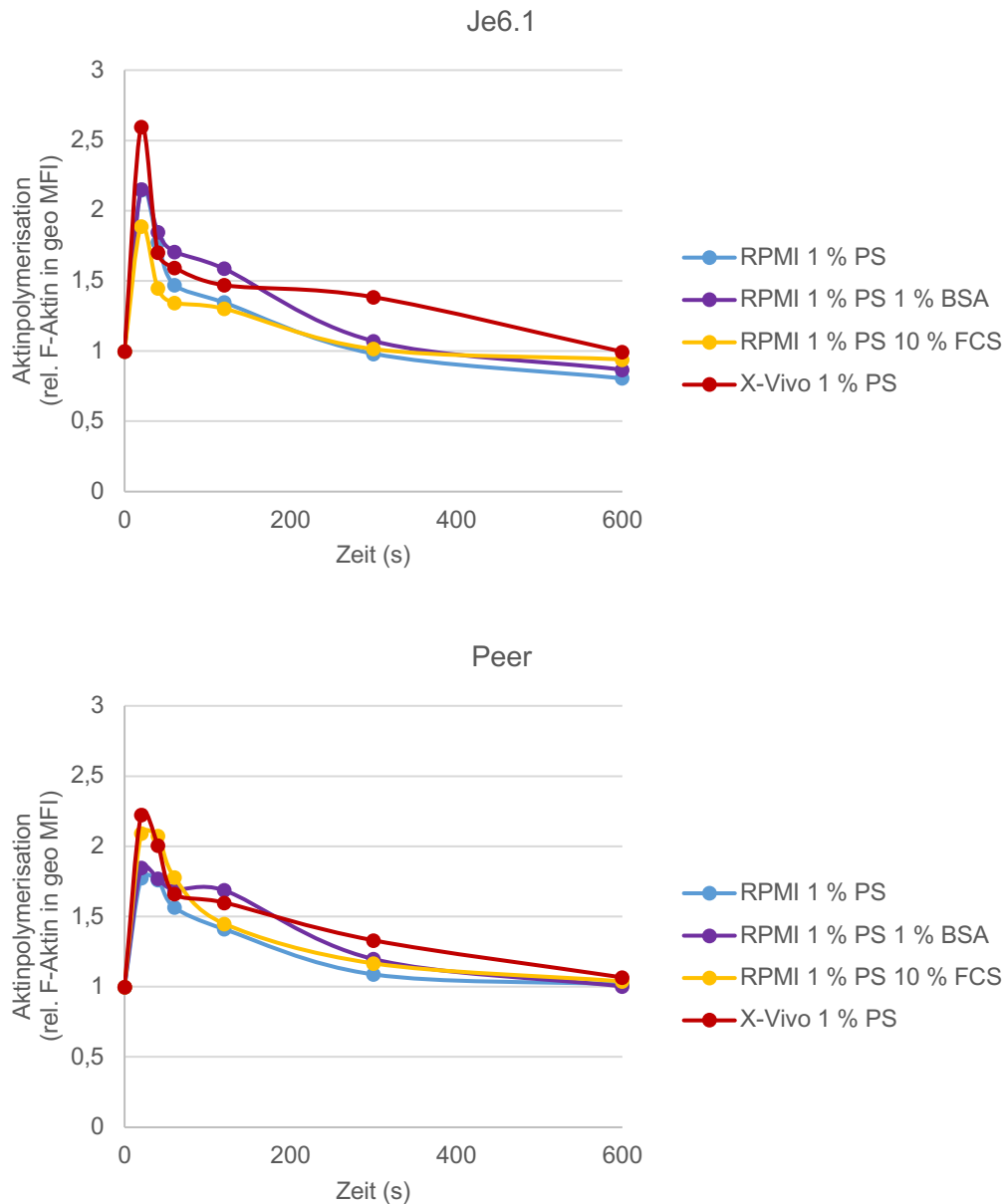


**Abb. 9: Zeitabhängigkeit der SDF $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation.**

Je 180.000 Zellen ( $10^6$  Zellen/ml) wurden entweder unbehandelt belassen oder zu entsprechenden Zeitpunkten mit 100 ng/ml SDF1 $\alpha$  stimuliert, fixiert, permeabilisiert, mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Phalloidin gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden 10.000 Zellen pro Probe durchflusszytometrisch aufgenommen und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität quantifiziert. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität unstimulierter Zellen wurde auf 1 gesetzt.

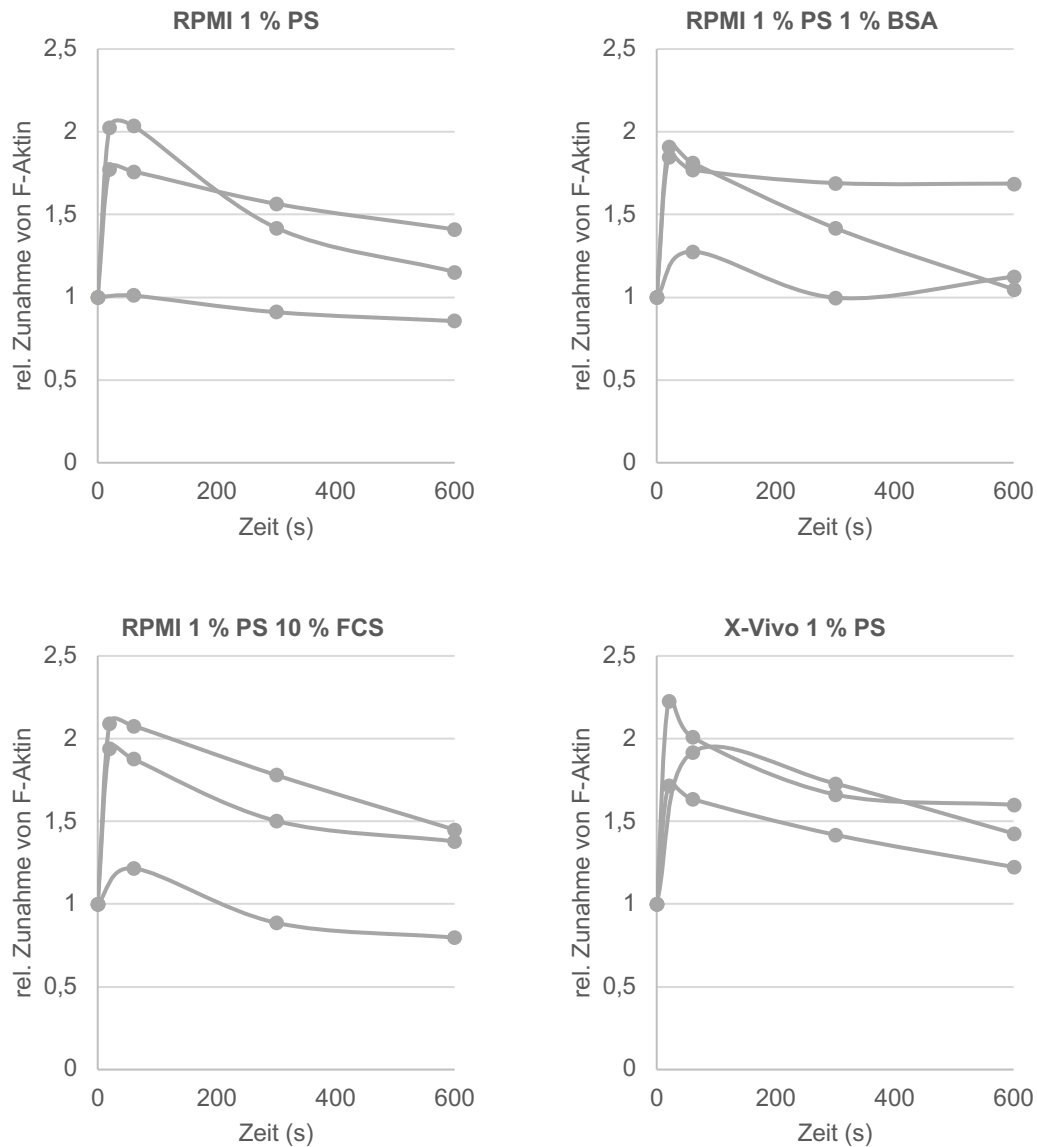
Zur Optimierung der Stimulationsansätze wurden zudem verschiedene Verfahren und Reagenzien ausgetestet. Zunächst wurde der Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien (RPMI 1640 mit oder ohne Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) bzw. bovinem Serumalbumin (BSA) und X-VIVO™, jeweils mit Penicillin 10000 U/Streptomycin 10000  $\mu$ g (PS)) untersucht (Abbildung 10). Dabei stellte sich heraus, dass durch eine

vorherige Inkubationszeit von etwa 12 Stunden in X-VIVO™-Medium mit 1 % PS ohne weitere Zusätze eine stärkere Aktin-Polymerisation mit geringeren Abweichungen zwischen den einzelnen Untersuchungsreihen beobachtet werden konnte (Abbildung 11).



**Abb. 10: Einfluss unterschiedlicher Kulturmedien auf die SDF $\alpha$ /CXCR4-induzierte Aktin-Polymerisation von Je6.1 und Peer.**

Nach 12- bis 16-stündiger Inkubation im Kulturmedium RPMI 1640 + 1 % PS (blau), RPMI 1640 + 1 % PS + 1 % BSA (lila), RPMI 1640 + 1 % PS + 10 % FCS (orange) oder X-Vivo + 1 % PS (rot) wurden je 180.000 Zellen ( $10^6$  Zellen/ml) entweder unbehandelt belassen oder zu entsprechenden Zeitpunkten mit 100 ng/ml SDF1 $\alpha$  stimuliert, fixiert, permeabilisiert, mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Phalloidin gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden 10.000 Zellen pro Probe durchflusszytometrisch aufgenommen und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität quantifiziert. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität der unstimulierten Zellen wurde auf 1 gesetzt.

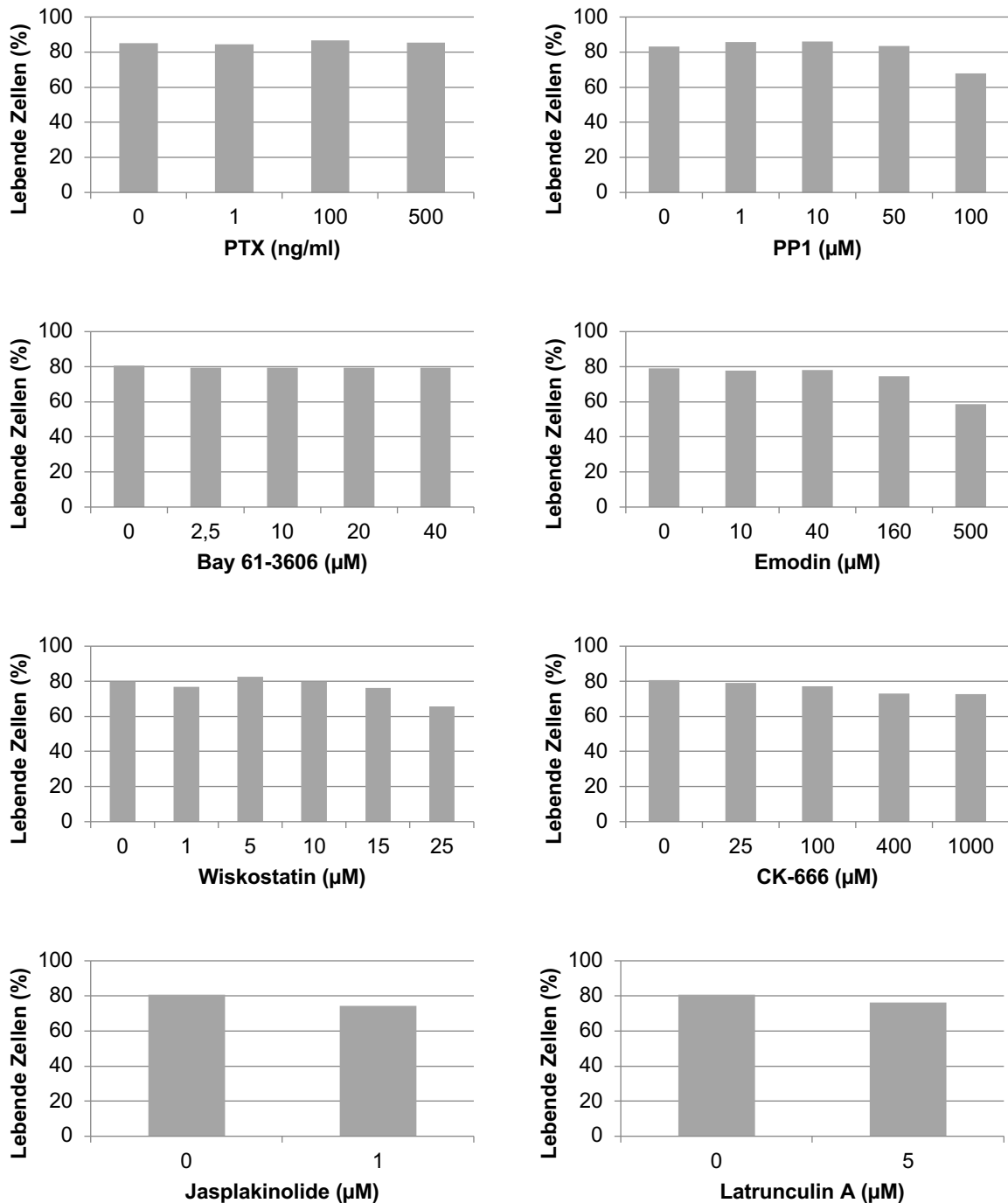


**Abb. 11: Exemplarische Darstellung der SDF1 $\alpha$ -induzierten Aktin-Polymerisation in unterschiedlichen Kulturmedien.**

Nach 12-stündiger Inkubation im entsprechenden Kulturmedium wurden je 180.000 Peer-Zellen ( $10^6$  Zellen/ml) entweder unbehandelt belassen oder zu entsprechenden Zeitpunkten mit 100 ng/ml SDF1 $\alpha$  stimuliert, fixiert, permeabilisiert, mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Phalloidin gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden 10.000 Zellen pro Probe durchflusszytometrisch aufgenommen und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität quantifiziert. Der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität unstimulierter Zellen wurde auf 1 gesetzt. Gezeigt ist der Befund von jeweils 3 Experimenten.

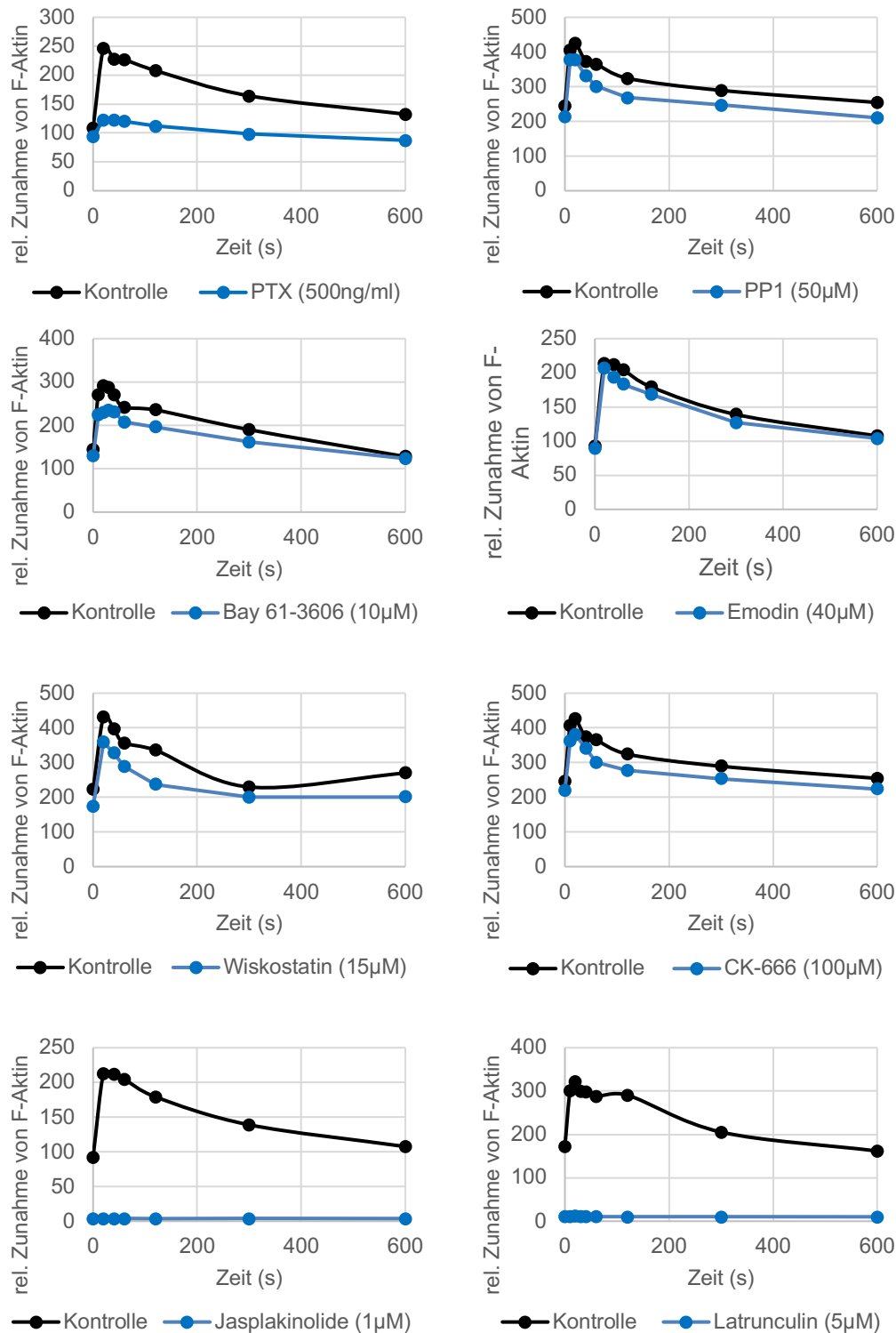
### 4.3 Identifizierung potenzieller Komponenten der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation

Um die Signaltransduktion von CXCR4 in neoplastischen T-Zellen zu charakterisieren und potenzielle Signalkomponenten zu identifizieren, wurden Effekte unterschiedlicher pharmakologischer Inhibitoren (Latrunculin A, Jasplakinolide, CK-666, Whiskostatin, PTX, Emodin, Bay 61-3606, PP1) auf die Aktin-Polymerisation systematisch untersucht. Hierfür wurde zunächst der Einfluss der Inhibitoren auf die Zellviabilität der verwendeten Zelllinien Je6.1 und Peer bestimmt, indem der Anteil an toten Zellen nach einer 30-minütigen Inkubation mit den genannten Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen mittels Propidiumjodid ermittelt wurde (Abbildung 12). Zur Verifizierung und Charakterisierung der CXCR4-induzierten Reorganisation der Aktin-Maschinerie in neoplastischen T-Zellen wurden die untersuchten Je6.1- und Peer-Zellen zunächst mit pharmakologischen Inhibitoren der Aktin-Reorganisation behandelt. Hierbei stabilisiert Jasplakinolide die präformierten Aktinfilamente und Latrunculin A das monomere G-Aktin, sodass die Aktin-Polymerisation behindert wird (Morton et al. 2000, Holzinger 2010). Passend dazu konnte durch Jasplakinolide und Latrunculin A die Aktin-Polymerisation effektiv inhibiert werden. Wiskostatin ist ein selektiver Inhibitor für N-WASP (neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) und führt zu einer geringen Reduktion der SDF1 $\alpha$ -induzierten Polymerisation von F-Aktin. Der Arp2/3-Inhibitor CK-666 zeigte hingegen keine merklichen Effekte. In weiteren Untersuchungen wurde die Rolle der Rezeptor-gekoppelten G-Proteine mit Hilfe von Pertussis Toxin (PTX) und die Bedeutung verschiedener Tyrosinkinasen in der CXCR4-vermittelten Signaltransduktion durch Bay 61-3606 (Syk), Emodin (Lck) sowie PP1 (Src Kinasen) näher betrachtet. Die Behandlung der Zellen mit PTX bewirkte eine deutliche Reduktion der Aktin-Polymerisation und verifizierte somit die essenzielle Rolle der Rezeptor-gekoppelten G-Proteine in der CXCR4-Signalkaskade. Während der Einsatz von Emodin keinen deutlichen Effekt zeigte, resultierte die Behandlung mit Bay 61-3606 und PP1 in einer verminderten Aktin-Polymerisation (Abbildung 13). Die Untersuchungen implizierten somit eine Beteiligung von Syk- und Src-Kinasen in der SDF1/CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation in neoplastischen T-Zellen.



**Abb. 12: Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren auf die Zellviabilität.**

Nach 12-stündiger Inkubation im Kulturmedium X-Vivo + 1 % PS wurden je 200.000 Zellen ( $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml) der Zelllinie Je6.1 (PTX) oder Peer (PP1, Bay 61-3606, Emodin, Wiskostatin, CK-666, Jasplakinolide und Latrunculin A) für 30 Minuten entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit unterschiedlichen Konzentrationen der aufgeführten pharmakologischen Inhibitoren inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen in einer Propidiumiodid-Lösung (0,5 µg Propidiumiodid/ml PBS) aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden 10.000 Zellen pro Probe aufgenommen und die Anzahl der Propidiumiodid-negativen Zellen quantifiziert.



**Abb.13: Einfluss unterschiedlicher pharmakologischer Inhibitoren auf die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte Aktin-Polymerisation.**

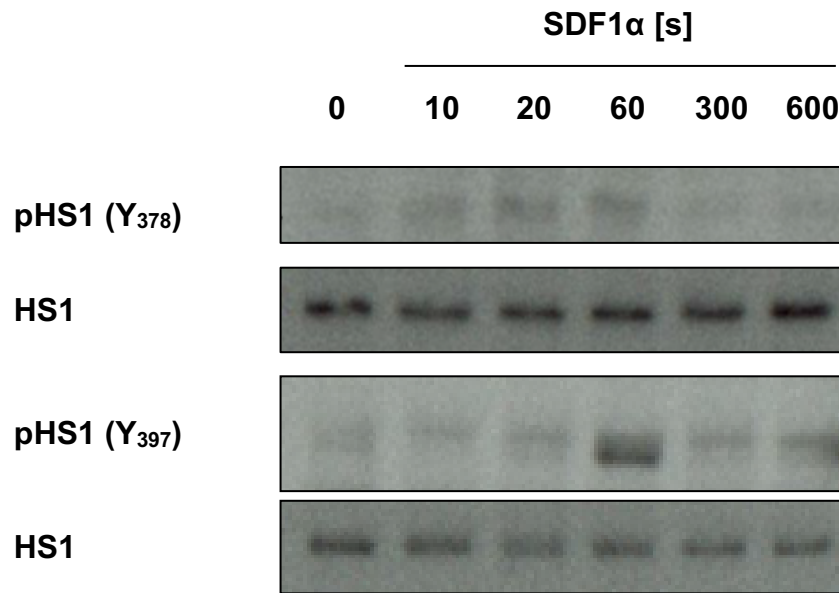
Nach 12- bis 16-stündiger Inkubation im Kulturmedium X-Vivo + 1 % PS wurden je 10<sup>6</sup> Zellen/ml der Zelllinie Je6.1 (PTX, PP1, Emodin, Wiskostatin, CK-666 und Jasplakinolide) oder Peer (Bay 61-3606 und Latrunculin A) entweder in DMSO oder mit den entsprechenden pharmakologischen Inhibitoren (500 ng/ml PTX, 50 μM PP1, 10 μM Bay 61-3606, 40 μM Emodin, 15 μM Wiskostatin, 100 μM CK-666, 1 μM Jasplakinolide und 5 μM Latrunculin A) behandelt.

1  $\mu$ M Jasplakinolide oder 5  $\mu$ M Latrunculin) für 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden jeweils 180.000 Zellen ( $10^6$  Zellen/ml) entweder unbehandelt belassen oder zu entsprechenden Zeitpunkten mit 100 ng/ml SDF1 $\alpha$  stimuliert, fixiert, permeabilisiert, mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Phalloidin gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurden 10.000 Zellen pro Probe aufgenommen und vermessen. Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität.

## **4.4 Das Adapterprotein HS1 und die Tyrosinkinase ZAP70 in der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signalkaskade**

### **4.4.1 CXCR4-induzierte HS1-Phosphorylierung**

In Vorarbeiten der Forschungsgruppe wurde das Adapterprotein HS1 als ein wichtiger Mediator zwischen der SDF1 $\alpha$ -induzierten Signaltransduktion und der Aktin-Reorganisation in gesunden T-Zellen identifiziert (Lettau et al. 2015). Zur weiteren Charakterisierung der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion in neoplastischen T-Zellen wurde daher eine potenzielle Beteiligung des Adapterproteins HS1 untersucht. Hierzu wurden die Je6.1-Zellen zunächst mit SDF1 $\alpha$  für definierte Zeitintervalle stimuliert, lysiert und anschließend die Phosphorylierung von HS1 im Western Blot unter Verwendung unterschiedlicher Antikörper (HS1, phospho-HS1 Y<sub>378</sub>, phospho-HS1 Y<sub>397</sub>) untersucht. Hierbei konnte eine transiente SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte Phosphorylierung von HS1 an Y<sub>397</sub> etwa 60 Sekunden nach SDF1 $\alpha$ -Stimulation nachgewiesen werden. Zudem konnte auch eine HS1-Phosphorylierung an Y<sub>378</sub> bis zu 60 Sekunden nach SDF1 $\alpha$ -Stimulation beobachtet werden, diese zeigte sich jedoch sehr schwach und stetig zunehmend (Abbildung 14). Hierbei konnte eine transiente SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte Phosphorylierung von HS1 an Y<sub>397</sub> etwa 60 Sekunden nach SDF1 $\alpha$ -Stimulation nachgewiesen werden. Zudem konnte auch eine HS1-Phosphorylierung an Y<sub>378</sub> bis zu 60 Sekunden nach SDF1 $\alpha$ -Stimulation beobachtet werden, diese zeigte sich jedoch sehr schwach und stetig zunehmend (Abbildung 14).

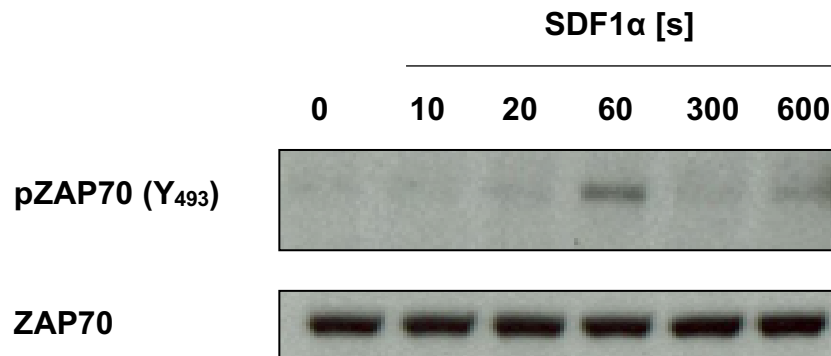


**Abb. 14: Nachweis der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Phosphorylierung von HS1.**

Nach 12- bis 16-stündiger Inkubation im Kulturmedium X-Vivo mit 1 % PS wurden je  $10^6$  Je6.1-Zellen ( $10^6$  Zellen/ml) entweder unbehandelt belassen oder für entsprechende Zeitintervalle mit 100 ng/ml SDF1 $\alpha$  stimuliert und anschließend lysiert. Pro Lysat wurden 15  $\mu$ g reduziertes Protein aufgetragen, mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulose transferiert und mittels Immunoblot unter Verwendung monoklonaler Antikörpern gegen phospho-HS1 Y<sub>378</sub> und phospho-HS1 Y<sub>397</sub> visualisiert. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden die Blots gestrippt und HS1 mittels Immunoblot nachgewiesen.

#### 4.4.2 CXCR4-induzierte ZAP70-Phosphorylierung

Im Rahmen der Detektion potenzieller Kinasen der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Phosphorylierung von HS1 in neoplastischen T-Zellen wurde die Rolle der Tyrosinkinase ZAP70 (*Zeta-Chain Of T-Cell Receptor Associated Protein Kinase 70*) untersucht, welche für ihre wichtige Rolle in der Signalkaskade des T-Zell Rezeptors bekannt ist und funktionell bereits mit der Phosphorylierung von HS1 nach TZR-Ligation assoziiert wird (Gomez et al. 2006). Zudem ist die funktionelle Homologie zwischen ZAP70 und Syk-Tyrosinkinasen (Kong et al. 1995) im Hinblick auf die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signalkaskade besonders interessant, da die dargestellten Inhibitorstudien auf eine potenzielle Beteiligung der Syk-Tyrosinkinase in der SDF1 $\alpha$ -induzierten Aktin-Polymerisation hindeuten. Die Western Blot-Analyse der Tyrosinkinase ZAP70 ergab eine transiente Phosphorylierung von ZAP70 an Tyrosin493 etwa 60 Sekunden nach SDF1 $\alpha$ -Stimulation (Abbildung 15).

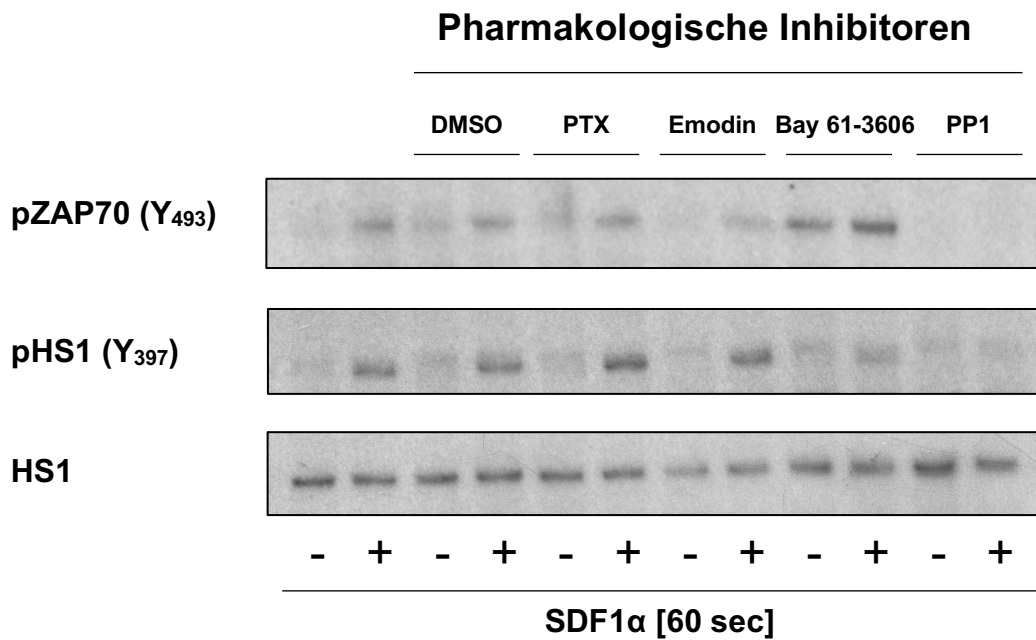


**Abb. 15 Nachweis einer SDF1α/CXCR4-induzierten Phosphorylierung von ZAP70.**

Nach 12- bis 16-stündiger Inkubation im Kulturmedium X-Vivo + 1 % PS wurden je  $10^6$  Je6.1-Zellen ( $10^6$  Zellen/ml) entweder unbehandelt belassen oder zu entsprechenden Zeitpunkten mit 100 ng/ml SDF1α stimuliert und anschließend lysiert. Pro Lysat wurden 15 µg reduziertes Protein aufgetragen, mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulose transferiert und mittels Immunoblot unter Verwendung monoklonaler Antikörper gegen phospho-ZAP70 Y<sub>493</sub> visualisiert. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde der Blot gestripped und ZAP70 mittels Immunoblot nachgewiesen.

#### 4.4.3 Charakterisierung der Phosphorylierung von ZAP70 und HS1

Da die Kinetik der SDF1α/CXCR4-induzierten Phosphorylierung von HS1 und ZAP70 in den neoplastischen T-Zellen auf eine mögliche Phosphorylierung des Adapterproteins HS1 durch die Tyrosinkinase ZAP70 hindeutet, sollte im Weiteren die Rolle von HS1 und ZAP70 in der SDF1α/CXCR4-Signalkaskade näher charakterisiert werden. Hierfür wurden die leukämischen Je6.1-T-Zellen mit den pharmakologischen Inhibitoren PTX, Emodin, Bay 61-3606 und PP1 behandelt, welche bereits zuvor in der CXCR4-vermittelten Aktin-Polymerisation untersucht wurden (Vgl. Abbildung 13). In der durchgeführten Western Blot-Analyse zeigten die Behandlungen mit PTX und Emodin keinen Einfluss auf die SDF1α/CXCR4-induzierte ZAP70- und HS1-Phosphorylierung. Die mit Bay 61-3606 behandelten Zellen zeigten sowohl ohne als auch mit SDF1α-Stimulation eine stärkere Phosphorylierung von ZAP70 und eine schwächere SDF1α-induzierte HS1-Phosphorylierung. Die Behandlung mit PP1 führte hingegen zur Hemmung der SDF1α/CXCR4-vermittelten Phosphorylierung von ZAP70 und HS1 (Abbildung 16).



**Abb. 16: Einfluss unterschiedlicher pharmakologischer Inhibitoren auf die SDF1α/CXCR4-induzierte ZAP70- und HS1-Phosphorylierung.**

Nach 12- bis 16-stündiger Inkubation im Kulturmedium X-Vivo + 1 % PS wurden je  $2 \times 10^6$  Je6.1-Zellen ( $10^6$  Zellen/ml) in DMSO oder mit pharmakologischen Inhibitoren (500 ng/ml PTX, 40  $\mu$ M Emodin, 10  $\mu$ M Bay 61-3606 oder 50  $\mu$ M PP1) für 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen entweder unbehandelt belassen oder für 60 Sekunden mit 100 ng/ml SDF1α stimuliert und anschließend lysiert. Pro Lysat wurden 15  $\mu$ g reduziertes Protein aufgetragen, mittels SDS-PAGE separiert, auf Nitrocellulose transferiert und phospho-ZAP70 Y<sub>493</sub> mittels Immunoblot visualisiert. Anschließend wurde der Blot gestripped und phospho-HS1 Y<sub>397</sub> mittels Immunoblot nachgewiesen. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde nach erneutem Strippen im Anschluss HS1 mittels Immunoblot dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentativer Befund von 3 Experimenten.

## 5 Diskussion

Chemokine und Chemokinrezeptoren nehmen sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle ein. Unter physiologischen Bedingungen regulieren sie die Migration und Rekrutierung von Immunzellen sowie die Proliferation und das Überleben. Unter pathologischen Bedingungen können sie die Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen beeinflussen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das Vorkommen der Chemokinrezeptoren auf neoplastischen T-Zellen untersucht und deren Signaltransduktion charakterisiert werden. Hierzu wurden 13 verschiedene neoplastische T-Zelllinien verwendet, die der Arbeitsgruppe zur Verfügung standen.

### 5.1 Überexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 auf leukämischen und lymphatischen T-Zellen.

Die durchflusszytometrische Analyse der Rezeptoren CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 und CXCR3 sowie CXCR4 ergab, dass frisch isolierte, nicht-neoplastische T-Zellen die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 exprimierten und die mit IL-2 expandierten T-Zellen eine Expression von CCR7, CXCR3 und CXCR4 zeigten, wohingegen die neoplastischen T-Zelllinien im Vergleich zu der nicht-transformierten T-Zell-Population eine geringere Expression von CCR7 und CXCR3 und eine deutlich stärkere Expression von CXCR4 zeigten. Darüber hinaus war die Expression des Chemokinrezeptors CCR9 in vereinzelten neoplastischen T-Zelllinien (H9, Molt-4, Molt-13 und P12) im Vergleich zu den primären T-Zellen erhöht.

Die Expression von CCR7, CXCR3 und CXCR4 auf primären T-Zellen deckt sich mit der Literatur. Diese beschreibt, dass CCR7 hauptsächlich von naiven B- und T-Zellen, regulatorischen T-Zellen und zentralen T-Gedächtniszellen sowie von reifen dendritischen Zellen exprimiert wird (Förster et al. 2008, Legler et al. 2014, Cuesta-Mateos et al. 2021) und der Chemokinrezeptor CXCR3 vorrangig auf aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen und T<sub>H</sub>1-Zellen, sowie NK-T-Zellen, NK-Zellen und dendritischen Zellen zu finden ist (Qin et al. 1998, Groom und Luster 2011). Unter physiologischen Bedingungen spielen die Rezeptoren CCR7 und CXCR3 in der zielgerichteten Wanderung von Leukozyten eine essenzielle Rolle. So koordiniert CCR7

beispielsweise das *Homing* der Lymphozyten zu den lymphatischen Organen, während die Hauptfunktion von CXCR3 in der Regulierung von Entzündungen durch die spezifische Einwanderung von T-Effektorzellen liegt (Ziegler et al. 2007, Förster et al. 2008, Groom und Luster 2011, Bangs et al. 2022). Zwei mögliche Erklärungen für das geringere Expressionsniveau von CCR7 und CXCR3 auf leukämischen T-Zellen sind, dass die untersuchten neoplastischen T-Zellen ursprünglich T-lymphoiden Zellen geringerer Differenzierungsgrade entstammen und sie *in vitro* unter den konventionellen Kulturbedingungen den physiologischen Stimulus durch verschiedene Zytokine zur weiteren Differenzierung nicht erhalten haben. Interessanterweise zeigten primäre ATL-Zellen von Patienten mit Infiltration lymphatischer Gewebe in Studien nämlich eine deutlich höhere CCR7-Expression als primäre ATL-Zellen von Patienten ohne lymphatische Beteiligung (Hasegawa et al. 2000). Im Kontext der Expressionsregulierung von CCR7 und CXCR3 durch Zytokine beobachteten beispielsweise Sallusto et al., dass TGF- $\beta$  die Expression von CCR7 und IFN- $\alpha$  die Expression von CXCR3 erhöhte (Sallusto et al. 1998).

Der Rezeptor CCR9 bindet selektiv das Chemokin TECK (thymus-expressed chemokine; CCL25) und spielt in der physiologischen Entwicklung und Reifung von Thymozyten sowie in der gastralen und intestinalen Immunabwehr eine wesentliche Rolle (Youn et al. 2001, Korbecki et al. 2020). Die vorliegenden Befunde zur CCR9-Expression der leukämischen T-Zelllinien stehen überwiegend im Einklang mit den Arbeiten anderer Forschungsgruppen. Beispielsweise beschreiben Zabel et al. bei 17 untersuchten leukämischen T-Zelllinien lediglich auf Molt-4 und Molt-13 die Expression von CCR9 (Zabel et al. 1999). Die CCR9-Expression auf H9 und P12 wurde bisher jedoch noch nicht beschrieben.

Der Rezeptor CXCR4 spielt in einer Vielzahl pathophysiologischer Prozesse eine Schlüsselrolle, einschließlich der Embryogenese, Hämatopoese, Regulierung der Immunantwort und der Progression von Neoplasien, und wird in verschiedenen Geweben beispielsweise auf Zellen des Immunsystems, des blutbildenden Systems und des Nervensystems exprimiert (Nagasawa 2014, Kawaguchi et al. 2019b). In Studien wurde bereits für zahlreiche Tumorerkrankungen eine erhöhte CXCR4-Expression nachgewiesen (Mukherjee und Zhao 2013, Chatterjee et al. 2014, Cancilla et al. 2020). In diesem Zusammenhang beschreiben unter anderem Pitt et al. im Rahmen eines *Patient-derived xenograft* (PDX) Mausmodells, in dem Zellen von Patienten mit primärer T-ALL in eine immundefiziente Maus implantiert wurden,

ebenfalls eine stärkere CXCR4-Expression der T-ALL-Zellen (Pitt et al. 2015). Insgesamt stehen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen mit der Literatur im Einklang und weisen auf die potenziell wichtige Rolle von CXCR4 in der Pathogenese von T-Zell-Leukämien hin. Bisher ist der einzige bekannte Ligand von CXCR4 das Chemokin SDF1 $\alpha$ . Aufgrund dessen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Ligand-Rezeptor-System in neoplastischen T-Zellen im Detail untersucht.

## **5.2 Rolle der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signalkaskade in der Aktin-Reorganisation neoplastischer T-Zellen**

Um einen Einblick zu erhalten, ob und wie der Chemokinrezeptor CXCR4 die Migrationsfähigkeit leukämischer T-Zellen beeinflusst, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Effekte der CXCR4-Ligation auf die Aktin-Polymerisation untersucht, da diese ein wesentlicher Bestandteil induzierter Veränderungen des Zytoskeletts ist. Im Einklang mit den Vorarbeiten unserer und anderer Forschungsgruppen (Vicente-Manzanares et al. 2003, Fischer et al. 2004, Lettau et al. 2015), ergab die durchflusszytometrische Analyse eine SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte Aktin-Polymerisation sowohl in den primären als auch in den transformierten T-Zellen. Interessanterweise zeigten die nicht-transformierten und leukämischen T-Zelllinien hierbei eine vergleichbare Kinetik der SDF1 $\alpha$ -induzierten Aktin-Polymerisation mit einer 1,5- bis 2,5-fachen Erhöhung des F-Aktin-Gehalts nur etwa 20 Sekunden nach Stimulation mit SDF1 $\alpha$  unabhängig vom CXCR4-Expressionsniveau der Zelllinien (Vgl. Abbildung 7 und 8). Das Chemokin SDF1 $\alpha$  ist der einzige bekannte Ligand für den Chemokinrezeptor CXCR4 und bis vor kurzem galt CXCR4 als der einzige bekannte Rezeptor für SDF1 $\alpha$ . Aktuellere Studien konnten jedoch zeigen, dass der Chemokinrezeptor CXCR7 die Chemokine CXCL11 und SDF1 $\alpha$  binden kann (Balabanian et al. 2005). CXCR7 wurde initial als ein Rezeptor ohne bekannten Liganden beschrieben und als so genannter *Orphan-Receptor* RDC1 oder *Atypical Chemokine Receptor 3* (ACKR3) bezeichnet. Bisher wurde CXCR7 sowohl in gesunden als auch in pathologisch veränderten Geweben wie z. B. nach ischämischen Ereignissen im Gehirn oder bei akutem Nierenversagen nachgewiesen. Zudem wurde

eine erhöhte CXCR7-Expression bei diversen Tumoren wie Gliomen, Mammakarzinomen und Prostatakarzinomen beschrieben (Miao et al. 2007, Hattermann et al. 2010, Yang et al. 2018, Xu et al. 2021). Für primäre T-Zellen und verschiedene leukämische T-Zelllinien wie beispielsweise die in der vorliegenden Arbeit verwendete leukämische T-Zelllinie Je6.1 wurde neben der Expression von CXCR4 auch eine Expression des Rezeptors CXCR7 beschrieben (Balabanian et al. 2005, Kumar et al. 2012, Melo et al. 2014). Obwohl der Ligand SDF1 $\alpha$  mit einer höheren Affinität an CXCR7 bindet als an CXCR4, wird die funktionelle Bedeutung von CXCR7 in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert (Balabanian et al. 2005, Burns et al. 2006, Huynh et al. 2020). Einerseits beschrieben Balabanian et al. und Kumar et al., dass CXCR7 nach Bindung von SDF1 $\alpha$  Einfluss auf die Migration von T-Zellen nimmt (Balabanian et al. 2005, Kumar et al. 2012). Andererseits zeigten Burns et al. und Hartmann et al., dass die Bindung von SDF1 $\alpha$  an CXCR7 keine Auswirkung auf die Zellmotilität oder das Migrationsverhalten von T-Zellen hat (Burns et al. 2006, Hartmann et al. 2008, Levoye et al. 2009). Auch im Hinblick auf die SDF1 $\alpha$ /CXCR7-induzierte Signalkaskade bestehen noch Unklarheiten. Bisher konnte in Studien nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von CXCR7 durch SDF1 $\alpha$  nicht zu der für Chemokinrezeptoren typischen Signalweiterleitung über das Rezeptor-gekoppelte G-Protein führt, sondern eine  $\beta$ -Arrestin-vermittelte Signalkaskade ausgelöst wird und keine Kalziummobilisierung in der Zelle über CXCR7 erfolgt (Burns et al. 2006, Levoye et al. 2009, Kumar et al. 2012). Ausgehend von der fehlenden Kalziummobilisierung und der Beobachtung, dass CXCR7 das Chemokin SDF1 $\alpha$  mit einer höheren Affinität bindet und er somit mit dem Chemokinrezeptor CXCR4 kompetiert, scheint der Rezeptor CXCR7 vielmehr eine regulatorische Funktion zu besitzen. Passend zu dieser Vermutung konnten Untersuchungen nachweisen, dass die SDF1 $\alpha$ -induzierten Effekte wie beispielsweise die Migration von T-Zellen durch eine Ko-Expression von CXCR4 und CXCR7 verstärkt und nach RNA-Interferenz-vermittelter Herunterregulation von CXCR4 deutlich reduziert wurde. Demgegenüber hat eine Herunterregulation von CXCR7 durch RNA-Interferenz keine signifikante Auswirkung auf die Zellmigration (Romain et al. 2014, Kowalski et al. 2017, Huynh et al. 2020). Bisher wurde kein direkter Einfluss von CXCR7 auf die Aktin-Polymerisation nach SDF1 $\alpha$ -Bindung beschrieben. Zusammenfassend ist es daher wahrscheinlich, dass die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete SDF1 $\alpha$ -induzierte Aktin-Polymerisation über

das Zusammenspiel von CXCR4 und CXCR7 oder überwiegend durch CXCR4 vermittelt wird.

Dennoch ist für das weitere Verständnis eine spezifische Expressionsanalyse sowie eine weiterführende Funktionsanalyse von CXCR4 und CXCR7 in gesunden und neoplastischen T-Zellen sinnvoll. Zudem sollte in weiterführenden Migrationsanalysen untersucht werden, inwieweit die Aktin-Polymerisation tatsächlich mit dem Migrationspotenzial von T-Zellen korreliert.

### **5.3 Einfluss pharmakologischer Inhibitoren auf die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion in neoplastischen T-Zellen**

Für die Charakterisierung der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion in neoplastischen T-Zellen wurde der Einfluss unterschiedlicher pharmakologischer Inhibitoren untersucht. PTX verhindert die Wechselwirkung zwischen den gekoppelten G-Proteinen und den Rezeptoren, indem es die ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine Gi, Go und Gt katalysiert. Als potenter Inhibitor von G-Proteinen führte PTX so zu einer deutlichen Reduktion der SDF1 $\alpha$ -induzierten Aktin-Polymerisation und verifizierte somit den Hauptsignalweg von CXCR4 über das an den Rezeptor gekoppelte G-Protein (Busillo und Benovic 2007, Teicher und Fricker 2010). Untersuchungen mit Tyrosinkinase-Inhibitoren zeigten, dass PP1 als selektiver Inhibitor für Src-Tyrosinkinasen (IC<sub>50</sub> = 170 nM) und Bay 61-3606 als ein hochselektiver Inhibitor für die Syk-Tyrosinkinase (K<sub>i</sub> = 7.5 nM; IC<sub>50</sub> = 10 nM) zur Reduktion der induzierten Aktin-Polymerisation führten und deuten demzufolge auf die Beteiligung sowohl der Src- als auch der Syk-Tyrosinkinasen an der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signalkaskade hin. Dies deckt sich mit Befunden anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls Tyrosinkinasen der Src- und Syk-Familie funktionell mit der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion assoziierten (Ticchioni et al. 2002, Fernandis et al. 2003, Matsusaka et al. 2005, Teicher und Fricker 2010, Cheng et al. 2017). So zeigten beispielsweise McCaig et al. und Ticchioni et al., dass die pharmakologische Inhibition von Src- bzw. Syk-Tyrosinkinasen die SDF1 $\alpha$ /CXCR4-vermittelte Zellmigration reduzierte (Ticchioni et al. 2002, McCaig et al. 2012). Syk-Tyrosinkinasen werden hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen exprimiert und sind vor allem für die Beteiligung an der Signaltransduktion von Immunrezeptoren bekannt (Mócsai et al.

2010). Tyrosinkinasen der Src-Familie nehmen in der Signaltransduktion diverser biologischer Prozesse wie zum Beispiel des Wachstums, der Teilung, der Migration und des Überlebens von Zellen eine Schlüsselrolle ein (Roskoski 2015) und werden gewebs- und zelltypspezifisch exprimiert. So konnte beispielsweise die Expression von Lck, Lyn und Hck lediglich in hämatopoetischen Zellen nachgewiesen werden, während c-Src, Fyn und c-Yes ubiquitär exprimiert werden (Boggon und Eck 2004, Zhang et al. 2014). Manning et al. identifizierten 11 Mitglieder der Src-Tyrosinkinasen, von denen Fyn, Lyn und Lck zu den bekanntesten Vertretern zählen (Manning et al. 2002, Roskoski 2015). Hierbei wurde Lck bereits mit der T-Zell-Aktivierung assoziiert (Palacios und Weiss 2004). Für die weitere Charakterisierung wurde daher Emodin als selektiver Inhibitor für Lck ( $IC_{50} = 18.5 \mu M$ ) verwendet. Dieser zeigte jedoch keinen merklichen Effekt auf die SDF1 $\alpha$ -induzierte Aktin-Polymerisation. Es gibt zwar Untersuchungen, die eine Beteiligung von Lck an der Signaltransduktion von SDF1 $\alpha$ /CXCR4 in T-Zellen beschreiben, diese Annahme beruht jedoch vorrangig auf der Detektion einer Phosphorylierung von Lck nach Ligation des Rezeptors CXCR4 durch SDF1 $\alpha$  (Ghosh et al. 2009, Teicher und Fricker 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Lck in der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation funktionell untersucht, sodass die Lck-Beteiligung an der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion in neoplastischen T-Zellen folglich weder bestätigt noch widerlegt werden kann. Der Befund legt lediglich nahe, dass Lck nicht an der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-vermittelten Aktin-Polymerisation in leukämischen T-Zellen beteiligt ist. Darüber hinaus konnten Manu et al. für Zellen von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) zeigen, dass der Inhibitor Emodin *in vitro* dosisabhängig zur Reduktion der CXCR4-Expression führt und die Behandlung mit 50  $\mu M$  Emodin die SDF1 $\alpha$ -vermittelte Migration der HCC-Zelllinien reduzieren kann (Manu et al. 2013). Eine weitere mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt in der dargestellten Untersuchung kann daher also auch die verwendete Konzentration von lediglich 40  $\mu M$  Emodin sein. Im weiteren Verlauf wurden auch pharmakologische Inhibitoren des Aktin-Zytoskelettes und der Aktin-Reorganisationsmaschinerie analysiert. Hierbei führten Jasplakinolide als Stabilisator für präformierte Aktinfilamente ( $K_D \sim 15 \text{ nM}$ ) und Latrunculin A als Stabilisator für das monomere G-Aktin ( $K_D = 200 \text{ nM}$ ) zu einer effektiven Hemmung der induzierten Aktin-Polymerisation. Dieser Befund steht mit anderen Arbeiten im Einklang, da in diesem Zusammenhang bereits beschrieben

wurde, dass Jasplakinolide nicht nur die Aktinnukleation fördert, sondern auch über die Bindung an Aktinfilamenten das präformierte Aktin in der Zelle stabilisieren und vor der Depolymerisation schützen kann (Bubb et al. 2000, Holzinger 2010). Für Latrunculin A ist beschrieben, dass es nicht nur die Depolymerisation von Aktinfilamenten fördert, sondern zudem mit einer höheren Affinität an das monomere G-Aktin bindet, wodurch Latrunculin A die Polymerisation von Aktin verhindert (Coué et al. 1987, Fujiwara et al. 2018). Die dargestellten Untersuchungen zu WASP und Arp2/3 als Hauptvertreter der Aktin-Reorganisationsmaschinerie ergaben, dass Wiskostatin als selektiver Inhibitor ( $IC_{50} \sim 10 \mu M$ ) für N-WASP (*neural Wiskott-Aldrich-syndrome protein*) zu einer Reduktion der SDF1 $\alpha$ -vermittelten Aktin-Polymerisation führt. Dies steht im Einklang mit der bereits beschriebenen Rolle von (N-)WASP in der SDF1 $\alpha$ -vermittelten Aktin-Reorganisation und Migration von T-Zellen (Haddad et al. 2001, Okabe et al. 2002, Gallego et al. 2006). N-WASP zählt mit WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) und WAVE1-3 zu den Vertretern der Proteinfamilie WASP/WAVE und spielt eine Schlüsselrolle in der Verschaltung der Signaltransduktion extrazellulärer Stimuli mit der molekularen Maschinerie der Aktin-Polymerisation (Thrasher 2002, Alekhina et al. 2017). N-WASP und WASP besitzen eine Sequenzhomologie von mehr als 50 % und haben viele gemeinsame Interaktionspartner (Jain und Thanabalu 2015). Im Gegensatz zu WASP, welches lediglich auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, konnte die Expression von N-WASP ubiquitär und unter anderem auch im Nervengewebe (*neural WASP*) nachgewiesen werden (Millard und Machesky 2001, Takenawa und Suetsugu 2007, Jain und Thanabalu 2015). Die Rolle von WASP wird vor allem durch das Wiskott-Aldrich Syndrome deutlich, in dem die fehlende oder fehlerhafte Expression von WASP zu einer schweren Insuffizienz des Immunsystems und der Blutgerinnung führt (Konno et al. 2007, Bosticardo et al. 2009, Biber et al. 2021). In der T-Zell-Biologie spielt sowohl N-WASP als auch WASP eine besondere Rolle. Beispielsweise zeigten Studien, dass Mutationen von N-WASP zu einer gestörten T-Zell-Differenzierung führen (Cotta-de-Almeida et al. 2007) und *Knockout*-Mäuse, denen N-WASP fehlen, bereits während der Embryonalentwicklung versterben (Snapper et al. 2001). In T-Zellen führen Mutationen und Fehlregulationen von WASP zu einer abnormalen Architektur des Zytoskeletts und Beeinträchtigungen der Aktin-Polymerisation mit folglich gestörter Zellmigration (Snapper et al. 1998, Zhang et al. 1999, Gallego et al. 2006). Zu den zahlreichen Interaktionspartnern von N-WASP und WASP zählen vor

allem WIP und Arp2/3 (Takenawa und Suetsugu 2007). In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass die Interaktion zwischen WASP und WIP für die SDF1 $\alpha$ -induzierte Migration von T-Zellen essenziell ist (Gallego et al. 2006). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte, selektive Inhibition des Arp2/3-Komplexes durch CK-666 (IC<sub>50</sub> = 4  $\mu$ M) zeigte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die SDF1 $\alpha$ -vermittelte Aktin-Polymerisation. Hierzu liegen bisher keine bestätigenden oder widersprüchlichen Befunde vor. Die Bedeutung von Arp2/3 in der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion in T-Zellen ist derzeit noch unbekannt. Für T-Zellen wurde Arp2/3 funktionell aber bereits mit der TZR-vermittelten Aktin-Polymerisation assoziiert (Billadeau et al. 2007, Thompson et al. 2022). Der Arp2/3-Komplex zählt wie Formin und die *tandem-monomer-binding nucleators* zu den drei bekannten Klassen der sogenannten Nukleationsfaktoren, welche die Nukleation und Elongation von Aktin fördern. Arp2/3 besteht aus sieben Untereinheiten und ist im alleinigen Zustand ein ineffizienter Nukleator, da seine Arp2- und Arp3-Untereinheit für die Nukleation zu weit voneinander entfernt sind und die seitliche Bindung an Aktinfilamente kinetisch ungünstig ist. Die Fähigkeit, die Aktin-Polymerisation zu fördern, wird jedoch mit Hilfe von NPFs (*nucleation-promoting factors*) wie zum Beispiel WASP stark erhöht (Weston et al. 2012, Rottner et al. 2017, Buracco et al. 2019).

Zusammenfassend konnte im Rahmen der dargestellten Untersuchungen also gezeigt werden, dass das Rezeptor-gekoppelte G-Protein, die Src- sowie Syk-Tyrosinkinasen und das Adaptorprotein (N-)WASP an der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation beteiligt sind.

#### **5.4 SDF1 $\alpha$ -induzierte HS1-Phosphorylierung**

In T-Zellen wurde das Aktin-bindende Adapterprotein HS1 funktionell insbesondere mit der T-Zell-Aktivierung assoziiert. In diesem Zusammenhang wird HS1 nach der Ligation des TZR an Y<sub>378</sub> und Y<sub>397</sub> phosphoryliert, wodurch anschließend Interaktionen zwischen HS1 und weiteren Proteinen und Enzymen ermöglicht werden. Durch seine direkte Bindung an F-Aktin und Interaktionspartner wie den Arp2/3-Komplex oder Vav1 reguliert HS1 direkt und indirekt die Aktin-Reorganisation und ist so an der Regulation

der Zellmigration beteiligt (Uruno et al. 2003, Hao et al. 2005). Pathophysiologisch wird die Überexpression und gesteigerte Phosphorylierung von HS1 mit einer ungünstigeren Prognose von B-CLL-Patienten assoziiert (Scielzo et al. 2005, ten Hacken et al. 2013). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte für gesunde T-Zellen bereits nachgewiesen werden, dass HS1 an der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation und Migration beteiligt ist, indem es unter anderem mit dem Adapterprotein Nck interagiert (Lettau et al. 2015; Abbildung 6). Die Modulation der Aktin-Reorganisation durch Nck beruht vor allem auf dessen Bindung an das phosphorylierte Protein Slp76, welches seinerseits Vav1 rekrutiert und so zur Aktivierung der Rho-GTPasen cdc42 und Rac führt. Nachfolgend aktivieren cdc42 und Rac das Adapterprotein WASP, welches durch seine Interaktion mit dem Arp2/3-Komplex eine zentrale Stellung in der Maschinerie der Aktin-Reorganisation einnimmt (Badour et al. 2004, Ngoenkam et al. 2021). In diesem Kontext zeigten Lettau et al., dass die Ligation von CXCR4 mit SDF1 $\alpha$  in primären T-Zellen zu einer raschen und transienten Phosphorylierung von HS1 an Y<sub>378</sub> und Y<sub>397</sub> führt und eine RNA-Interferenz-vermittelte Herunterregulation von HS1 die Zellmigration reduziert (Lettau et al. 2015). Aufgrund dessen wurde zur weiteren Charakterisierung der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion eine mögliche Beteiligung des Adapterproteins HS1 in den leukämischen T-Zellen analysiert. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete rasche und transiente SDF1 $\alpha$ -induzierte HS1-Phosphorylierung leukämischer T-Zellen an Y<sub>397</sub> nach einminütiger SDF1 $\alpha$ -Stimulation ist mit der HS1(Y<sub>397</sub>)-Phosphorylierung in gesunden T-Zellen vergleichbar. Interessanterweise zeigte sich die SDF1 $\alpha$ -induzierte, bis zu 60 Sekunden nachweisbare HS1-Phosphorylierung in leukämischen T-Zellen an Y<sub>378</sub> hingegen schwächer und stetig zunehmend. Eine SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierte HS1-Phosphorylierung in leukämischen T-Zellen ist bisher noch nicht beschrieben worden. Es gibt neben der oben genannten Vorarbeit zu HS1 in primären T-Zellen von Lettau et al. jedoch Untersuchungen, die HS1 funktionell auch mit der SDF1 $\alpha$ -vermittelten Migration von NK-Zellen assoziieren und zudem auf die essenzielle Rolle der spezifischen HS1-Phosphorylierung an Y<sub>378</sub> und Y<sub>397</sub> für die zielgerichtete Migration von NK-Zellen hindeuten (Butler et al. 2008, Mukherjee und Zhao 2013). Während die Y<sub>397</sub>-Phosphorylierung vor allem für die Rekrutierung von Vav1 und WASP, die GTPase-Aktivierung und die Aktin-Reorganisation bei der Adhäsion am ICAM-1 erforderlich ist, reguliert die

Phosphorylierung an Y<sub>378</sub> die ICAM-1-unabhängige Aktivierung von Vav1, cdc42 und Rac1, sowie die Chemotaxis von NK-Zellen (Butler et al. 2008). In Mausmodellen konnten Hacken et al. bereits demonstrieren, dass die Hemmung der LYN-vermittelten HS1-Phosphorylierung an Y<sub>397</sub> durch den Kinase-Inhibitor Dasatinib den B-CLL-Krankheitsverlauf günstig beeinflusst und die Infiltration der lymphatischen Organe reduziert (ten Hacken et al. 2013). In diesem Kontext könnte vor allem die HS1-Phosphorylierung an Y<sub>397</sub> auch für die Entwicklung spezifischer Therapien von T-Zell-Neoplasien einen interessanten Ansatz darstellen.

### **5.5 SDF1 $\alpha$ -induzierte ZAP70-Phosphorylierung**

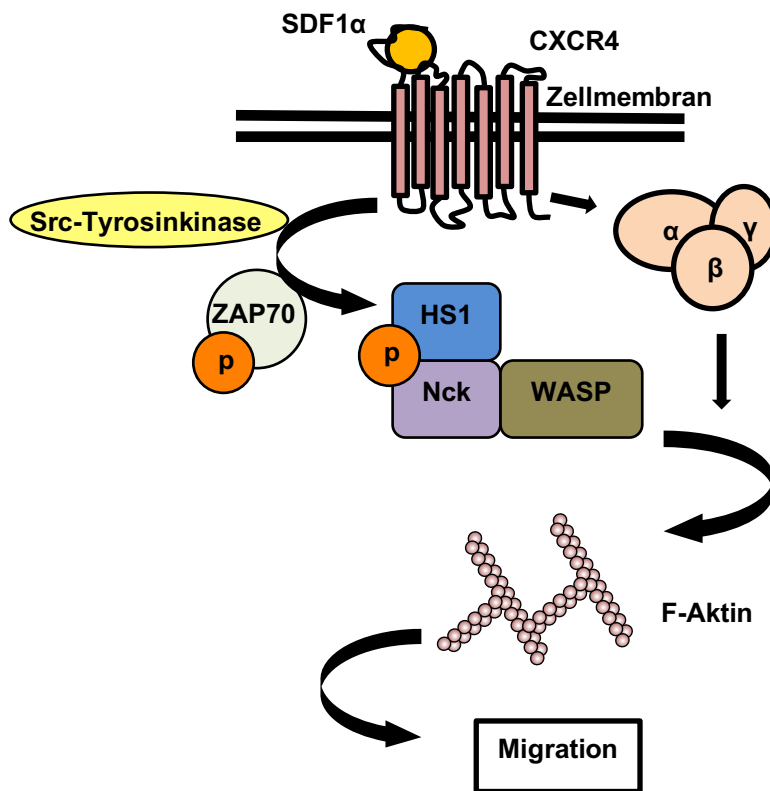
Auf der Suche nach involvierten Kinasen in der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signalkaskade in neoplastischen T-Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die SDF1 $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung der Kinase ZAP70 an Y<sub>493</sub> festgestellt. Dies steht im Einklang mit Vorarbeiten anderer Forschungsgruppen (Ottoson et al. 2001, Ticchioni et al. 2002, Alsadeq et al. 2017). ZAP70 ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase und spielt eine essenzielle Rolle in der Regulierung des adaptiven Immunsystems. Mutationen von ZAP70 können demnach zu schwerwiegenden kombinierten Immundefekten führen (Arpaia et al. 1994, Chan et al. 1994, Elder et al. 1994). In T-Zellen wurde ZAP70 funktionell vor allem mit der T-Zell-Aktivierung assoziiert. Die T-Zell-Aktivierung führt hierbei zur Aktivierung unterschiedlicher Kinasen wie beispielsweise Fyn und Lck, welche daraufhin die ITAMs in den TZR-assoziierten  $\zeta$ -Ketten phosphorylieren. Im Anschluss kann ZAP70 an die phosphorylierte  $\zeta$ -Kette binden und wird ihrerseits durch Lck oder Fyn phosphoryliert und aktiviert. Anschließend initiiert ZAP70 durch die Rekrutierung/Phosphorylierung unterschiedlicher Interaktionspartner verschiedene Signalwege. So rekrutiert ZAP70 beispielsweise LAT und Slp76, welche unter anderem mit Vav1 interagieren, welches wiederum durch weitere Interaktionspartner wie WASP und dem Arp2/3-Komplex die Aktin-Polymerisation initiiert (Barda-Saad et al. 2005, Burkhardt et al. 2008, Wang et al. 2010). Daher spielt ZAP70 unter anderem eine essenzielle Rolle in der Zellmigration von T-Zellen. So konnten beispielsweise Ticchioni et al. nachweisen, dass sowohl die pharmakologische Inhibition von ZAP70 als auch der Mangel an

funktionalem ZAP70 durch Mutationen zu einer schweren Beeinträchtigung der transendothelialen Migration von T-Zellen führt (Ticchioni et al. 2002).

### **5.6 Charakterisierung der SDF1 $\alpha$ -induzierten Phosphorylierung von ZAP70 und HS1**

In weiteren Untersuchungen wurde die SDF1 $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von ZAP70 und HS1 verifiziert und mit Hilfe von pharmakologischen Inhibitoren näher charakterisiert, welche im Vorfeld in Hinblick auf die SDF1 $\alpha$ -induzierte Aktin-Polymerisation bereits untersucht wurden. Hierbei führte PP1, ein spezifischer Inhibitor für Src-Tyrosinkinasen, zur Hemmung der ZAP70- und HS1-Phosphorylierung, während der Lck-Inhibitor Emodin die Phosphorylierung von ZAP70 nur leicht reduzierte. Die Hemmung des rezeptorgekoppelten G-Proteins durch PTX zeigte jedoch keinen deutlichen Einfluss auf die Phosphorylierung von ZAP70 oder HS1. Diese Beobachtungen sind deckungsgleich mit den in der Literatur beschriebenen Sachverhalten (Levin et al. 2008, Wang et al. 2010, Klasen et al. 2014, Thill et al. 2016). Die Befunde legen nahe, dass die Ligandierung von CXCR4 durch SDF1 $\alpha$  zu einer G-Protein-unabhängigen und Src-Tyrosinkinasen-abhängigen Phosphorylierung von ZAP70 und möglicherweise infolgedessen zur Phosphorylierung des Adapterproteins HS1 an Y<sub>397</sub> führt. Bisher liegen keine detaillierten Daten zur SDF1 $\alpha$ -induzierten und ZAP70-vermittelten Phosphorylierung von HS1 in T-Zellen vor. Für die TZR-induzierte HS1-Phosphorylierung zeigten jedoch Gomez und Carrizosa et al., dass ZAP70 für die Phosphorylierung von HS1 in T-Zellen unerlässlich ist (Gomez et al. 2006, Carrizosa et al. 2009).

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die SDF1 $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von ZAP70 und HS1 näher charakterisiert und trägt so zu einem besseren Verständnis der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signaltransduktion in neoplastischen T-Zellen bei (Abbildung 17). Vor dem Hintergrund, dass die Herunterregulation von ZAP70 und HS1 die Zellmigration von T-Zellen reduziert (Ottofon et al. 2001, Lettau et al. 2015), stellt insbesondere die Interaktion von ZAP70 und HS1 eine mögliche Zielstruktur neuartiger Therapieansätze für T-Zell-Malignome dar.



**Abb. 17: SDF1 $\alpha$ -induzierte, G-Protein-unabhängige und Src-Tyrosinkinasen-abhängige Phosphorylierung von ZAP70 und HS1 in leukämischen T-Zellen.**

Dargestellt sind Ergebnisse aus Lettau et al. 2015 und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

## 6 Zusammenfassung

Das Chemokin-Netzwerk spielt in der Pathogenese multipler Tumorentitäten eine wesentliche Rolle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Chemokinrezeptoren und die SDF1 $\alpha$ -induzierte Signaltransduktion von CXCR4 in neoplastischen T-Zellen untersucht. Im Vergleich zu frisch isolierten primären T-Zellen wiesen die neoplastischen T-Zelllinien ein verändertes Expressionsprofil der Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR3 und insbesondere des Rezeptors CXCR4 auf. In Anbetracht der essenziellen Rolle der Reorganisation des Aktin-Zytoskletts als Voraussetzung für das Migrations- und Invasionspotenzial von Tumorzellen wurden Einflüsse der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-Signalkaskade auf die Aktin-Reorganisation analysiert. Die Ligation des Rezeptors CXCR4 durch SDF1 $\alpha$  induzierte in gesunden und neoplastischen T-Zellen eine Aktin-Polymerisation mit einem ähnlichen Verlauf und einem Maximum nach 15 bis 20 Sekunden. Neben pharmakologischer Inhibition des Rezeptor-gekoppelten G-Proteins bewirkte die Inhibition von Src- und Syk-Kinasen durch PP1 und Bay 61-3606, sowie von N-WASP durch Wiskostatin eine partielle Reduktion der CXCR4-vermittelten Aktin-Polymerisation. Durch die Ligation von CXCR4 mit SDF1 $\alpha$  wird in neoplastischen T-Zellen eine transiente, G-Protein-unabhängige Phosphorylierung der Kinase ZAP70 und des Adapterproteins HS1 hervorgerufen. Während die Inhibitoren PTX und Emodin die Phosphorylierung von ZAP70 und HS1 nicht merklich beeinflussten, bewirkte der Src-Kinasen-Inhibitor PP1 eine Hemmung der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-vermittelten Phosphorylierung von ZAP70 und verhinderte möglicherweise dadurch die Phosphorylierung von HS1.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CXCR4 auf neoplastischen T-Zellen verstärkt exprimiert wird und die Ligation von CXCR4 durch das Chemokin SDF1 $\alpha$  in leukämischen T-Zellen eine G-Protein-unabhängige und Src-Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung von ZAP70 und HS1 induziert. Zudem konnte belegt werden, dass das Rezeptor-gekoppelte G-Protein, die Src- sowie Syk-Tyrosinkinase und das Adaptorprotein (N-)WASP an der SDF1 $\alpha$ /CXCR4-induzierten Aktin-Polymerisation beteiligt sind. Die detaillierte Charakterisierung der Signalkaskade von SDF1 $\alpha$ /CXCR4 erlaubt dabei ein genaueres Verständnis der komplexen Netzwerke von Signalwegen, die die Migration und Invasion von T-Zellen

bestimmen, und stellt somit eine vielversprechende Möglichkeit für neuartige, spezifische Therapieansätze für T-Zell-Malignome dar.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alekhina O, Burstein E, Billadeau DD. 2017. Cellular functions of WASP family proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(14):2235–2241.
- Allen SJ, Crown SE, Handel TM. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual Review of Immunology*, 25:787–820.
- Alsadeq A, Fedders H, Vokuhl C, Belau NM, Zimmermann M, Wirbelauer T, Spielberg S, Vossen-Gajcy M, Cario G, Schrappe M, et al. 2017. The role of ZAP70 kinase in acute lymphoblastic leukemia infiltration into the central nervous system. *Haematologica*, 102(2):346–355.
- Arimont M, Sun S-L, Leurs R, Smit M, de Esch IJP, de Graaf C. 2017. Structural Analysis of Chemokine Receptor–Ligand Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(12):4735–4779.
- Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A, Roifman CM. 1994. Defective T cell receptor signaling and CD8<sup>+</sup> thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. *Cell*, 76(5):947–958.
- Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, et al. 2014. International Union of Pharmacology. LXXXIX. Update on the Extended Family of Chemokine Receptors and Introducing a New Nomenclature for Atypical Chemokine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 66(1):1–79.
- Badour K, Zhang J, Siminovitch KA. 2004. Involvement of the Wiskott-Aldrich syndrome protein and other actin regulatory adaptors in T cell activation. *Seminars in Immunology*, 16(6):395–407.
- Bagley RG. 2010. *The Tumor Microenvironment*. Springer Science & Business Media.
- Bajor-Dattilo EB, Pittaluga S, Jaffe ES. 2013. Pathobiology of T-cell and NK-cell lymphomas. Best practice & research. *Clinical haematology*, 26(1):75–87.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KYC, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. 2005. The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes \*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42):35760–35766.
- Balkwill F. 2004. Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews Cancer*, 4(7):540–550.
- Bangs DJ, Tsitsiklis A, Steier Z, Chan SW, Kaminski J, Streets A, Yosef N, Robey EA. 2022. CXCR3 regulates stem and proliferative CD8<sup>+</sup> T cells during chronic infection by promoting interactions with DCs in splenic bridging channels. *Cell Reports*, 38(3):110266.
- Barda-Saad M, Braiman A, Titerence R, Bunnell SC, Barr VA, Samelson LE. 2005. Dynamic

- molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nature Immunology*, 6(1):80–89.
- Bendell AC, Williamson EK, Chen CS, Burkhardt JK, Hammer DA. 2017. The Arp 2/3 Complex Binding Protein HS1 is Required for Efficient Dendritic Cell Random Migration and Force Generation. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 9(8):695–708.
- Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS. 2007. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nature Reviews. Immunology*, 7(2):131–143.
- Blonska M, Agarwal NK, Vega F. 2015. Shaping of the tumor microenvironment: Stromal cells and vessels. *Seminars in Cancer Biology*, 34:3–13.
- Böcker W. 2008. Pathologie: mit über 200 Tabellen. Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- Boggon TJ, Eck MJ. 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, 23(48):7918–7927.
- Bubb MR, Spector I, Beyer BB, Fosen KM. 2000. Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7):5163–5170.
- Buracco S, Claydon S, Insall R. 2019. Control of actin dynamics during cell motility. *F1000Research*, 8:F1000 Faculty Rev-1977.
- Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH. 2008. The Actin Cytoskeleton in T Cell Activation. *Annual Review of Immunology*, 26(1):233–259.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold MET, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, et al. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(9):2201–2213.
- Busillo JM, Benovic JL. 2007. Regulation of CXCR4 Signaling. *Biochimica et biophysica acta*, 1768(4):952–963.
- Butler B, Kastendieck DH, Cooper JA. 2008. Differently phosphorylated forms of the cortactin homolog HS1 mediate distinct functions in natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(8):887–897.
- Butrym A, Majewski M, Dzietczenia J, Kuliczowski K, Mazur G. 2012. High expression of hematopoietic cell specific Lyn substrate-1 (HS1) predicts poor survival of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients. *Leukemia Research*, 36(7):876–880.
- Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19):5019–5032.

- Cancilla D, Rettig MP, DiPersio JF. 2020. Targeting CXCR4 in AML and ALL. *Frontiers in Oncology*, 10:1672.
- Carrizosa E, Gomez TS, Labno CM, Klos Dehring DA, Liu X, Freedman BD, Billadeau DD, Burkhardt JK. 2009. Hematopoietic Lineage Cell-Specific Protein 1 Is Recruited to the Immunological Synapse by IL-2-Inducible T Cell Kinase and Regulates Phospholipase C $\gamma$ 1 Microcluster Dynamics during T Cell Spreading. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(11):7352–7361.
- Cassar E, Kartikasari AER, Plebanski M. 2022. Regulatory T Cells in Ovarian Carcinogenesis and Future Therapeutic Opportunities. *Cancers*, 14(22):5488.
- Castro-Ochoa KF, Guerrero-Fonseca IM, Schnoor M. 2019. Hematopoietic cell-specific lyn substrate (HCLS1 or HS1): A versatile actin-binding protein in leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(5):881–890.
- Chaffer CL, Weinberg RA. 2011. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science*, 331(6024):1559–1564.
- Chan AC, Kadlecsek TA, Elder ME, Filipovich AH, Kuo WL, Iwashima M, Parslow TG, Weiss A. 1994. ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5165):1599–1601.
- Chatterjee S, Azad BB, Nimmagadda S. 2014. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. *Advances in cancer research*, 124:31–82.
- Chen K, Bao Z, Tang P, Gong W, Yoshimura T, Wang JM. 2018. Chemokines in homeostasis and diseases. *Cellular and Molecular Immunology*, 15(4):324–334.
- Chen X-P, Qian L-L, Jiang H, Chen J-H. 2011. Ginsenoside Rg3 inhibits CXCR4 expression and related migrations in a breast cancer cell line. *International Journal of Clinical Oncology*, 16(5):519–523.
- Cheng Y, Qu J, Che X, Xu L, Song N, Ma Y, Gong J, Qu X, Liu Y. 2017. CXCL12/SDF-1 $\alpha$  induces migration via SRC-mediated CXCR4-EGFR cross-talk in gastric cancer cells. *Oncology Letters*, 14(2):2103–2110.
- Chow MT, Luster AD. 2014. Chemokines in Cancer. *Cancer immunology research*, 2(12):1125–1131.
- Clore GM, Gronenborn AM. 1995. Three-dimensional structures of  $\alpha$  and  $\beta$  chemokines. *The FASEB Journal*, 9(1):57–62.
- Coico R, Sunshine G. 2015. *Immunology: A Short Course*. John Wiley & Sons.
- Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Telegeev GD, Dubrovskaya A. 2013. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *OncoTargets and therapy*,

6:1347–1361.

Cotta-de-Almeida V, Westerberg L, Maillard MH, Onaldi D, Wachtel H, Meelu P, Chung U, Xavier R, Alt FW, Snapper SB. 2007. Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) and N-WASP are critical for T cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39):15424–15429.

Coué M, Brenner SL, Spector I, Korn ED. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Letters*, 213(2):316–318.

Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marcé S, López-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. 2009. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa023143>.

Cuesta-Mateos C, Terrón F, Herling M. 2021. CCR7 in Blood Cancers – Review of Its Pathophysiological Roles and the Potential as a Therapeutic Target. *Frontiers in Oncology*, 11:736758.

Elder ME, Lin D, Clever J, Chan AC, Hope TJ, Weiss A, Parslow TG. 1994. Human severe combined immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5165):1596–1599.

Fernandis AZ, Cherla RP, Ganju RK. 2003. Differential Regulation of CXCR4-mediated T-cell Chemotaxis and Mitogen-activated Protein Kinase Activation by the Membrane Tyrosine Phosphatase, CD45. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11):9536–9543.

Fischer AM, Mercer JC, Iyer A, Ragin MJ, August A. 2004. Regulation of CXC Chemokine Receptor 4-mediated Migration by the Tec Family Tyrosine Kinase ITK. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28):29816–29820.

Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 8(5):362–371.

Frezzato F, Gattazzo C, Martini V, Trimarco V, Teramo A, Carraro S, Cabrelle A, Ave E, Facco M, Zambello R, et al. 2012. HS1, a Lyn Kinase Substrate, Is Abnormally Expressed in B-Chronic Lymphocytic Leukemia and Correlates with Response to Fludarabine-Based Regimen. *PLoS ONE*, 7(6):e39902.

Fujiwara I, Zweifel ME, Courtemanche N, Pollard TD. 2018. Latrunculin A Accelerates Actin Filament Depolymerization in Addition to Sequestering Actin Monomers. *Current Biology*, 28(19):3183-3192.e2.

Furusato B, Mohamed A, Uhlén M, Rhim JS. 2010. CXCR4 and cancer. *Pathology International*, 60(7):497–505.

- Gallego MD, de la Fuente MA, Anton IM, Snapper S, Fuhlbrigge R, Geha RS. 2006. WIP and WASP play complementary roles in T cell homing and chemotaxis to SDF-1 $\alpha$ . *International Immunology*, 18(2):221–232.
- Ganten D, Ruckpaul K. 2013. *Immunsystem und Infektiologie*. Springer-Verlag.
- Gerber PA, Hippe A, Buhren BA, Müller A, Homey B. 2009. Chemokines in tumor-associated angiogenesis. *Biological Chemistry*, 390(12).
- Ghosh MC, Baatar D, Collins G, Carter A, Indig F, Biragyn A, Taub DD. 2009. Dexamethasone augments CXCR4-mediated signaling in resting human T cells via the activation of the Src kinase Lck. *Blood*, 113(3):575–584.
- Gisselbrecht C, Gaulard P, Lepage E, Coiffier B, Brière J, Haioun C, Cazals-Hatem D, Bosly A, Xerri L, Tilly H, et al. 1998. Prognostic Significance of T-Cell Phenotype in Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas. *Blood*, 92(1):76–82.
- Gomez TS, McCarney SD, Carrizosa E, Labno CM, Comiskey EO, Nolz JC, Zhu P, Freedman BD, Clark MR, Rawlings DJ, et al. 2006. HS1 Functions as an Essential Actin-Regulatory Adaptor Protein at the Immune Synapse. *Immunity*, 24(6):741–752.
- Groom JR, Luster AD. 2011. CXCR3 in T cell function. *Experimental cell research*, 317(5):620–631.
- Guan X. 2015. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5):402–418.
- ten Hacken E, Scielzo C, Bertilaccio MTS, Scarfò L, Apollonio B, Barbaglio F, Stamatopoulos K, Ponzoni M, Ghia P, Caligaris-Cappio F. 2013. Targeting the LYN/HS1 signaling axis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121(12):2264–2273.
- Haddad E, Zugaza JL, Louache F, Debili N, Crouin C, Schwarz K, Fischer A, Vainchenker W, Bertoglio J. 2001. The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1–induced T-lymphocyte chemotaxis. *Blood*, 97(1):33–38.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5):646–674.
- Hao J-J, Zhu J, Zhou K, Smith N, Zhan X. 2005. The Coiled-coil Domain Is Required for HS1 to Bind to F-actin and Activate Arp2/3 Complex\*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45):37988–37994.
- Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, Nagler A, Lapidot T, Thelen M, Alon R. 2008. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4):1130–1140.

- Hasegawa H, Nomura T, Kohno M, Tateishi N, Suzuki Y, Maeda N, Fujisawa R, Yoshie O, Fujita S. 2000. Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells. *Blood*, 95(1):30–38.
- Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Mürköster SS, Penfold MET, Schall TJ, Mentlein R. 2010. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Research*, 70(8):3299–3308.
- Heinrich PC, Müller M, Graeve L. 2014. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag.
- Holzinger A. 2010. Jasplakinolide: An Actin-Specific Reagent that Promotes Actin Polymerization. In: Gavin RH, Hrsg. *Cytoskeleton Methods and Protocols*. 71–87, Totowa, NJ: Humana Press;
- Hughes CE, Nibbs RJB. 2018. A guide to chemokines and their receptors. *The Febs Journal*, 285(16):2944–2971.
- Huynh C, Dingemanse J, Meyer zu Schwabedissen HE, Sidharta PN. 2020. Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis and its effect in pathophysiological conditions. *Pharmacological Research*, 161:105092.
- Jaffe ES, Krenacs L, Raffeld M. 1997. Classification of T-cell and NK-cell neoplasms based on the REAL classification. *Annals of Oncology*, 8:S17–S24.
- Jain N, Thanabalu T. 2015. Molecular difference between WASP and N-WASP critical for chemotaxis of T-cells towards SDF-1 $\alpha$ . *Scientific Reports*, 5(1):15031.
- Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. 2017. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert review of hematology*, 10(3):239–249.
- Jones D, Hrsg. 2010. *Neoplastic Hematopathology: Experimental and Clinical Approaches*. Humana Press.
- Kakinuma T, Hwang ST. 2006. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(4):639–651.
- Kawaguchi N, Zhang T-T, Nakanishi T. 2019a. Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. *Cells*, 8(2).
- Kawaguchi N, Zhang T-T, Nakanishi T. 2019b. Involvement of CXCR4 in Normal and Abnormal Development. *Cells*, 8(2).
- Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. 2010. CXC Chemokines in Cancer Angiogenesis and Metastases. *Advances in cancer research*, 106:91–111.
- Kitamura D, Kaneko H, Miyagoe Y, Ariyasu T, Watanabe T. 1989. Isolation and

- characterization of a novel human gene expressed specifically in the cells of hematopoietic lineage. *Nucleic Acids Research*, 17(22):9367–9379.
- Klasen C, Ohl K, Sternkopf M, Shachar I, Schmitz C, Heussen N, Hobeika E, Levit-Zerdoun E, Tenbrock K, Reth M, et al. 2014. MIF Promotes B Cell Chemotaxis through the Receptors CXCR4 and CD74 and ZAP-70 Signaling. *The Journal of Immunology*, 192(11):5273–5284.
- Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K, Saiki I. 2007. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Science*, 98(11):1652–1658.
- Kong GH, Bu JY, Kurosaki T, Shaw AS, Chan AC. 1995. Reconstitution of Syk function by the ZAP-70 protein tyrosine kinase. *Immunity*, 2(5):485–492.
- Korbecki J, Grochans S, Gutowska I, Barczak K, Baranowska-Bosiacka I. 2020. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20):7619.
- Kowalski K, Kołodziejczyk A, Sikorska M, Płaczkiewicz J, Cichosz P, Kowalewska M, Stremińska W, Jańczyk-Ilach K, Kobłowska M, Fogtman A, et al. 2017. Stem cells migration during skeletal muscle regeneration - the role of Sdf-1/Cxcr4 and Sdf-1/Cxcr7 axis. *Cell Adhesion & Migration*, 11(4):384–398.
- Kumar R, Tripathi V, Ahmad M, Nath N, Mir RA, Chauhan SS, Luthra K. 2012. CXCR7 mediated  $G_{i\alpha}$  independent activation of ERK and Akt promotes cell survival and chemotaxis in T cells. *Cellular Immunology*, 272(2):230–241.
- Legler DF, Uetz-von Allmen E, Hauser MA. 2014. CCR7: Roles in cancer cell dissemination, migration and metastasis formation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 54:78–82.
- Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. 2015. SDF1 $\alpha$ -induced interaction of the adapter proteins Nck and HS1 facilitates actin polymerization and migration in T cells. *European Journal of Immunology*, 45(2):551–561.
- Levin SE, Zhang C, Kadlec TA, Shokat KM, Weiss A. 2008. Inhibition of ZAP-70 Kinase Activity via an Analog-sensitive Allele Blocks T Cell Receptor and CD28 Superagonist Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(22):15419–15430.
- Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113(24):6085–6093.
- Liang Z, Wu T, Lou H, Yu X, Taichman RS, Lau SK, Nie S, Umbreit J, Shim H. 2004. Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4.

Cancer Research, 64(12):4302–4308.

Liu S-H, Gu Y, Pascual B, Yan Z, Hallin M, Zhang C, Fan C, Wang W, Lam J, Spilker ME, et al. 2017. A novel CXCR4 antagonist IgG1 antibody (PF-06747143) for the treatment of hematologic malignancies. *Blood Advances*, 1(15):1088–1100.

Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, Chaitchik S, Keydar I, Ben-Baruch A. 1999. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Research*, 59(18):4681–4687.

Ma H, Abdul-Hay M. 2017. T-cell lymphomas, a challenging disease: types, treatments, and future. *International Journal of Clinical Oncology*, 22(1):18–51.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600):1912–1934.

Manu KA, Shanmugam MK, Ong TH, Subramaniam A, Siveen KS, Perumal E, Samy RP, Bist P, Lim LHK, Kumar AP, et al. 2013. Emodin Suppresses Migration and Invasion through the Modulation of CXCR4 Expression in an Orthotopic Model of Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS ONE*, 8(3):e57015.

Matsusaka S, Tohyama Y, He J, Shi Y, Hazama R, Kadono T, Kurihara R, Tohyama K, Yamamura H. 2005. Protein-tyrosine kinase, Syk, is required for CXCL12-induced polarization of B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(4):1163–1169.

McCaig AM, Cosimo E, Leach MT, Michie AM. 2012. Dasatinib Inhibits CXCR4 Signaling in Chronic Lymphocytic Leukaemia Cells and Impairs Migration Towards CXCL12. *PLOS ONE*, 7(11):e48929.

Melo R de CC, Longhini AL, Bigarella CL, Baratti MO, Traina F, Favaro P, Campos P de M, Saad STO. 2014. CXCR7 Is Highly Expressed in Acute Lymphoblastic Leukemia and Potentiates CXCR4 Response to CXCL12. *PLOS ONE*, 9(1):e85926.

Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, et al. 2007. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40):15735–15740.

Millard TH, Machesky LM. 2001. The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(3):198–199.

Miller MC, Mayo KH. 2017. Chemokines from a Structural Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10).

Mócsai A, Ruland J, Tybulewicz VLJ. 2010. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in

- diverse biological functions. *Nature reviews. Immunology*, 10(6):387–402.
- Mollica Poeta V, Massara M, Capucetti A, Bonecchi R. 2019. Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10.
- Morton WM, Ayscough KR, McLaughlin PJ. 2000. Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization. *Nature Cell Biology*, 2(6):376–378.
- Mousavi A. 2020. CXCL12/CXCR4 signal transduction in diseases and its molecular approaches in targeted-therapy. *Immunology Letters*, 217:91–115.
- Mukherjee D, Zhao J. 2013. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *American Journal of Cancer Research*, 3(1):46–57.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. 2000. International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 52(1):145–176.
- Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. 2017. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 17(9):559–572.
- Nagasawa T. 2014. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 92(5):433–439.
- Ngoenkam J, Paensuwan P, Wipa P, Schamel WWA, Pongcharoen S. 2021. Wiskott-Aldrich Syndrome Protein: Roles in Signal Transduction in T Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
- Niwa Y, Akamatsu H, Niwa H, Sumi H, Ozaki Y, Abe A. 2001. Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(2):285–289.
- Okabe S, Fukuda S, Broxmeyer HE. 2002. Activation of Wiskott-Aldrich syndrome protein and its association with other proteins by stromal cell–derived factor-1 $\alpha$  is associated with cell migration in a T-lymphocyte line. *Experimental Hematology*, 30(7):761–766.
- Ottoson NC, Pribila JT, Chan ASH, Shimizu Y. 2001. Cutting Edge: T Cell Migration Regulated by CXCR4 Chemokine Receptor Signaling to ZAP-70 Tyrosine Kinase. *The Journal of Immunology*, 167(4):1857–1861.
- Palacios EH, Weiss A. 2004. Function of the Src-family kinases, Lck and Fyn, in T-cell development and activation. *Oncogene*, 23(48):7990–8000.
- Pan Y, Li G, Liu W, Zhang W, Tang Y, Li F. 2009. [Lymphoblastic lymphoma and acute lymphoblastic leukemia: a clinicopathologic, immunophenotypic and prognostic study in 153 Chinese patients]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi = Chinese Journal of Pathology*, 38(12):810–815.

- Pitt LA, Tikhonova AN, Hu H, Trimarchi T, King B, Gong Y, Sanchez-Martin M, Tsirigos A, Littman DR, Ferrando A, et al. 2015. CXCL12-producing vascular endothelial niches control acute T cell leukemia maintenance. *Cancer cell*, 27(6):755–768.
- Qin S, Rottman JB, Myers P, Kassam N, Weinblatt M, Loetscher M, Koch AE, Moser B, Mackay CR. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *Journal of Clinical Investigation*, 101(4):746–754.
- Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. 2011. Chemokines in health and disease. *Experimental cell research*, 317(5):575–589.
- Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, Chen L, Keating MJ, Gribben JG, Neuberg DS, Flinn IW, Rai KR, Byrd JC, et al. 2009. ZAP-70 Compared with Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Mutation Status as a Predictor of Disease Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa040857>.
- Ren Y, Kan YZ, Kong LF. 2018. [Study on the effects of target-silencing CXCR3 expression on malignant proliferation of hepatocellular carcinoma]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi = Zhonghua Ganzangbing Zazhi = Chinese Journal of Hepatology*, 26(7):508–512.
- Romain B, Hachet-Haas M, Rohr S, Brigand C, Galzi J-L, Gaub M-P, Pencreach E, Guenot D. 2014. Hypoxia differentially regulated CXCR4 and CXCR7 signaling in colon cancer. *Molecular Cancer*, 13(1):58.
- Roskoski R. 2015. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 94:9–25.
- Rottner K, Faix J, Bogdan S, Linder S, Kerkhoff E. 2017. Actin assembly mechanisms at a glance. *Journal of Cell Science*, 130(20):3427–3435.
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. 1998. Flexible Programs of Chemokine Receptor Expression on Human Polarized T Helper 1 and 2 Lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(6):875–883.
- Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov IV, Gabikian P, Lesniak MS, Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov IV, Gabikian P, Lesniak MS. 2013. Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget*, 4(12):2171–2185.
- Scielzo C, Ghia P, Conti A, Bachi A, Guida G, Geuna M, Alessio M, Caligaris-Cappio F. 2005. HS1 protein is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia patient subsets with good or poor prognoses. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(6):1644–1650.
- Snapper SB, Rosen FS, Mizoguchi E, Cohen P, Khan W, Liu CH, Hagemann TL, Kwan SP, Ferrini R, Davidson L, et al. 1998. Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a

role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity*, 9(1):81–91.

Snapper SB, Takeshima F, Antón I, Liu C-H, Thomas SM, Nguyen D, Dudley D, Fraser H, Purich D, Lopez-Illasaca M, et al. 2001. N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nature Cell Biology*, 3(10):897–904.

Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online. 2021.

Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Damme JV, Walz A, Marriott D, et al. 1995. The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45):27348–27357.

Swerdlow S, Campo E, Harris NL. 2017. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues: Vol. 2. Revised Edition Revised Edition. Lyon: WORLD HEALTH ORGN.

Swerdlow SH, M. D. Campo E, M. D. Harris NL, M. D. Jaffe ES, Pileri SA. 2008. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues: Vol. 2: International Agency for Research on Cancer. 4. Edition 4. Edition. Lyon: IARC.

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, et al. 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127(20):2375–2390.

Takenawa T, Suetsugu S. 2007. The WASP–WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(1):37–48.

Taketo MM. 2011. Reflections on the Spread of Metastasis to Cancer Prevention. *Cancer Prevention Research*, 4(3):324–328.

Teicher BA, Fricker SP. 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(11):2927–2931.

Thill PA, Weiss A, Chakraborty AK. 2016. Phosphorylation of a Tyrosine Residue on Zap70 by Lck and Its Subsequent Binding via an SH2 Domain May Be a Key Gatekeeper of T Cell Receptor Signaling In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 36(18):2396–2402.

Thompson SB, Waldman MM, Jacobelli J. 2022. Polymerization power: effectors of actin polymerization as regulators of T lymphocyte migration through complex environments. *The FEBS Journal*, 289(20):6154–6171.

Thrasher AJ. 2002. Wasp in immune-system organization and function. *Nature Reviews Immunology*, 2(9):635–646.

Ticchioni M, Charvet C, Noraz N, Lamy L, Steinberg M, Bernard A, Deckert M. 2002. Signaling through ZAP-70 is required for CXCL12-mediated T-cell transendothelial migration. *Blood*, 99(9):3111–3118.

- Tsukishiro S, Suzumori N, Nishikawa H, Arakawa A, Suzumori K. 2006. Elevated serum RANTES levels in patients with ovarian cancer correlate with the extent of the disorder. *Gynecologic Oncology*, 102(3):542–545.
- Uruno T, Zhang P, Liu J, Hao J-J, Zhan X. 2003. Haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) promotes actin-related protein (Arp) 2/3 complex-mediated actin polymerization. *The Biochemical Journal*, 371(Pt 2):485–493.
- Uy GL, Rettig MP, Motabi IH, McFarland K, Trinkaus KM, Hladnik LM, Kulkarni S, Abboud CN, Cashen AF, Stockerl-Goldstein KE, et al. 2012. A phase 1/2 study of chemosensitization with the CXCR4 antagonist plerixafor in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Blood*, 119(17):3917–3924.
- Vicente-Manzanares M, Vitón M, Sánchez-Madrid F. 2003. Measurement of the Levels of Polymerized Actin (F-Actin) in Chemokine-Stimulated Lymphocytes and GFP-Coupled cDNA Transfected Lymphoid Cells by Flow Cytometry. In: D'Ambrosio D, Sinigaglia F, Hrsg. *Cell Migration in Inflammation and Immunity: Methods and Protocols*. 53–68, Totowa, NJ: Humana Press;
- Vose J, Armitage J, Weisenburger D, International T-Cell Lymphoma Project. 2008. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(25):4124–4130.
- Wang H, Kadlecsek T, Au-Yeung B, Goodfellow H, Hsu L-Y, Freedman T, Weiss A. 2010. ZAP-70: an essential Kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2:a002279.
- Weston L, Coutts AS, La Thangue NB. 2012. Actin nucleators in the nucleus: an emerging theme. *Journal of Cell Science*, 125(15):3519–3527.
- Xu C, Zhao H, Chen H, Yao Q. 2015. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. *Drug Design, Development and Therapy*, 9:4953–4964.
- Xu L, Li C, Hua F, Liu X. 2021. The CXCL12/CXCR7 signalling axis promotes proliferation and metastasis in cervical cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 38(5):58.
- Yang J, Tang H, Huang J, An H. 2018. Upregulation of CXCR7 Is Associated with Poor Prognosis of Prostate Cancer. *Medical Science Monitor*, 24:5185–5191.
- Youn B-S, Kim YJ, Mantel C, Yu K-Y, Broxmeyer HE. 2001. Blocking of c-FLIPL-independent cycloheximide-induced apoptosis or Fas-mediated apoptosis by the CC chemokine receptor 9/TECK interaction. *Blood*, 98(4):925–933.
- Zabel BA, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts AI, Ebert EC, Kassam N,

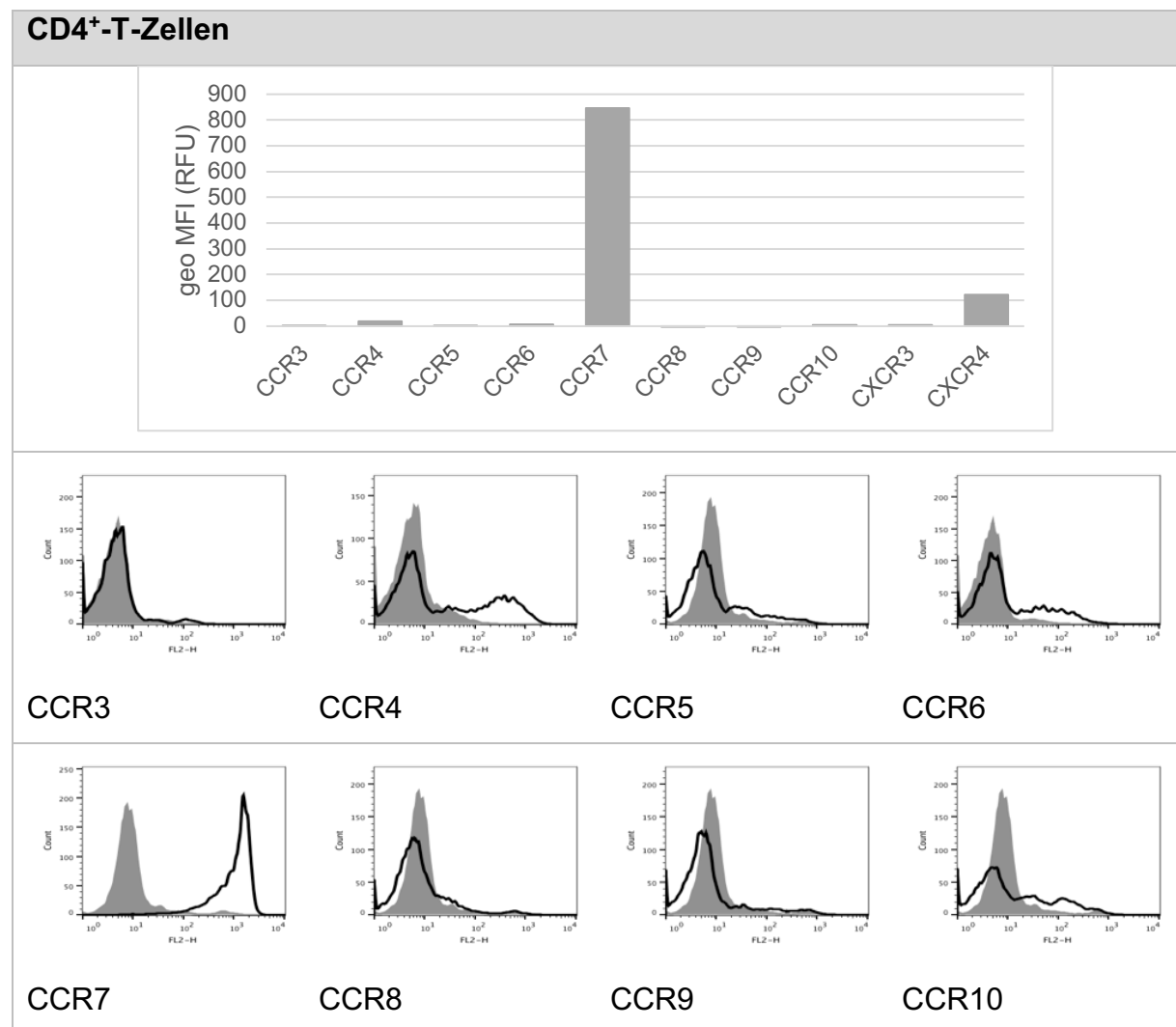
- Qin S, Zovko M, et al. 1999. Human G Protein–Coupled Receptor Gpr-9-6/Cc Chemokine Receptor 9 Is Selectively Expressed on Intestinal Homing T Lymphocytes, Mucosal Lymphocytes, and Thymocytes and Is Required for Thymus-Expressed Chemokine–Mediated Chemotaxis. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(9):1241–1256.
- Zhang J, Shehabeldin A, da Cruz LA, Butler J, Somani AK, McGavin M, Kozieradzki I, dos Santos AO, Nagy A, Grinstein S, et al. 1999. Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(9):1329–1342.
- Zhang X, Simerly C, Hartnett C, Schatten G, Smithgall TE. 2014. Src-family Tyrosine Kinase Activities are Essential for Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem cell research*, 13(0):379–389.
- Zhang Y, Saavedra E, Tang R, Gu Y, Lappin P, Trajkovic D, Liu S-H, Smeal T, Fantin V, De Botton S, et al. 2017. Targeting primary acute myeloid leukemia with a new CXCR4 antagonist IgG1 antibody (PF-06747143). *Scientific Reports*, 7(1):7305.
- Ziegler E, Oberbarnscheidt M, Bulfone-Paus S, Förster R, Kunzendorf U, Krautwald S. 2007. CCR7 Signaling Inhibits T Cell Proliferation. *The Journal of Immunology*, 179(10):6485–6493.
- Zlotnik A, Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2):121–127.

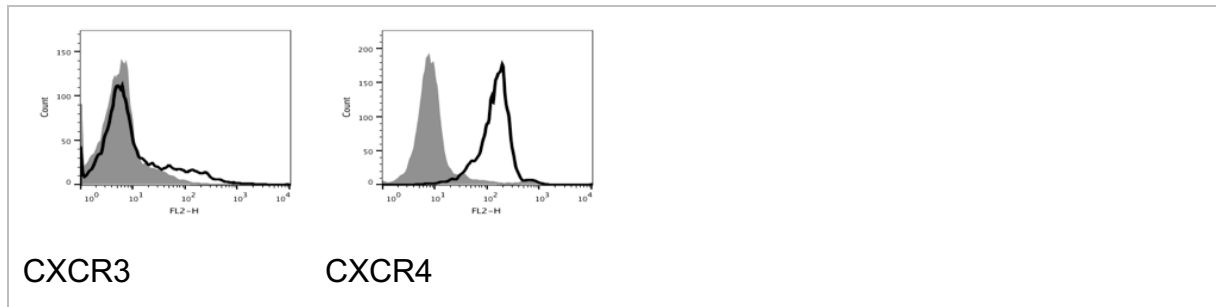
•

## 8 Anhang

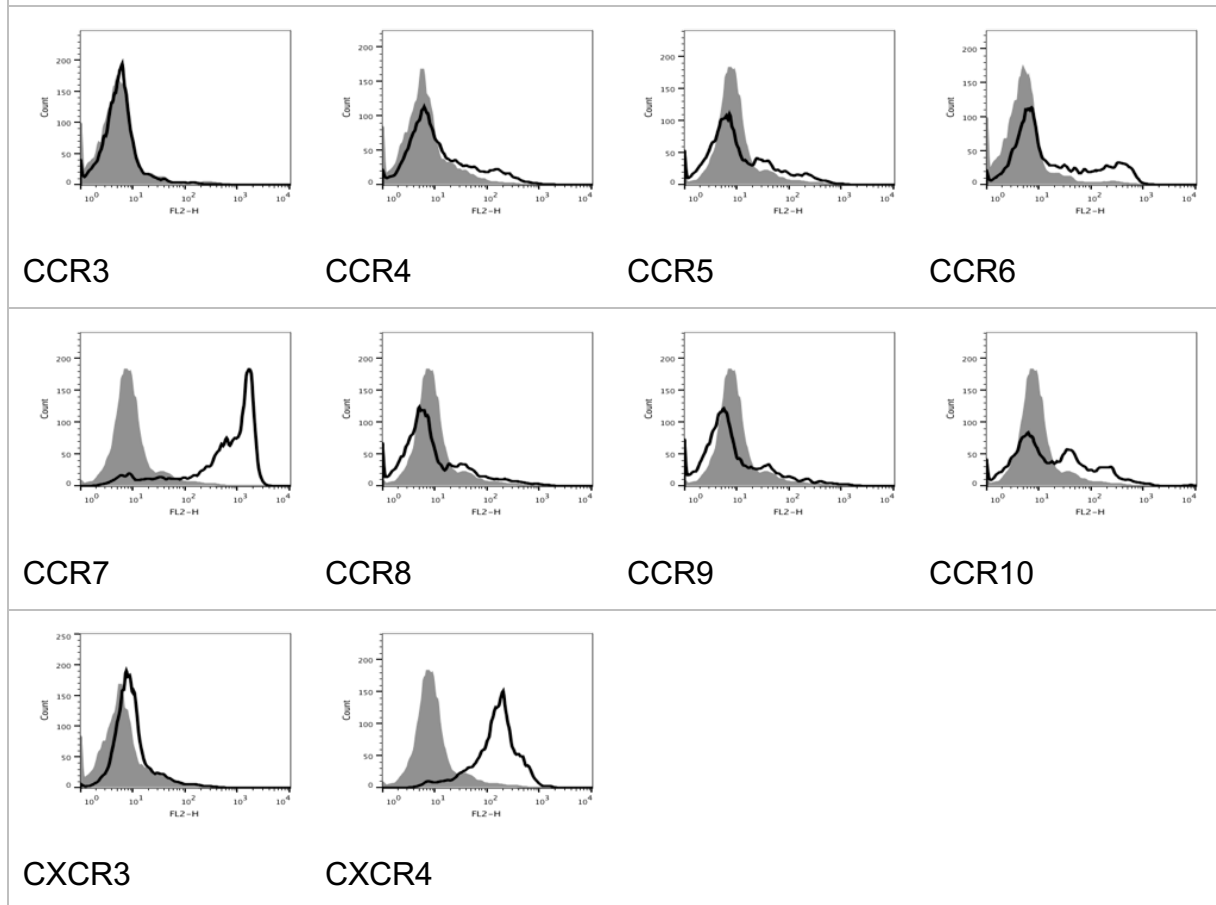
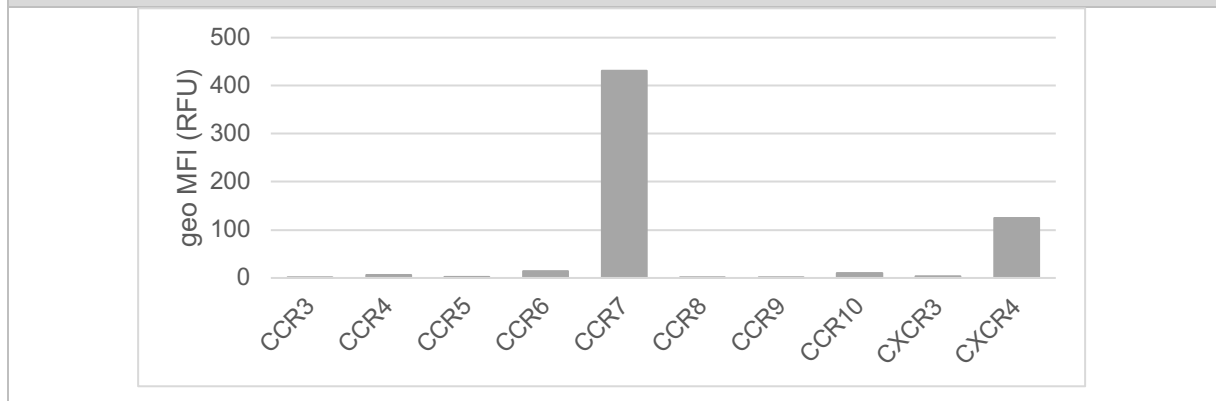
### 8.1 Chemokinrezeptor-Expression der gesunden und neoplastischen T-Zellen

Für die durchflusszytometrische Expressionsanalyse der Chemokinrezeptoren wurden jeweils 250.000 Zellen fixiert und mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen den entsprechenden Rezeptor oder einer entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt. Nachfolgend wurden 10.000 Zellen pro Probe durchflusszytometrisch aufgenommen und der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität mit der korrespondierenden Isotyp-Kontrolle (in grau dargestellt) quantifiziert.

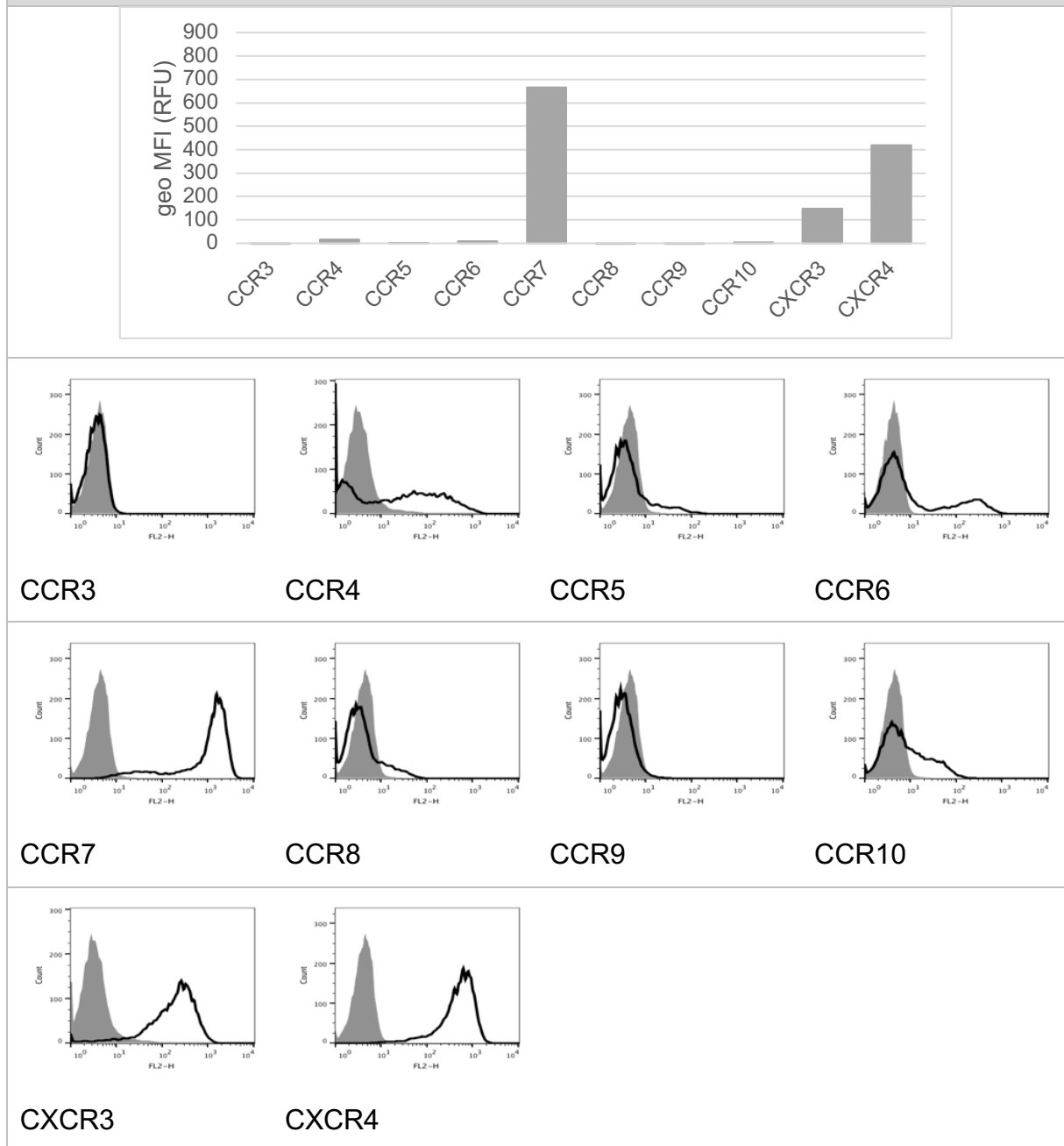




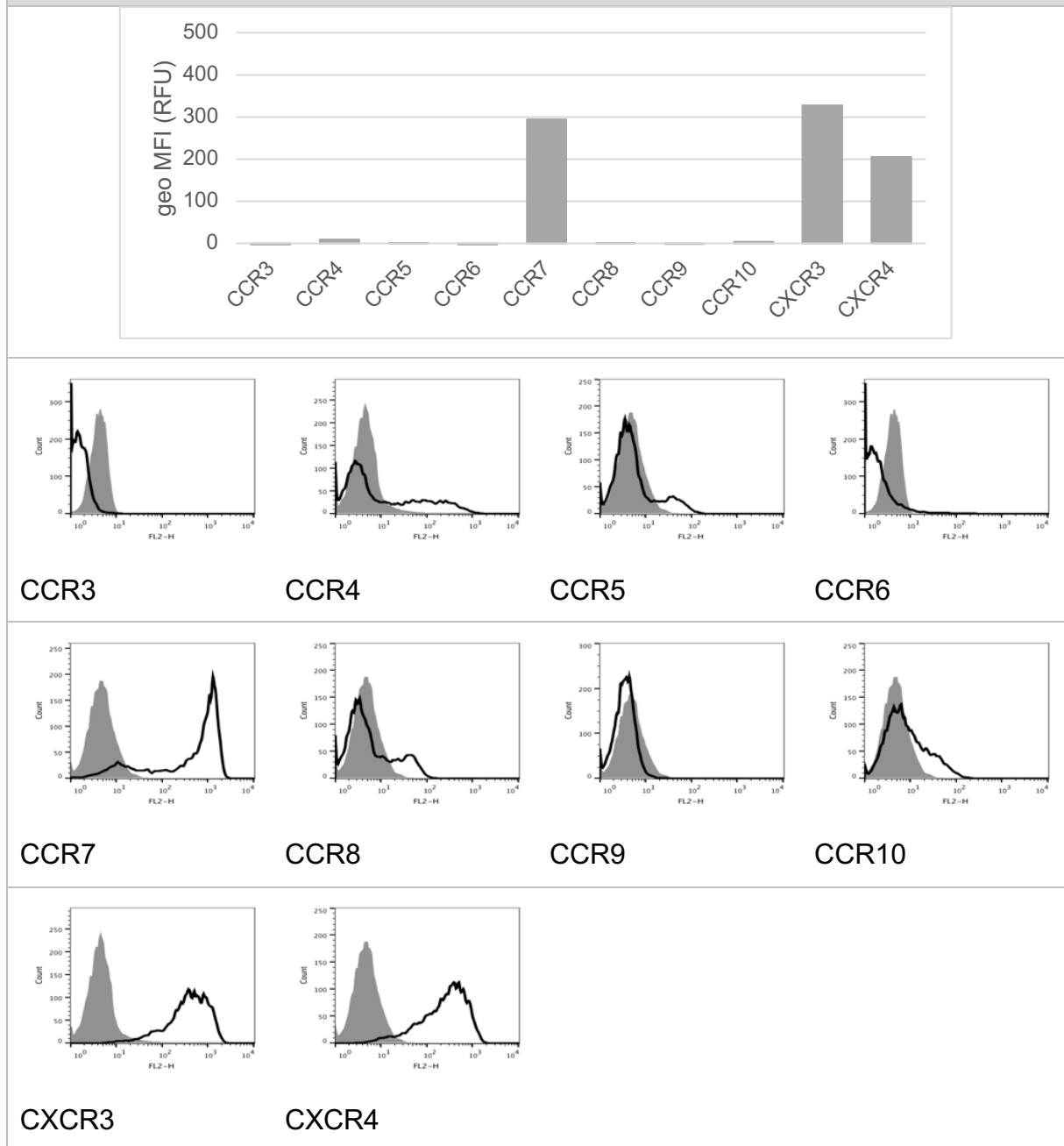
### CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

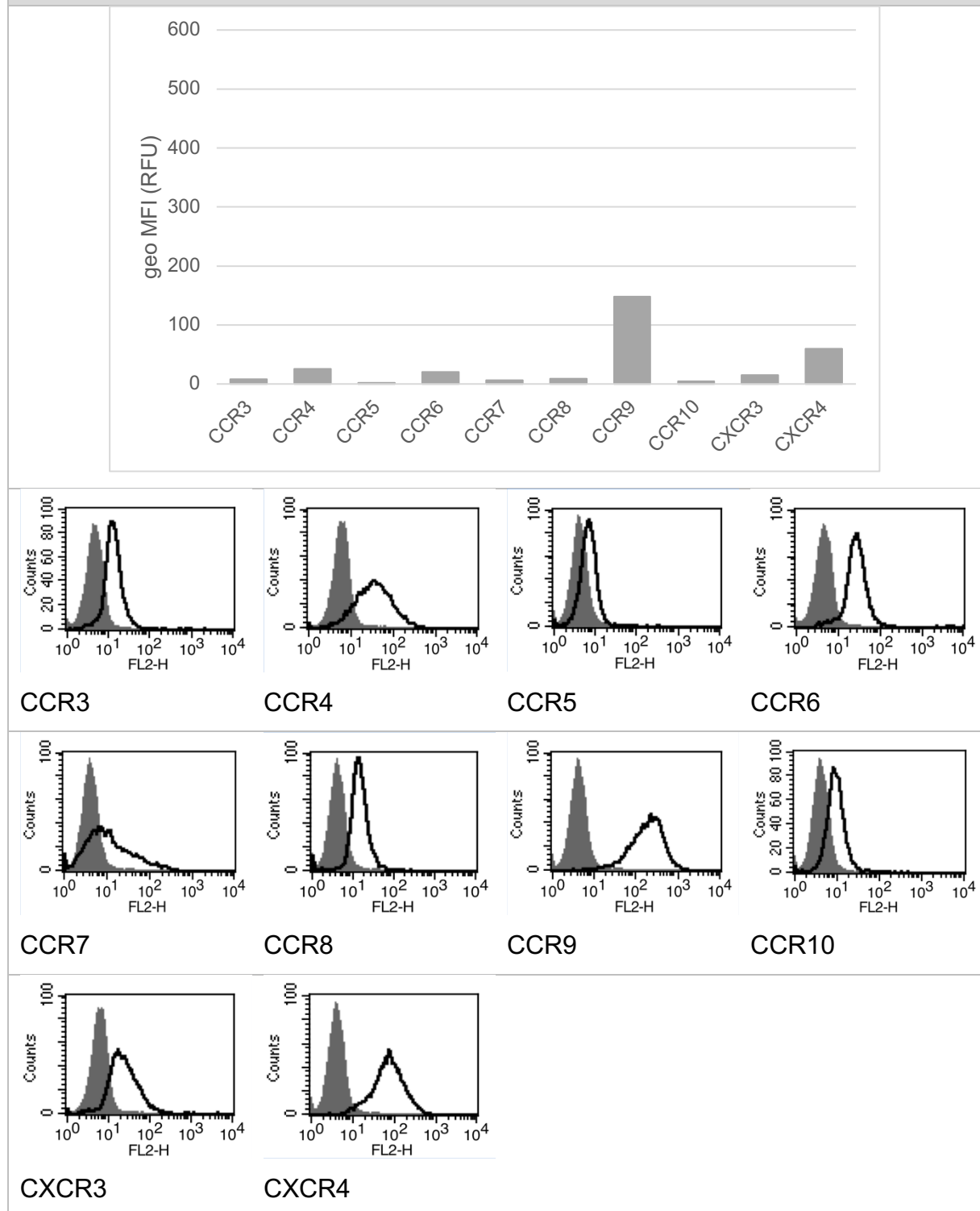


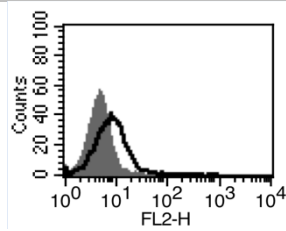
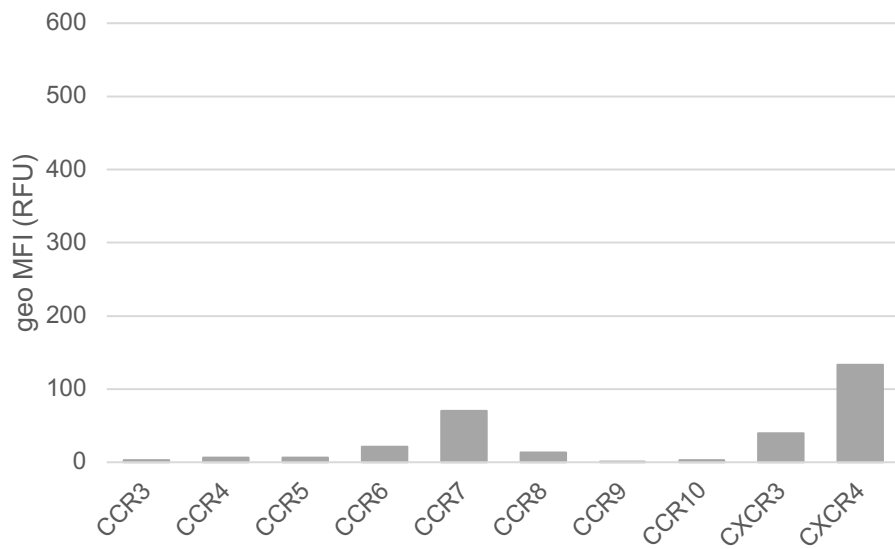
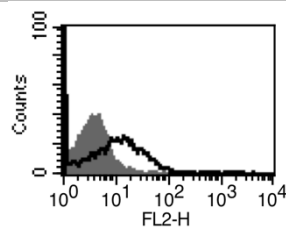
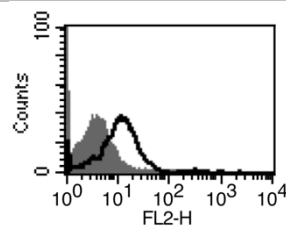
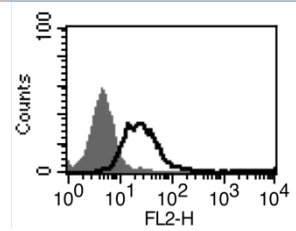
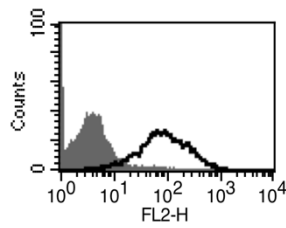
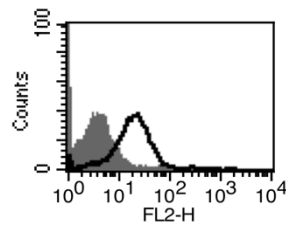
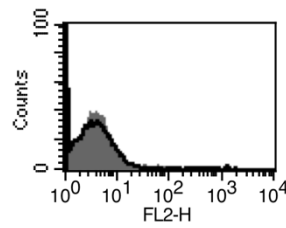
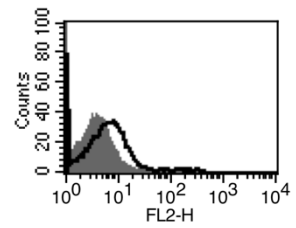
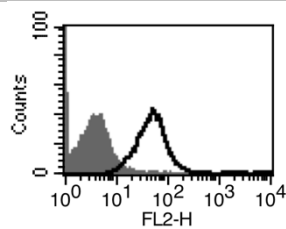
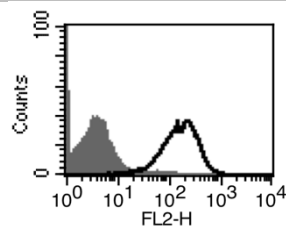
**aktivierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen**

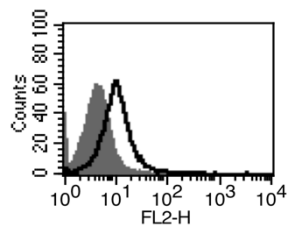
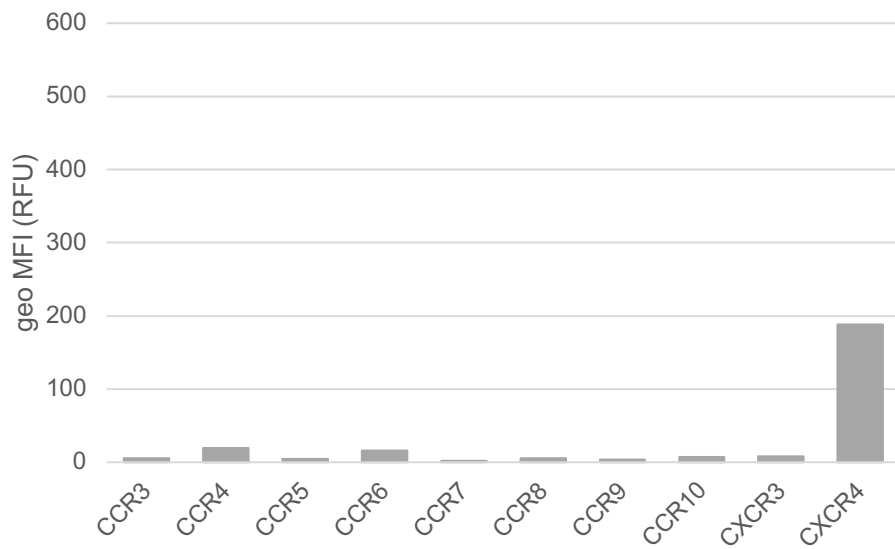


**aktivierte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen**

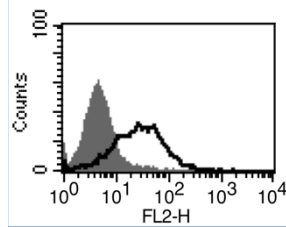


**H9**

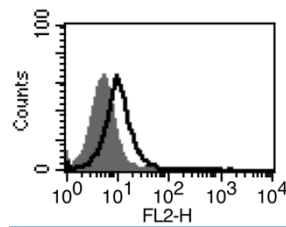
**HUT78****CCR3****CCR4****CCR5****CCR6****CCR7****CCR8****CCR9****CCR10****CXCR3****CXCR4**

**J16Rapo**

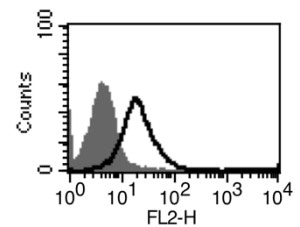
CCR3



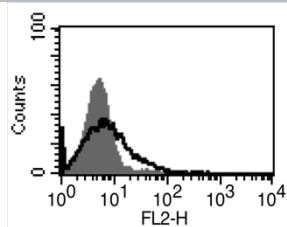
CCR4



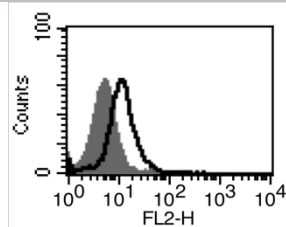
CCR5



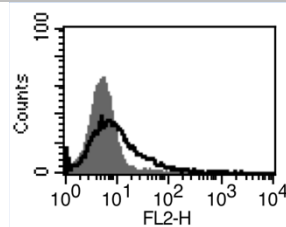
CCR6



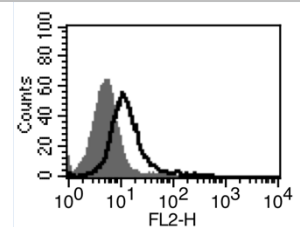
CCR7



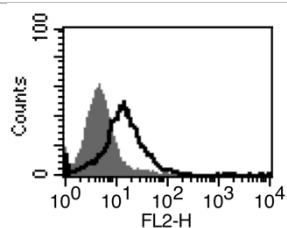
CCR8



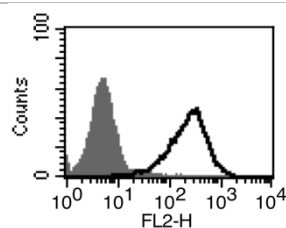
CCR9



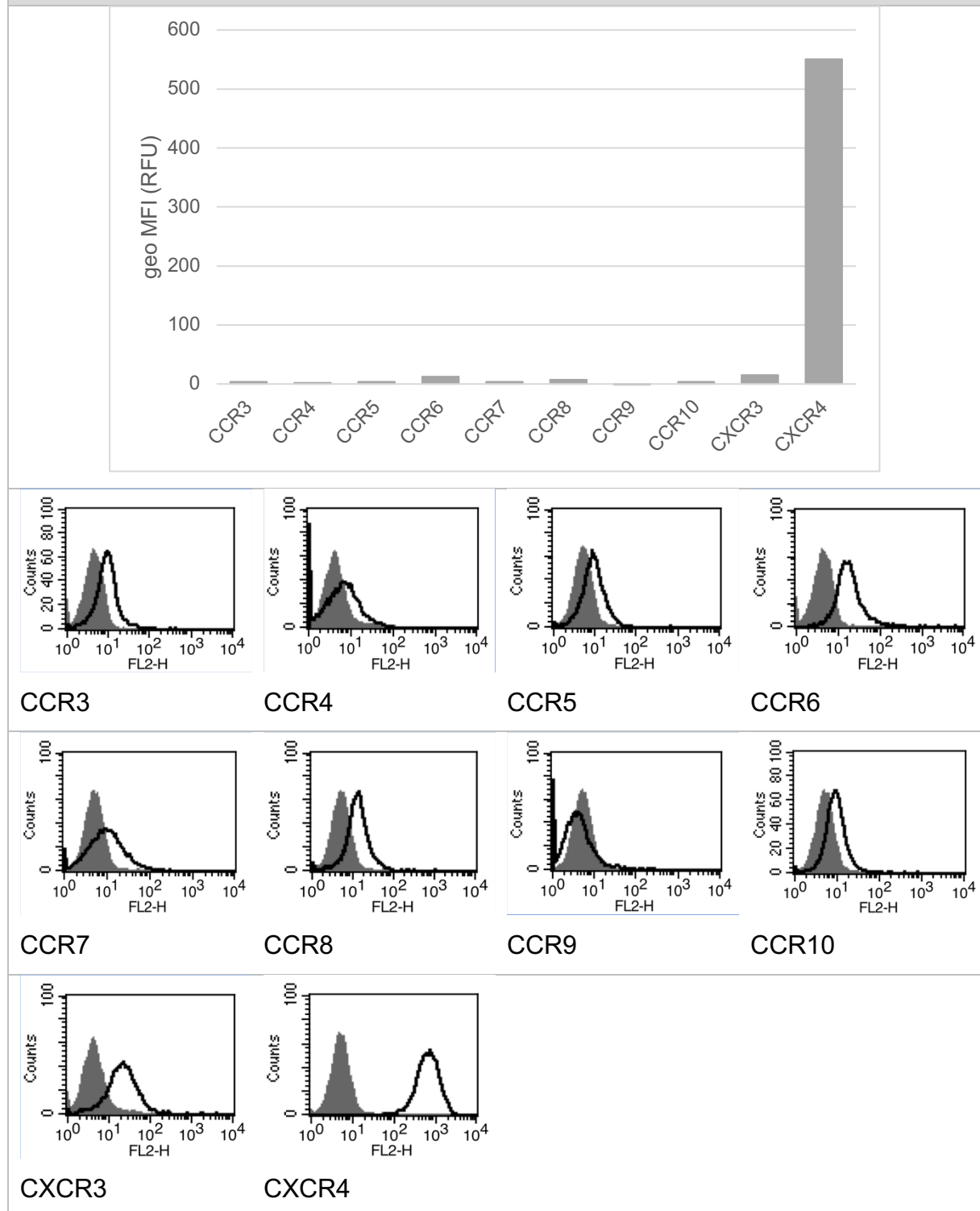
CCR10

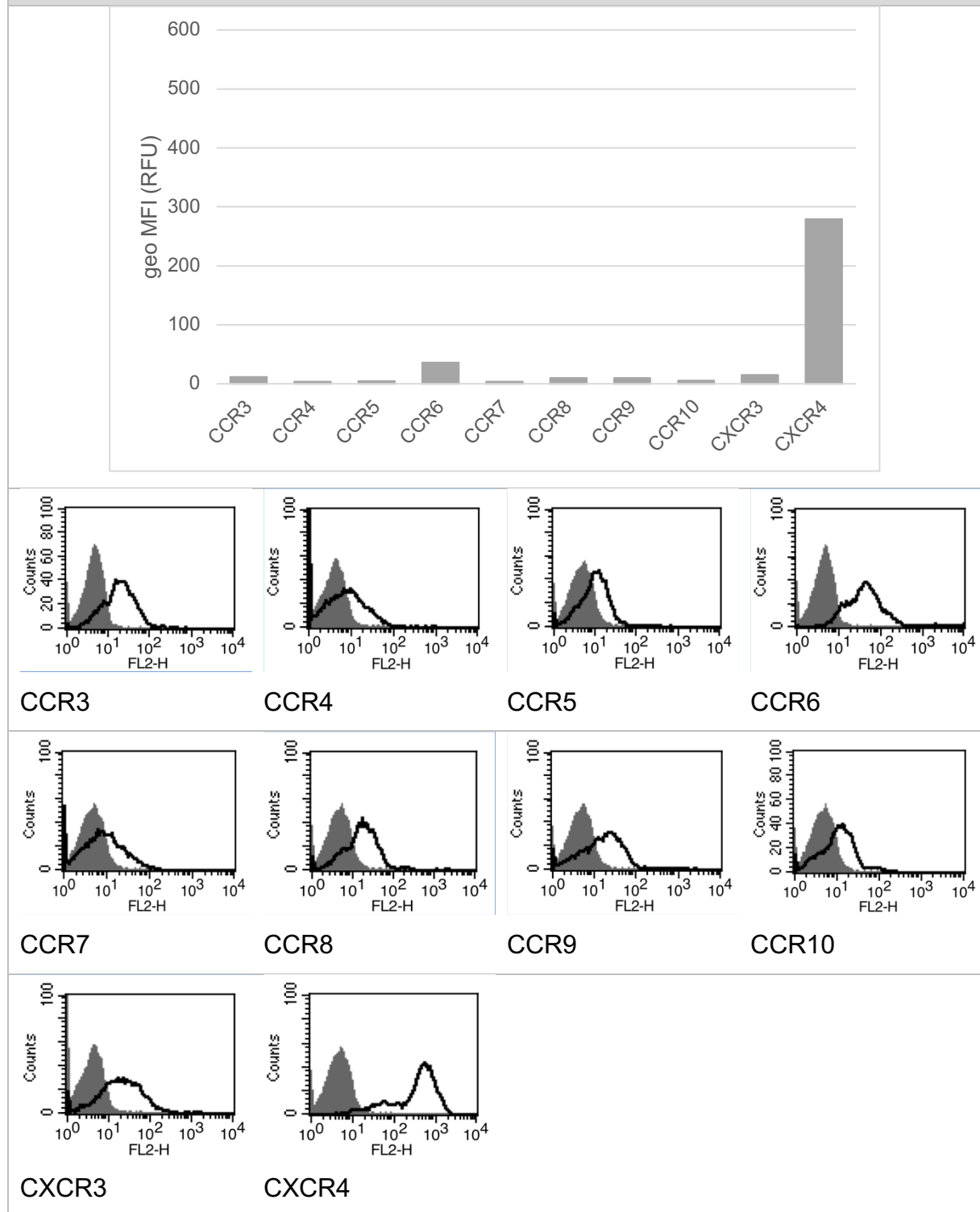


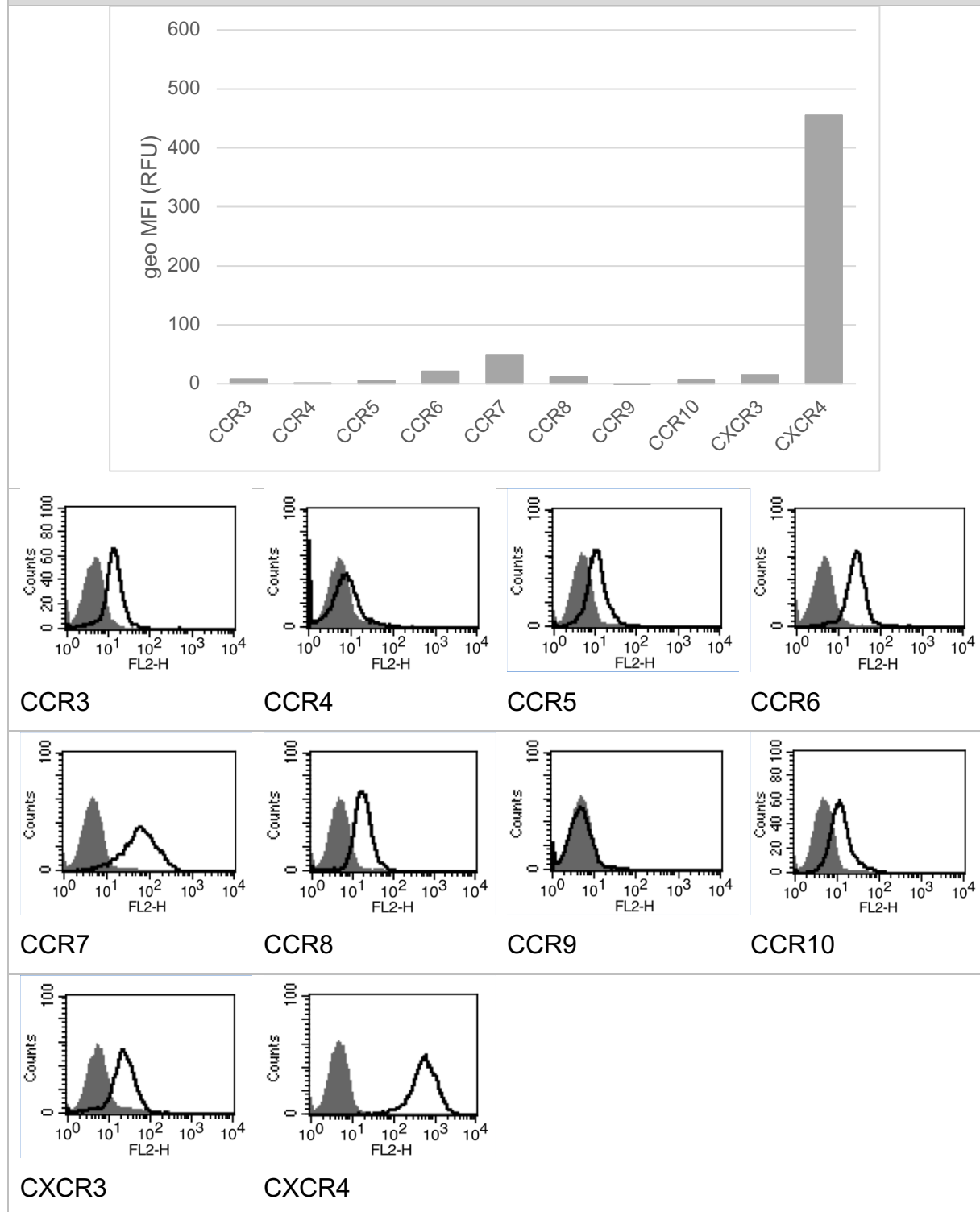
CXCR3

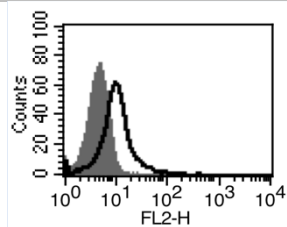
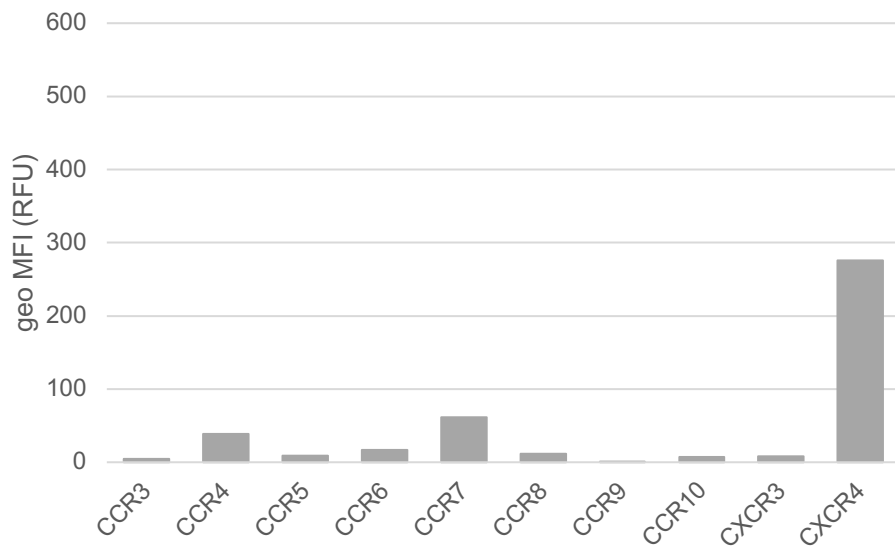


CXCR4

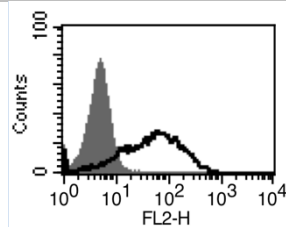
**Je6.1**

**JFL39.1**

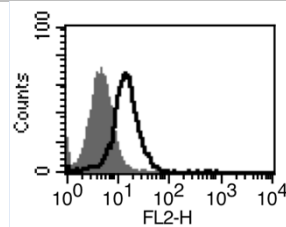
**Ke37**

**MKB1**

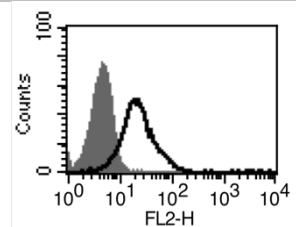
CCR3



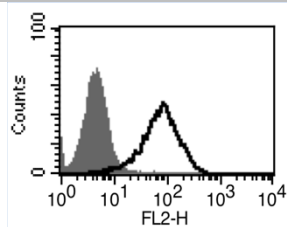
CCR4



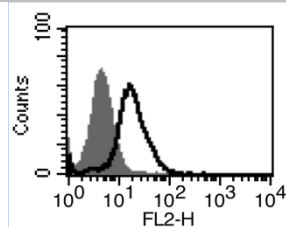
CCR5



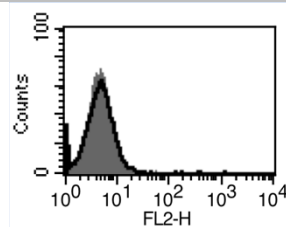
CCR6



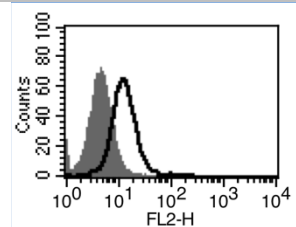
CCR7



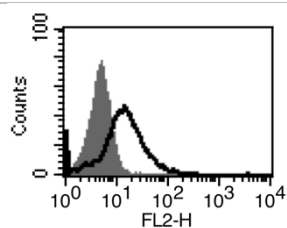
CCR8



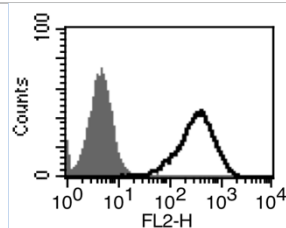
CCR9



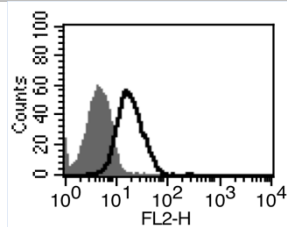
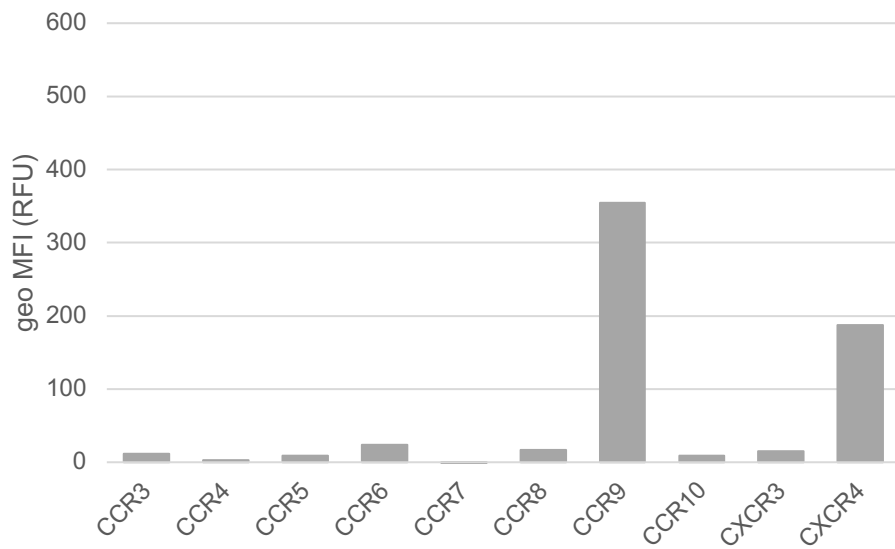
CCR10



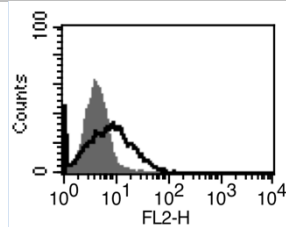
CXCR3



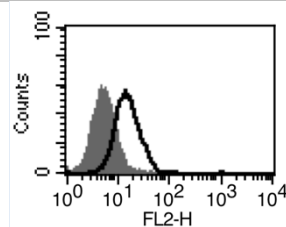
CXCR4

**Molt-4**

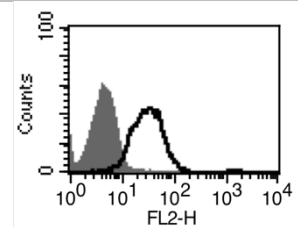
CCR3



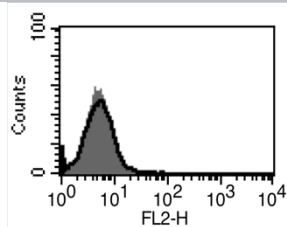
CCR4



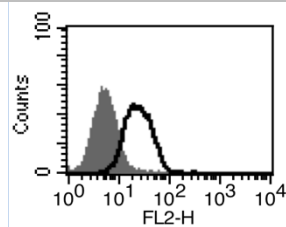
CCR5



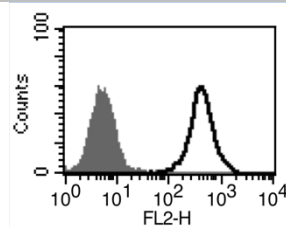
CCR6



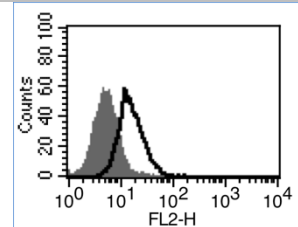
CCR7



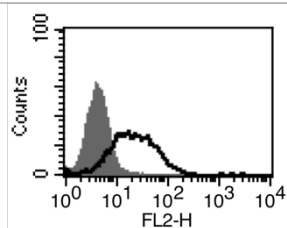
CCR8



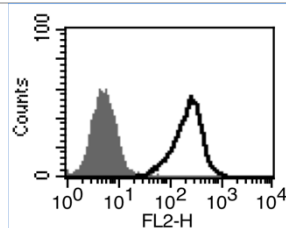
CCR9



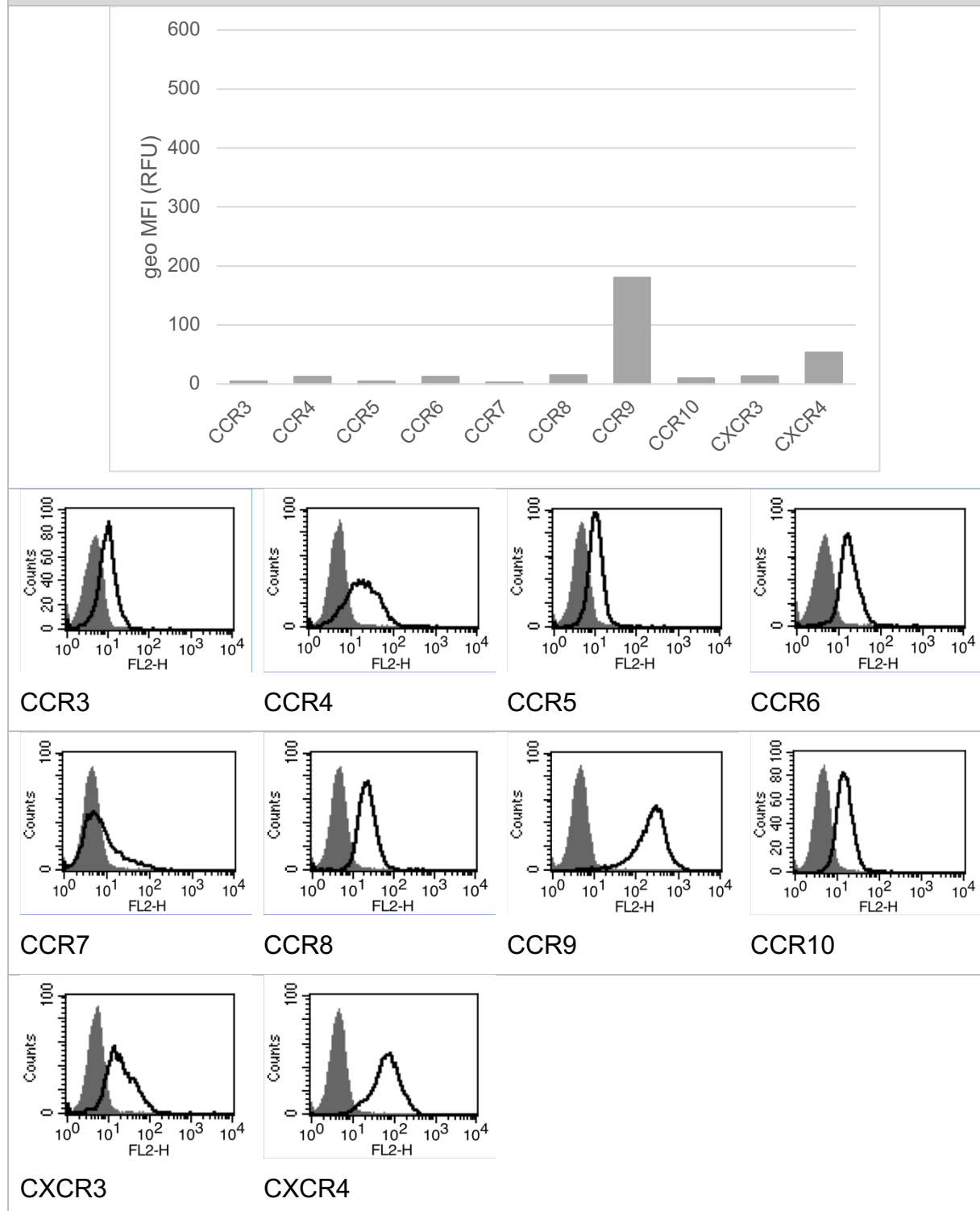
CCR10

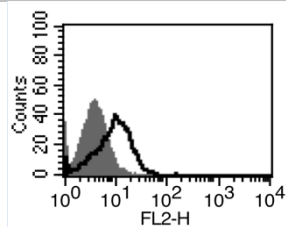
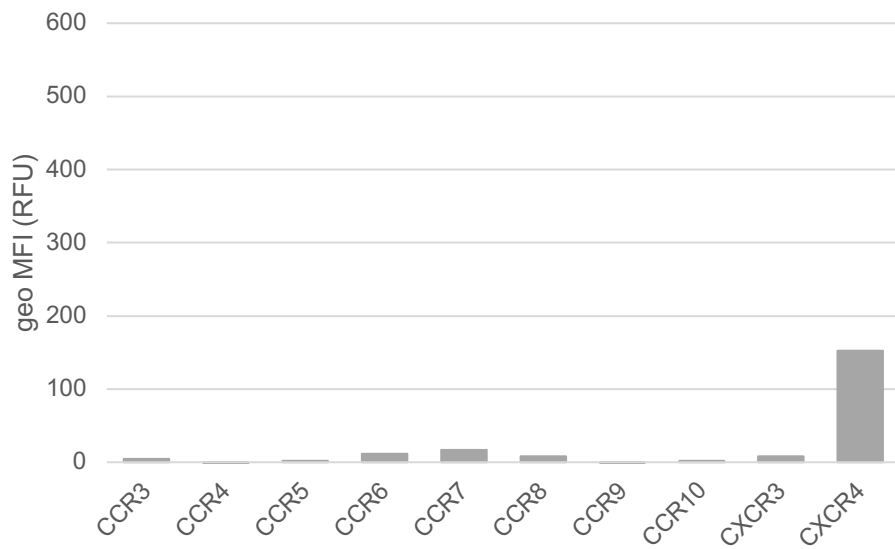


CXCR3

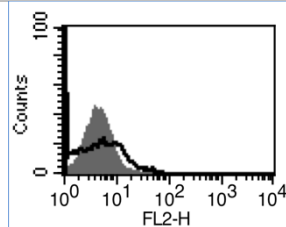


CXCR4

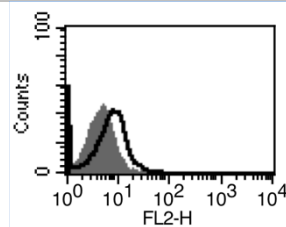
**Molt-13**

**Molt-17**

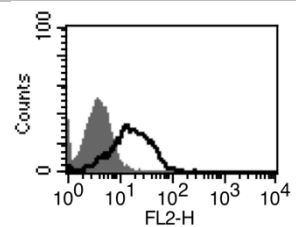
CCR3



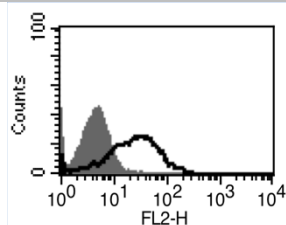
CCR4



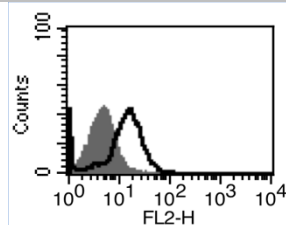
CCR5



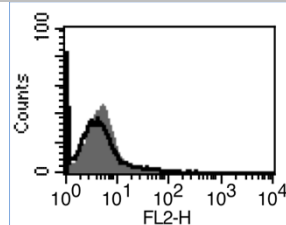
CCR6



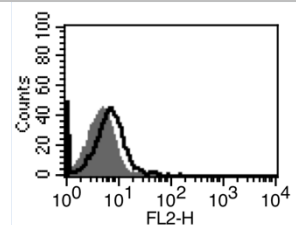
CCR7



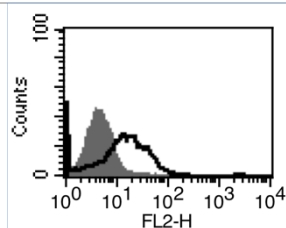
CCR8



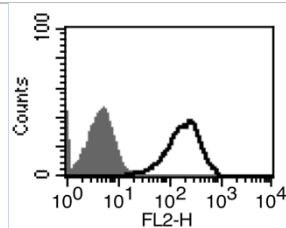
CCR9



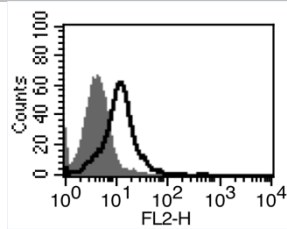
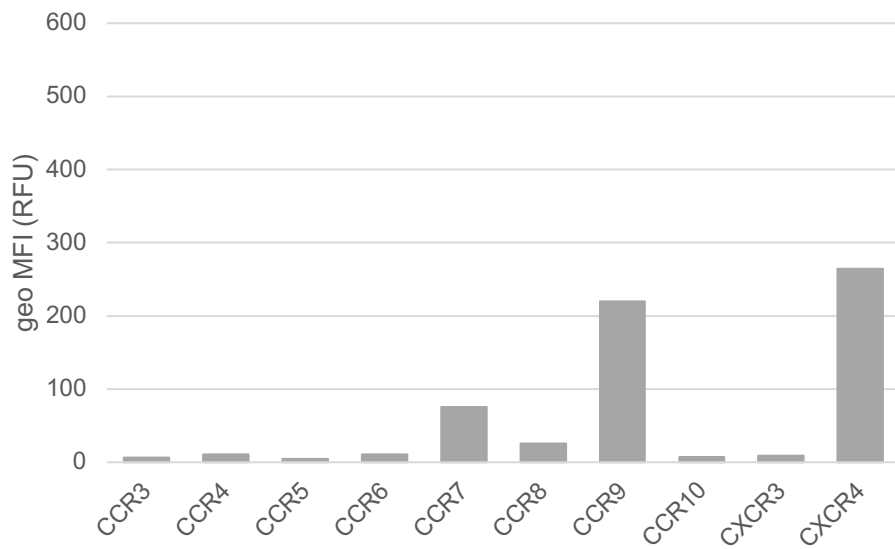
CCR10



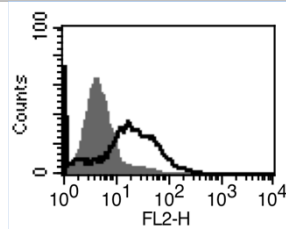
CXCR3



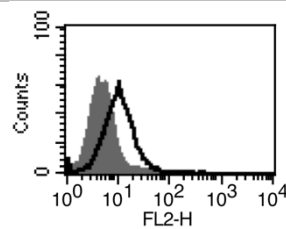
CXCR4

**P12**

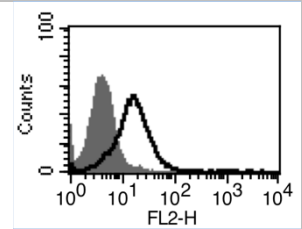
CCR3



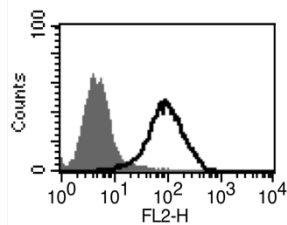
CCR4



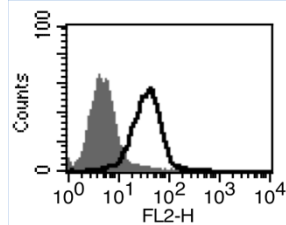
CCR5



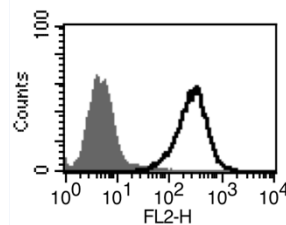
CCR6



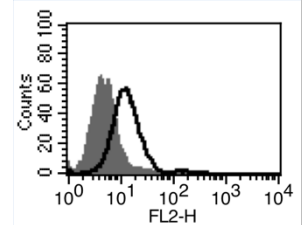
CCR7



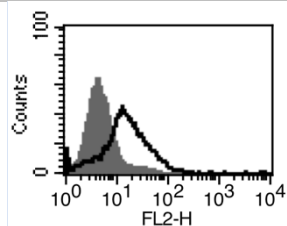
CCR8



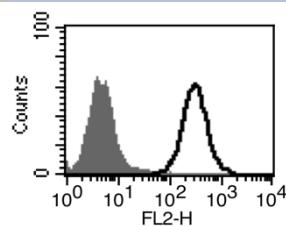
CCR9



CCR10

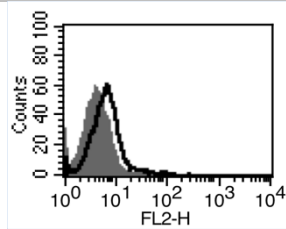
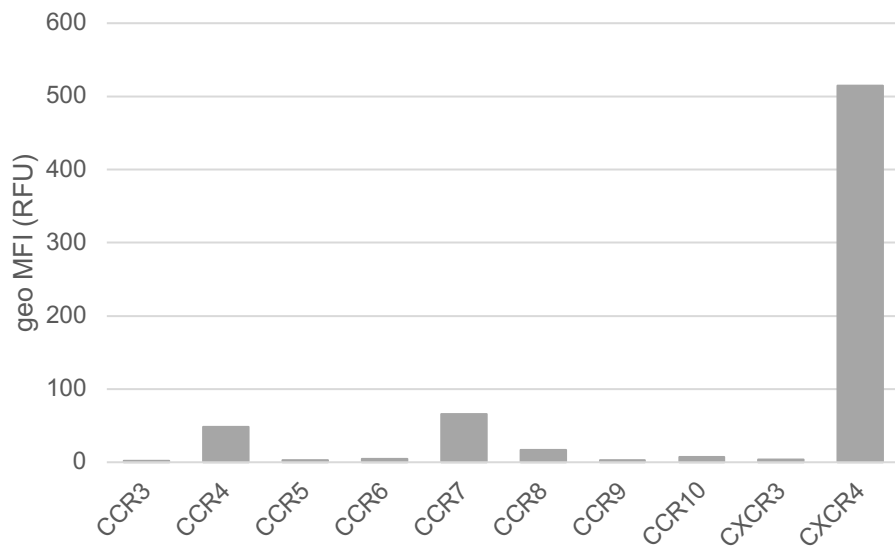


CXCR3

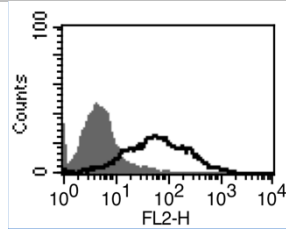


CXCR4

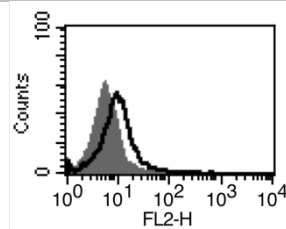
## Peer



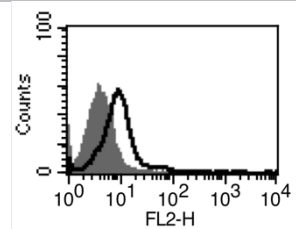
CCR3



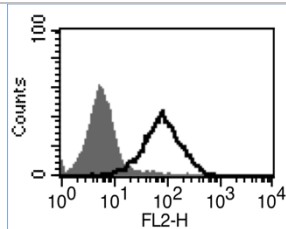
CCR4



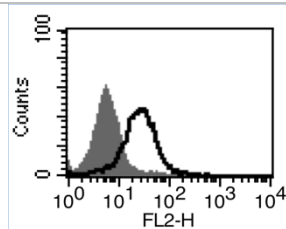
CCR5



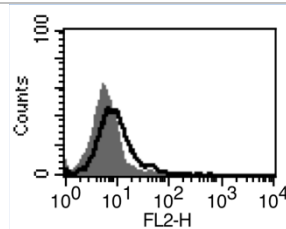
CCR6



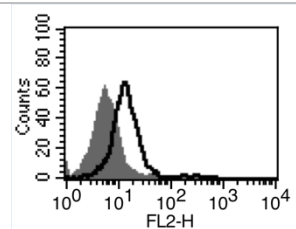
CCR7



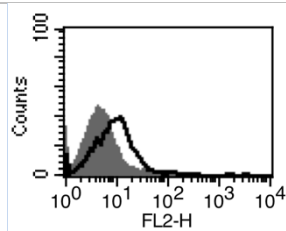
CCR8



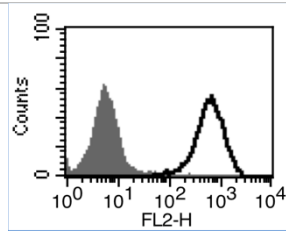
CCR9



CCR10



CXCR3



CXCR4

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei verschiedenen Personen bedanken, die zum Gelingen dieses Projektes maßgeblich beigetragen haben:

Mein außerordentlicher Dank gilt der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die finanzielle und ideelle Unterstützung durch ein Promotionsstipendium.

Mein aufrichtiger Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz und Herrn Prof. Dr. Alexander Scheffold für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit am Institut für Immunologie durchzuführen.

Ein großer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ottmar Janßen und meinem Betreuer Herrn PD Dr. Marcus Lettau. Ihre umfassende Unterstützung, ihre Geduld und ihr immenses Wissen haben mich während der Forschungszeit persönlich und fachlich wachsen lassen. Herrn Prof. Dr. Ottmar Janßen danke ich herzlich auch für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Bei Herrn PD Dr. Marcus Lettau bedanke ich mich besonders für die sorgfältige Betreuung und die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des immunologischen Instituts Kiel, deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft meine Forschungszeit bereichert und erleichtert haben. Ein spezielles Dankeschön geht hier insbesondere an Signe Valentin, Ina Martens und Doreen Gänsler, die mir in allen Belangen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die tiefe Verbundenheit, das unerschöpfliche Vertrauen und die immerwährende Unterstützung in sämtlichen Lebenssituationen

Vielen herzlichen Dank!