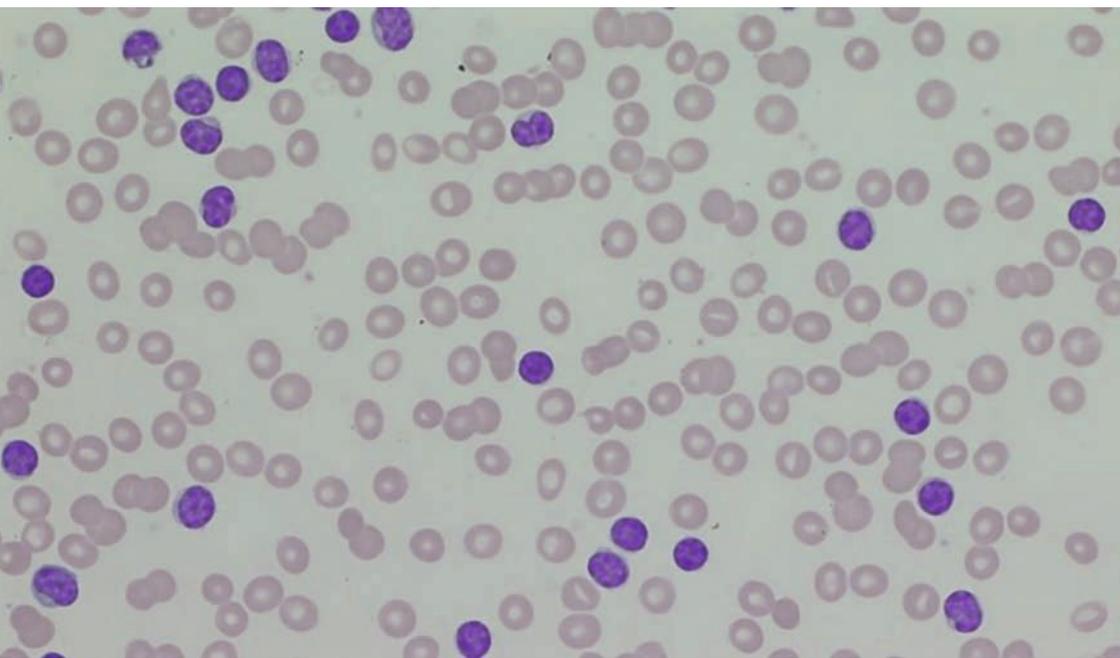


Die Rolle des atypischen Chemokinrezeptors CRAM bei der Chronischen lymphatischen Leukämie

NATHALIE MARIA BURGER



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz
und
der Medizinischen Universitätsklinik,
Abteilung Hämatologie/Onkologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
Betreuerin: PD Dr. Meike Burger

Die Rolle des atypischen Chemokinrezeptors CRAM bei der Chronischen lymphatischen Leukämie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Nathalie Maria Burger

Tierärztin aus Ettenheim

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Moritz
PD Dr. Meike Burger

Tag der Disputation: 21.12.2012

**Nil tam difficile est,
quid quaerendo investigari non possit.**

Nichts ist so schwierig, als dass es nicht
durch Nachforschen herausgefunden
werden könnte.

Terenz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Chemokine	4
2.1.1 Klassifikation und Struktur.....	4
2.1.2 Funktion	6
2.2 Chemokinrezeptoren.....	7
2.2.1 Klassifikation und Struktur.....	8
2.2.2 Signalwege.....	10
2.2.2.1 Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen.....	12
2.2.2.2 Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges	13
2.3 Atypische Chemokinrezeptoren	14
2.3.1 CRAM	16
2.4 Chronische lymphatische Leukämie.....	18
2.4.1 Epidemiologie.....	19
2.4.2 Ätiologie	19
2.4.3 Diagnostik	19
2.4.4 Klassifikation	20
2.4.5 Klinischer Verlauf	21
2.4.6 Prognostische Faktoren	22
2.4.7 Therapie.....	23
2.5 Chronische lymphatische Leukämie des Hundes.....	24
2.5.1 Epidemiologie.....	26

2.5.2	Diagnostik	26
2.5.3	Klinischer Verlauf	27
2.5.4	Prognose.....	27
2.5.5	Therapie.....	28
3	Zielsetzung der Arbeit	29
4	Material und Methoden	31
4.1	Material	32
4.1.1	Geräte	32
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	33
4.1.3	Chemikalien	34
4.1.4	Antikörper.....	35
4.1.5	Chemokine	36
4.1.6	Untersuchungsmaterial	37
4.1.7	Software.....	37
4.1.8	Puffer und Medien.....	37
4.2	Methoden	40
4.2.1	Zellen	40
4.2.1.1	Untersuchungsmaterial	40
4.2.1.2	Zellgewinnung.....	40
4.2.1.3	Zellkultivierung	41
4.2.1.4	Zellzählung.....	42
4.2.2	Durchflusszytometrie.....	42
4.2.2.1	Oberflächenexpression	42
4.2.2.2	Apoptose-Assay	43
4.2.2.3	Zellzyklus-Assay	43
4.2.3	Chemotaxis-Assay	44

4.2.4	Pseudoemperipolese (PEP).....	44
4.2.5	Biochemische Methoden.....	46
4.2.5.1	Herstellen von Proteinlysaten	46
4.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	46
4.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
4.2.5.4	Western Blot	47
5	Ergebnisse.....	48
5.1	Patientenkollektiv	49
5.2	CRAM- und CCR7-Oberflächenexpression.....	50
5.3	Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21	53
5.3.1	Chemotaxis nach Rezeptorinhibition.....	56
5.4	Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3	57
5.4.1	Phosphorylierung von ERK1/2	58
5.4.2	Phosphorylierung von STAT3	59
5.5	Pseudoemperipolese.....	61
5.6	Apoptose-Assay	62
5.7	Zellzyklus-Assay.....	64
6	Diskussion	66
6.1	Erhöhte Rezeptorexpression auf CLL-Patientenzellen.....	67
6.2	Vergleich: Rezeptorexpression mit prognostischen Faktoren	68
6.3	Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21	70
6.4	Vergleich: Migrationsverhalten mit prognostischen Faktoren	71
6.5	Phosphorylierung von ERK1/2	72
6.6	Phosphorylierung von STAT3	73
6.7	CRAM fördert die Adhäsion von CLL-Patientenzellen an Stromazellen.....	74
6.8	Apoptose-Assay	75

6.9	Zellzyklus-Assay.....	75
6.10	Übertragbarkeit auf die CLL des Hundes	76
7	Zusammenfassung	78
8	Summary.....	80
9	Literaturverzeichnis.....	82
10	Anhang.....	99

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Differenzierungsantigen (cluster of differentiation)
CI	Chemotaktischer Index
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
DAG	Diacylglycerol
DiOC6	3,3'-Dihexyloxacarbocyanin-Jodid
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	at alii (und weitere)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Rinderserum (fetal calf serum)
GAG	Glykosaminoglykan
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (Hank's Balanced Salt Solution)
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-triphosphat
Jak	Januskinase
kDa	Kilodalton
MACS	magnetische Zellseparation (magnetic cell separation)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK Kinase
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mM	Millimolar
n	Anzahl
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBMC	periphere mononukleäre Zellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PEP	Pseudoemperipolese
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium lauryl sulphate)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
STAT	Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription (Signal transducers and activators of transcription)
TAD	Transkriptionsaktivierungsdomäne
TEM	Transendotheliale Migration
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZAP-70	Zeta-assoziiertes Protein, Molekulargewicht 70 kD

1 Einleitung

1 Einleitung

Bei der Chronischen lymphatischen Leukämie handelt es sich, sowohl beim Mensch als auch beim Hund, um eine hämatopoetische Neoplasie mit einer hohen Inzidenz. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten reifer, jedoch immunologisch inkompetenter B-Lymphozyten im Blut und deren Wanderung in sekundäre lymphatische Organe. Dadurch können im Verlauf der Erkrankung Lymphadenopathien, Spleno- und Hepatomegalien entstehen.

An der Zellmigration sind in besonderem Maße Chemokinrezeptoren und ihre Liganden, die Chemokine, beteiligt. Unter anderem spielt der klassische Chemokinrezeptor CCR7 bei der Chemotaxis eine große Rolle. Der Einfluss des erst kürzlich charakterisierten atypischen Chemokinrezeptors CRAM auf CCR7-induzierte Antworten war Thema dieser Arbeit. Dabei wurden die Versuche mit B-Lymphozyten von humanen CLL-Patienten durchgeführt.

In der Literaturübersicht werden zunächst der theoretische Hintergrund und bereits beschriebene Erkenntnisse zu den Themen Chemokine und Chemokinrezeptoren sowie zur Chronischen lymphatischen Leukämie des Menschen und des Hundes näher erläutert. Im darauf folgenden Abschnitt werden verwendete Materialien und Methoden aufgeführt, bevor eigene Ergebnisse dargestellt und mit bereits publizierter Literatur diskutiert werden.

2 Literaturübersicht

2 Literaturübersicht

2.1 Chemokine

Die Geschichte der Zytokine geht bis ins 19. Jahrhundert zurück. Bereits 1893 stellte Metchnikoff die Vermutung auf, dass die Produktion von chemischen Stoffen für die gerichtete Migration von Phagozyten in ein Entzündungsgebiet notwendig ist (Metchnikoff, 1893). Ihren Namen erhielten die Chemokine, als chemotaktische Zytokine, 1992 nach dem Dritten Internationalen Symposium zum Thema chemotaktische Zytokine. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Regulierung der Migration von Zellen des Immunsystems entlang eines Gradienten in das Gebiet mit der höchsten Chemokinkonzentration (Baggiolini, 2001).

Im Jahre 1977 wurde das erste Chemokin, der Plättchenfaktor 4 (auch bekannt als CXCL4), entdeckt und beschrieben (Walz et al., 1977). Seine chemotaktische Aktivität auf Leukozyten und Monozyten wurde einige Jahre später erkannt (Deuel et al., 1981). Baggiolini und Mitarbeiter charakterisierten das Protein Interleukin-8, heute auch CXCL8 genannt, das von verschiedenen Zelltypen als Reaktion auf eine Entzündung exprimiert wird und neutrophile Granulozyten aktiviert (Baggiolini et al., 1989). Einige von CD8+ T-Zellen exprimierte Chemokine (CCL3, 4 und 5) spielen eine wichtige Rolle als HIV-hemmende Faktoren (Cocchi et al., 1995). Daraufhin wurden in den 90er Jahren des 20. Jahrhunderts viele der heute bekannten Chemokine identifiziert. Die Entwicklung der EST (expressed sequence tag), eine relativ einfache Methode Gensequenzen zu untersuchen, ermöglichte eine schnelle Identifikation der Gene, die für Chemokine kodieren (Rossi und Zlotnik, 2000). Bis heute sind etwa fünfzig Chemokine bekannt (Moser und Loetscher, 2001).

2.1.1 Klassifikation und Struktur

Chemokine sind kleine Proteine, die aus 70-130 Aminosäuren bestehen (Baggiolini und Dahinden, 1994) und ein Molekulargewicht von 8-14 kDa aufweisen (Zlotnik und Yoshie, 2000).

Zum einen erfolgt die Einteilung der Chemokine auf Grund ihrer Funktion in inflammatorische (induzierbare) und homöostatische (konstitutive) Chemokine. Die

Expression der inflammatorischen Chemokine wird durch Entzündungsparameter induziert um immunkompetente Zellen zu aktivieren und diese zum Ort der Entzündung zu dirigieren. Die homöostatischen Chemokine dagegen werden von bestimmten Geweben konstitutiv exprimiert, um zum Beispiel die Verteilung von Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen und deren physiologische Rezirkulation zu steuern (Zlotnik und Yoshie, 2000).

Chemokine besitzen spezifische konservierte Cysteine in ihrer Aminosäuresequenz, die durch intramolekulare Disulfidbrücken verknüpft sind (Abbildung 2.1). In der Regel befinden sich diese zwischen dem ersten und dem dritten Cystein bzw. zwischen dem zweiten und dem vierten Cystein. Dadurch ergibt sich die meist ähnliche und stabile Tertiärstruktur der Chemokine. Je nach Anzahl und Lage der Cysteine am amino-terminalen Ende erfolgt die Klassifikation in vier Gruppen: CC-, CXC-, CX3C- und XC-Chemokine (Murphy et al., 2000).

In der CC-Familie liegen die ersten beiden Cysteine direkt nebeneinander, während in der CXC-Familie diese durch eine weitere Aminosäure voneinander getrennt sind. Bei Fraktalkin, dem einzigen Vertreter der CX3C-Familie, liegen drei beliebige Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cysteinen (Murphy, 2000). Die Gruppe der XC-Chemokine (Lymphotacin α und Lymphotacin β) stellt eine Besonderheit dar, da sich am amino-terminalen Ende nur zwei Cysteine befinden und nur eine Disulfidbrücke vorhanden ist (Kennedy et al., 1995).

Der Hauptkörper der Chemokine besteht aus einem dreisträngigen antiparallelen β -Faltblatt, an das sich einerseits das ungeordnete amino-terminale Ende und andererseits das carboxy-terminale Ende mit einer α -Helix aus 20-30 Aminosäuren anschließt (Baggiolini, 1998).

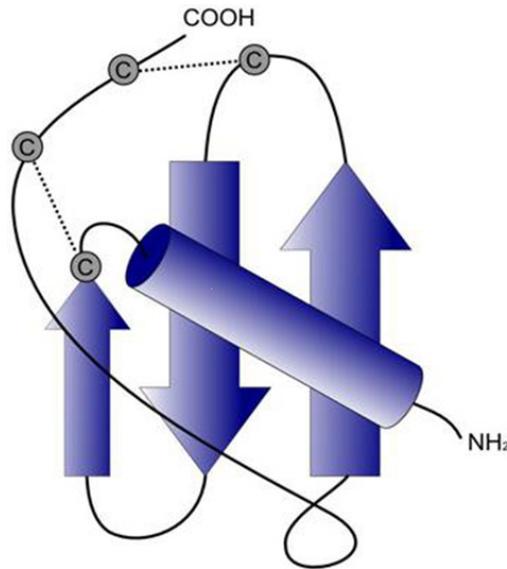


Abbildung 2.1: Tertiärstruktur der Chemokine. Der blaue Zylinder symbolisiert die α -Helix, die blauen Pfeile die β -Faltblattstrukturen. Die Disulfidbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. (Aus Leick, 2010 mit freundlicher Genehmigung von Marion Leick)

Nach der neuen Nomenklatur werden Chemokine anhand der oben beschriebenen Gruppen eingeteilt und erhalten zusätzlich zu der Gruppenbezeichnung ein „L“ (für Ligand), sodass zum Beispiel das Chemokin 19 aus der CC-Gruppe „CCL19“ genannt wird (Zlotnik und Yoshie, 2000).

2.1.2 Funktion

Die Induktion der Chemotaxis ist eine wichtige Funktion der Chemokine, wobei die Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration wandern (Gangur et al., 2002). Sie werden am Ort der Entzündung von Leukozyten, Endothelzellen und aktivierten Gewebszellen sezerniert und gebunden an Glykosaminoglykane (GAGs) präsentiert. Durch diese Bindung wird die Dissemination der Chemokine verhindert (Leick, 2010). GAGs sind lange, unverzweigte, saure Polysaccharide, die sich auf der Zelloberfläche und im Extrazellularraum befinden (Prydz und Daalen, 2000). Beispiele für GAGs sind Heparin, Chondroitinsulfat und Heparansulfat, welches die Hauptrolle bei der Bindung von Chemokinen spielt.

Nach Stimulation mit einem Chemokin kann eine Formänderung der Zelle beobachtet werden, wobei sich Lamellipodia ausbilden, die für die Chemotaxis notwendig sind (Baggiolini, 1998).

Außerdem führt die Stimulation mit einem Chemokin zur erhöhten Expression und Aktivierung von Integrinen, die den Leukozyten die Adhäsion an das Gefäßendothel ermöglichen (Baggiolini, 1998). Die Adhäsion stellt einen Abschnitt im Ablauf der transendothelialen Migration (TEM) dar, bei der die Leukozyten aus dem Blut das Gefäßendothel überwinden und in das umliegende Gewebe gelangen. Normalerweise bewegen sich Leukozyten im Zentrum des Blutstroms. Zu Beginn der TEM begeben sie sich zur Gefäßwand, wo Selektine ihre langsame Bewegung entlang der Endotheloberfläche ("Rollen") ermöglichen. Chemokine bewirken nun, dass die Selektin-abhängige Interaktion mit geringer Affinität durch erhöhte Expression und Aktivierung von Integrinen in eine Interaktion mit hoher Affinität umgewandelt wird. Dadurch kann die Extravasation der Leukozyten stattfinden (Luster, 1998).

Des Weiteren steigt nach Stimulierung mit Chemokinen die intrazelluläre Calciumkonzentration. Die Produktion von mikrobioziden Sauerstoffradikalen und bioaktiven Lipiden beginnt und verschiedene Stoffe, wie Histamin oder Proteasen, werden aus dem Zytoplasma freigesetzt (Baggiolini, 1998).

Chemokine sind daher nicht nur an physiologischen Vorgängen, wie Immunantwort und Embryogenese beteiligt, sondern auch an pathologischen Prozessen (Müller et al., 2001). Die Migration von Tumorzellen während der Metastasierung ähnelt der Chemokin-induzierten Chemotaxis. Mittlerweile ist bekannt, dass bestimmte Chemokine an Tumorstadium, Metastasierung und Neoangiogenese beteiligt sind (Belperio et al., 2000; Mukaida und Baba, 2012).

2.2 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), eine der größten und meist erforschten Proteinfamilien. Sie sind an nahezu allen biologischen Prozessen beteiligt und stellen Angriffspunkte für viele Arzneimittel dar (Levoye et al., 2006). Chemokinrezeptoren kommen ausschließlich in Eukaryonten vor und dabei auch in Protozoen, Hefen und Pflanzen (New und Wong, 1998). Bis heute konnten beim Menschen ca. 800 GPCRs identifiziert werden, von denen allerdings 140 als Orphan-GPCRs bezeichnet werden, da ihre Liganden noch nicht identifiziert wurden (Levoye et al., 2006).

2.2.1 Klassifikation und Struktur

Aufgrund ihrer Sequenzhomologien werden die GPCRs in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe A, zu der auch die Chemokinrezeptoren gehören, enthält die Rhodopsinartigen Rezeptoren. Die Gruppe B bilden die Glukagon-Rezeptor-ähnlichen Rezeptoren, während Gruppe C aus Rezeptoren besteht, die den metabotropen Glutamatrezeptoren ähneln (Gether, 2000). Palczewski und Mitarbeiter beschrieben erstmals die 3D Struktur des Rhodopsins (Palczewski et al., 2000), sodass die Struktur der Mitglieder der Gruppe A bis heute am besten bekannt ist.

Obwohl die meisten Chemokinrezeptoren mehrere Chemokine binden können, beschränken sich die Liganden eines Rezeptors meist auf Mitglieder einer Chemokingruppe. Daher orientiert sich die Nomenklatur der Rezeptoren an der Chemokine. So werden die Namen zusammengesetzt aus CC oder CXC (bzw. XC oder CX3C), einem „R“ für Rezeptor und wiederum gefolgt von einer Nummer (Murphy et al., 2000).

Bis heute wurden dreiundzwanzig Chemokinrezeptoren identifiziert (Abbildung 2.2). Darunter befinden sich zehn Rezeptoren mit einem CC-Motiv (CCR1 bis 10) und sieben mit dem CXC-Motiv (CXCR1 bis 7). Ebenfalls vertreten sind die Rezeptoren aus den XC- und CX3C-Gruppen (XCR1 und CX3CR1), sowie fünf atypische Rezeptoren (DARC, D6, CRAM, CXCR7 und CCX-CKR).

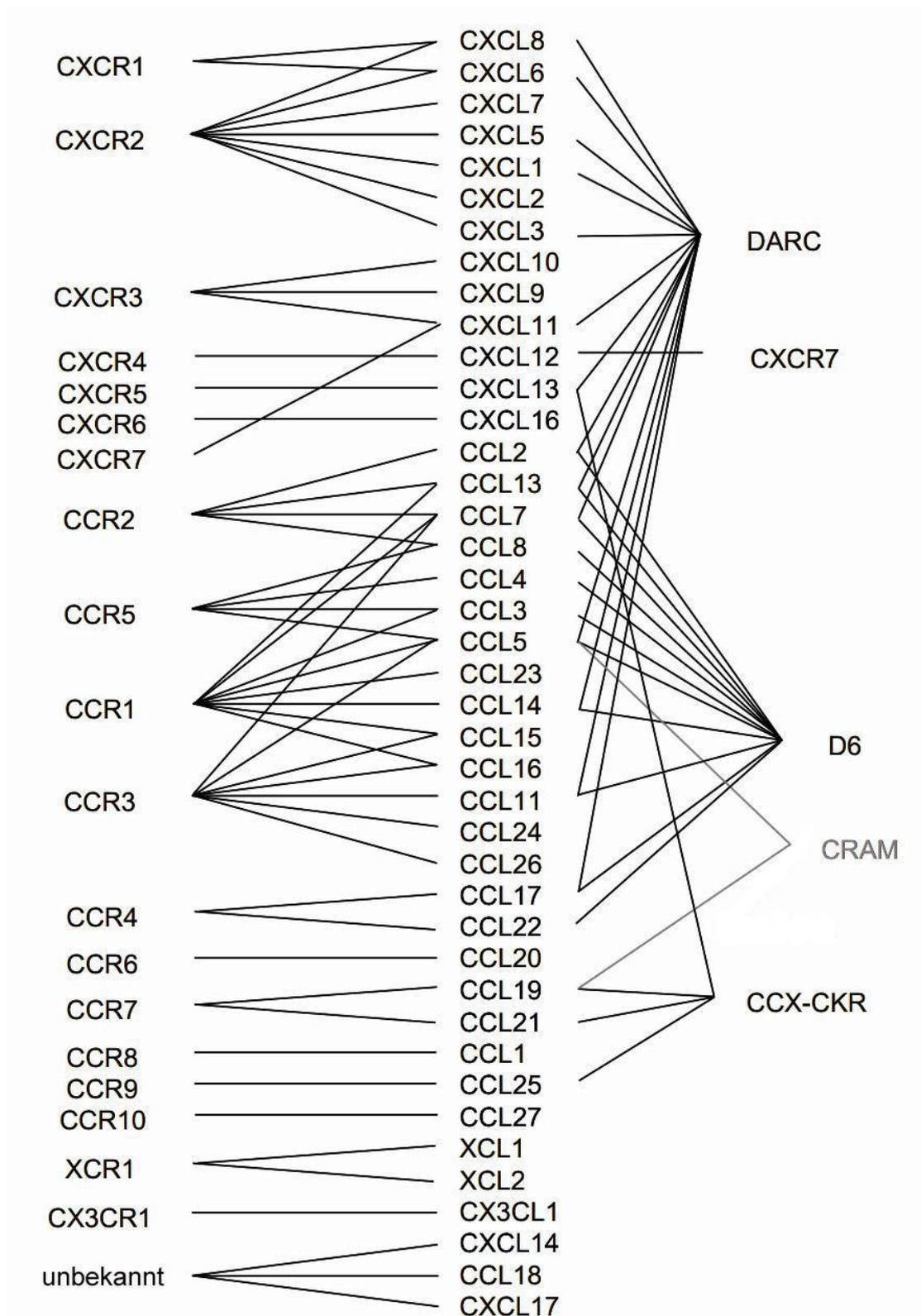


Abbildung 2.2: Chemokinrezeptoren und ihre Liganden. In der Mitte sind alle bekannten Chemokine aufgelistet. Links davon stehen alle klassischen, rechts alle atypischen Rezeptoren. Dabei wird CXCR7 aufgrund seiner Fähigkeit, sowohl klassische als auch atypische Antworten auszulösen, in beide Gruppen eingeordnet. Obwohl Chemerin als Ligand von CRAM identifiziert wurde, wird es hier nicht aufgeführt, da es nicht in die Gruppe der Chemokine gezählt werden kann. (Modifiziert nach Leick, 2010)

Chemokinrezeptoren bestehen aus 340 bis 370 Aminosäuren (Murphy et al., 2000) und besitzen sieben α -helikale transmembranäre Domänen, die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen verbunden sind (Abbildung 2.3). Außerhalb der Zelle befindet sich das saure amino-terminale Ende, das für die Bindung der Liganden (Chemokine) zuständig ist. Das carboxy-terminale Ende, reich an Serin und Threonin, liegt auf der zytoplasmatischen Seite und ist, wie die intrazellulären Schleifen, wichtig für die Signalübertragung (Allen et al., 2007). Charakteristisch für Chemokinrezeptoren ist jeweils ein Cystein in jedem der extrazellulären Abschnitte und das aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Arginin und Tyrosin bestehende DRY-Motiv in der zweiten intrazellulären Schleife (Murphy et al., 2000).

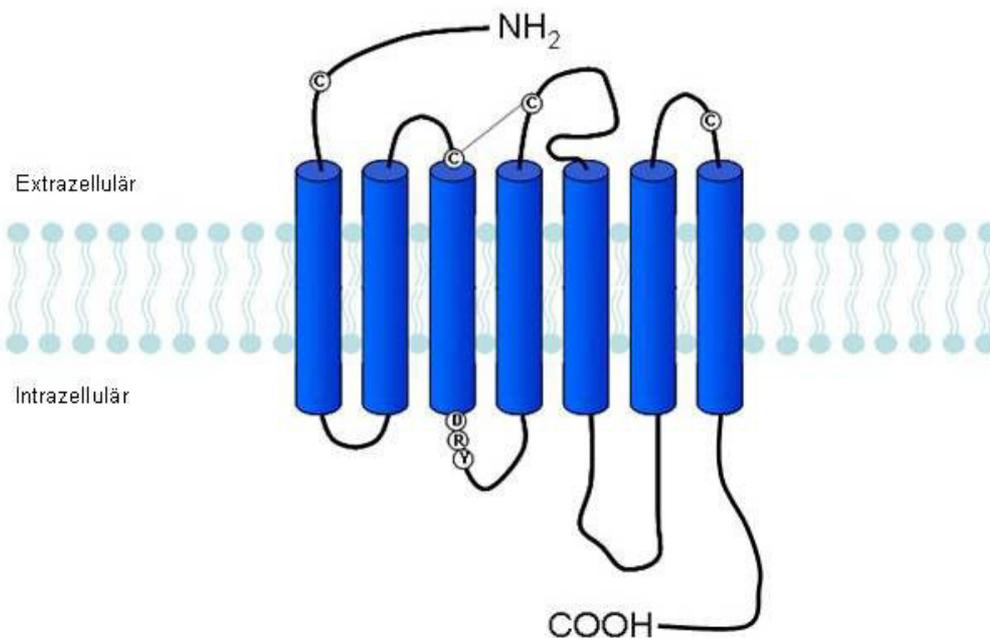


Abbildung 2.3: Schema eines Chemokinrezeptors. Die blauen Zylinder stellen die sieben transmembranären Domänen dar. Das extrazelluläre amino-terminale Ende, das intrazelluläre carboxy-terminale Ende sowie die extra- und intrazellulären Schleifen mit den charakteristischen Cysteinen und dem DRY-Motiv sind zu erkennen. (Erstellt nach Murphy et al., 2000)

2.2.2 Signalwege

GPCRs sind meist an heterotrimere G-Proteine (Guaninnucleotid-bindende Proteine) gekoppelt, die aus je einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit bestehen. Bis heute sind ca. zwanzig G-Proteine bekannt, von denen jedes mit verschiedenen Rezeptoren interagiert und an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt ist.

Es gibt verschiedene α -Untereinheiten, die aufgrund ihrer intrinsischen Aktivität in drei Gruppen eingeteilt werden: $G\alpha_s$, welche die Adenylatzyklase aktivieren, $G\alpha_i$ mit inhibierender Wirkung auf die Adenylatzyklase, $G\alpha_q$, welche zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führen und $G\alpha_{12/13}$ mit noch unbekannter Funktion (Morris und Malbon, 1999). Chemokinrezeptoren sind meist an Pertussistoxin-sensitive G-Proteine ($G\alpha_i$) gekoppelt, die durch ihre hemmende Funktion auf die Adenylatzyklase die Bildung des cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) hemmen.

Die Bindung des Liganden an den Rezeptor löst eine Konformationsänderung und somit dessen Aktivierung aus. Nachdem das G-Protein gebunden wurde, wird GDP an seiner α -Untereinheit durch das aktive GTP ersetzt. In den meisten Fällen dissoziiert das G-Protein nun in zwei aktivierte Komponenten, der α -Untereinheit und einem Komplex aus β - und γ -Untereinheit (Hamm, 1998). Beide Komponenten können verschiedene Signale übermitteln und verstärken. Mittlerweile ist bekannt, dass die beiden Komponenten in einigen Fällen nicht dissoziieren, sondern über vorher verborgene Strukturen verbunden bleiben, und dennoch zur Übermittlung ihrer Signale fähig sind (Alberts, 2008).

Über die aktivierten G-Protein-Untereinheiten werden verschiedene Signalkaskaden eingeleitet (Abbildung 2.4). Die α -Untereinheit des G-Proteins übernimmt hierbei vor allem die Aufgabe, die $\beta\gamma$ -Untereinheit zu aktivieren und die Signaltransduktion zu beenden. Hierzu wird durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität GTP zu GDP hydrolysiert, wodurch die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten wieder reassoziieren. Zum anderen spielt die α -Untereinheit eine Rolle bei der Aktivierung von Tyrosinkinasen der Src-Familie, die zum Beispiel in Leukozyten exprimiert werden. Dies führt über einen alternativen Signalweg zur Aktivierung von Ras, einem Proto-Onkogen, das vor allem Zellproliferation vermittelt. Außerdem ist die Aktivierung der Src-Familie möglicherweise an der Aktivierung von FAK beteiligt, welches an der Zelladhäsion mitwirkt (Thelen, 2001).

Die größte und wichtigste Aufgabe in der Signaltransduktion übernimmt jedoch die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Dies geschieht zum einen über die Phospholipase C und zum anderen über Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und Proteinkinase B (PKB). Nach Aktivierung der Phospholipasen PLC- β 2 und - β 3 spalten diese Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) durch Hydrolyse in Inositol-1, 4, 5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 führt zum intrazellulären Calciumanstieg (Thelen, 2001),

was die Zelle zur Chemotaxis befähigt. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die an einigen Prozessen, wie dem oxidativen Burst, beteiligt ist (Li et al., 2000), und kann über GPCR-Kinasen (GRK) zur Phosphorylierung des Rezeptors führen (Abbildung 2.4).

PI3K phosphoryliert IP_3 , sodass Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3) gebildet wird, welches die PKB (Akt) aktiviert und somit eine Rolle bei Proliferation, Apoptose und Chemotaxis spielt (Mukaida, 2000).

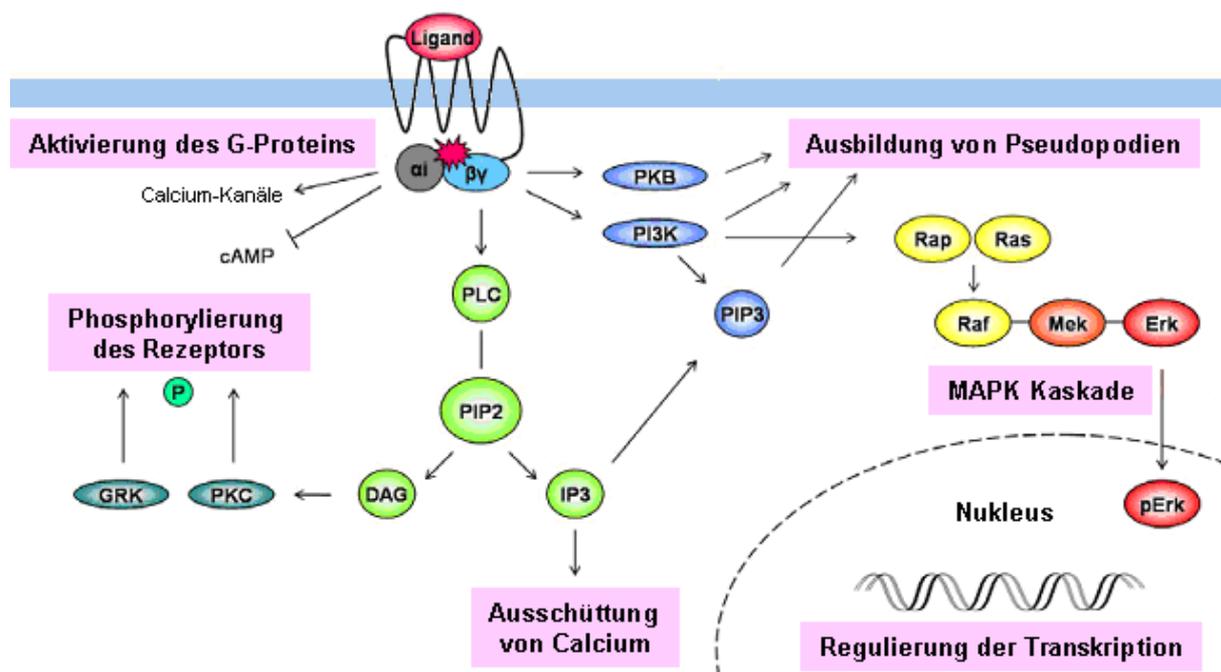


Abbildung 2.4: Signalwege nach Aktivierung eines GPCRs durch Chemokine. (Modifiziert nach Leick, 2010)

2.2.2.1 Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen

Die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ist ebenfalls an vielen zellulären Prozessen, wie Differenzierung, Fortbewegung und Apoptose der Zelle, beteiligt (Schaeffer und Weber, 1999). Zu den MAPK zählen die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2, welche Zellwachstum und -differenzierung regulieren, sowie die c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und p38, die hauptsächlich für die Weiterleitung von Stresssignalen, wie Entzündung und Apoptose, verantwortlich sind (Robinson und Cobb, 1997).

ERK1/2 wird über Ras, Raf und MEK aktiviert, gelangt in den Nucleus und beeinflusst dort Transkriptionsfaktoren (Ganju et al., 1998) (Abbildung 2.4).

2.2.2.2 Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges

Ursprünglich wurde der Jak/STAT-Signalweg bei Untersuchungen von Interferon-induzierten intrazellulären Signalwegen entdeckt (Heim, 1999). STATs (Signal transducers and activators of transcription) übermitteln als Transkriptionsfaktoren Signale von der Zellmembran in den Zellkern und sind an der Regulierung der Genexpression beteiligt. Als intrazelluläre Antwort auf Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflussen STATs Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose (Rawlings et al., 2004) und scheinen in der Embryogenese von Mäusen notwendig zu sein, da STAT^{-/-} Embryonen am siebten Tag degenerieren (Takeda, 1997). Bis heute sind bei Säugetieren sieben Mitglieder der STAT-Familie bekannt: STAT1- 4, STAT 5a, STAT 5b und STAT 6 (Darnell, 1997).

Insbesondere STAT3 spielt nicht nur bei entzündlichen Prozessen, sondern auch bei der malignen Transformation eine wichtige Rolle. STAT3 ist in einer Reihe von Tumorerkrankungen konstitutiv aktiviert und besitzt kanzerogenes und anti-apoptotisches Potential (Yu und Jove, 2004). Es existieren zwei Isoformen, STAT3 α und STAT3 β (Abbildung 2.5), deren Expression von Zelltyp, Ligandenverfügbarkeit und Reifegrad der Zelle abhängt (Biethahn et al., 1999). Am carboxy-terminalen Ende von STAT3 α befindet sich eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD).

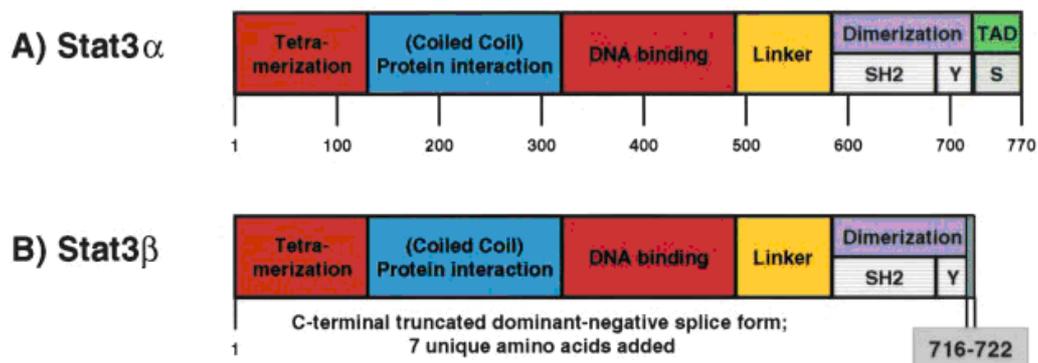


Abbildung 2.5: Isoformen von STAT3: STAT3 α und STAT3 β . Die Transkriptionsaktivierungsdomäne befindet sich am carboxy-terminalen Ende von STAT3 α . (Aus Buettner et al., 2002 mit freundlicher Genehmigung von AACR)

STAT3 wird über eine Januskinase (JAK) aus der Gruppe der Tyrosinkinase durch Phosphorylierung am Tyrosin 705 aktiviert. Dies führt zu Dimerisierung und Verlagerung in den Zellkern (Darnell et al., 1994; Ihle, 1995) (Abbildung 2.6), wo STAT3 Einfluss auf die Expression bestimmter Gene hat (Gadina et al., 2001).

Außerdem scheint die Phosphorylierung am Serin 727 für die Regulierung der Transkription verantwortlich zu sein (Wen et al., 1995; Chung et al., 1997). Die Serin-Phosphorylierungsstelle (Ser727) befindet sich auf der TAD von STAT3 α . Erst durch diese ist es möglich, die maximale Transkriptionsaktivität zu erreichen (Wen et al., 1995).

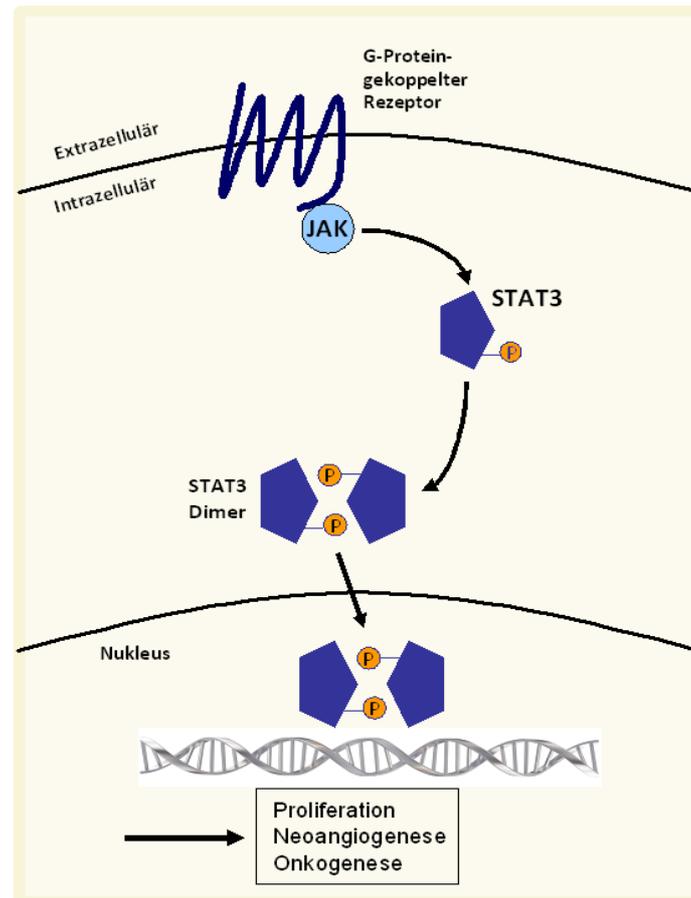


Abbildung 2.6: STAT3 Signalweg. Nach Phosphorylierung und Dimerisierung gelangt STAT3 in den Nukleus, wo es an der Regulierung der Transkription beteiligt ist. (Erstellt nach Buettner et al., 2002)

2.3 Atypische Chemokinrezeptoren

Die Migration von Leukozyten ist entscheidend für die korrekte Funktion des Immunsystems. Bei deren Regulation spielen Chemokine und Chemokinrezeptoren eine entscheidende Rolle. Allerdings identifizierte man Mitglieder einer Unterfamilie der Chemokinrezeptoren, die zwar ihre Liganden mit hoher Affinität binden und strukturelle Gemeinsamkeiten mit klassischen Rezeptoren aufweisen, jedoch weder Migration vermitteln noch über G-Proteine klassische Signalkaskaden aktivieren (Bonecchi et al., 2008). Diese werden atypische, bzw. in der Literatur auch "Decoy"-, "Scavenger"- oder stille Chemokinrezeptoren genannt. Genauere Aussagen zur

Beziehung zwischen Struktur und Funktion können zwar noch nicht gemacht werden, jedoch ist zu erwähnen, dass bei atypischen Chemokinrezeptoren das DRY-Motiv, das an der Bindung zum G-Protein beteiligt ist, nicht konserviert vorliegt (Mantovani et al., 2006). Dies könnte erklären, warum intrazelluläre Signalwege nicht über G-Proteine weitergeleitet werden.

Die Gruppe der atypischen Chemokinrezeptoren besteht bisher aus fünf Mitgliedern:

- **DARC** (Duffy antigen receptor for chemokines) wird von Erythrozyten und venösen Endothelzellen exprimiert und bindet eine Reihe von CC- und CXC-Chemokinen (Gardner et al., 2004). Interessanterweise exprimieren 95% der afrikanischen Bevölkerung kein DARC, was mit der Resistenz gegen die Malaria-Erreger *Plasmodium vivax* und *Plasmodium knowlesi* zusammenzuhängen scheint (Miller et al., 1976).
- **D6** ist ebenfalls ein atypischer Rezeptor, der auf Endothelzellen des lymphatischen Systems, Trophoblasten und einigen Leukozyten exprimiert wird (Graham und McKimmie, 2006; Nibbs et al., 2001). Er bindet eine Vielzahl von CC-Chemokinen und spielt so eine Rolle im Entzündungsgeschehen (Nibbs et al., 1997).
- **CCX-CKR** wird sowohl von T-Lymphozyten und dendritischen Zellen, als auch von lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben, wie Milz, Lymphknoten, Herz und Plazenta, exprimiert. Er bindet die Chemokine CCL19, CCL21 und CCL25 mit hoher und CCL13 mit schwacher Affinität (Gosling, 2000). CCL19 wird nach Bindung internalisiert, gespeichert und schließlich abgebaut (Comerford et al., 2006).
- **CXCR7** wird aufgrund seiner Fähigkeit nach Bindung von CCL11 Chemotaxis zu vermitteln, einerseits zu den klassischen Chemokinrezeptoren gezählt. CXCR7 übernimmt nach Bindung seines zweiten Liganden CXCL12 andererseits auch atypische Aufgaben, indem dieses internalisiert und danach in der Zelle sequestriert wird (Boldajipour et al., 2008).
- Der in dieser Arbeit näher untersuchte atypische Chemokinrezeptor **CRAM** wird im nächsten Abschnitt beschrieben.

2.3.1 CRAM

Das Gen CCRL2 codiert für einen neuen humanen atypischen Chemokinrezeptor, der erstmals 1998 von Fan und Mitarbeitern beschrieben wurde (Fan et al., 1998). Es befindet sich auf dem Chromosom 3p21 in der Nähe von anderen Chemokinrezeptoren (Yoshimura und Oppenheim, 2011). CRAM, auch bekannt als CCRL2 (chemokine receptor like 2) oder HCR (human chemokine receptor), besitzt eine Sequenzhomologie von über 40 % mit anderen Chemokinrezeptoren, wie CCR1 (Migeotte et al., 2002). CRAM weist eine Mutation im hoch konservierten DRY-Motiv auf, wobei Asparaginsäure (D) an Position 127 durch Glutamin (Q) ersetzt wurde. Es gibt zwei Spleißvarianten: CRAM-A und das 36 Basenpaare kürzere CRAM-B (Leick et al., 2009). Als murines Homolog wurde L-CCR (Lipopolysaccharid inducible C-C chemokine receptor related gene) identifiziert, das mit dem humanen Gen allerdings nur 51 % Sequenzhomologie teilt (Zabel et al., 2008).

Es wurde gezeigt, dass CRAM sowohl in lymphatischem Gewebe, wie Milz, Lymphknoten und Knochenmark, als auch in nicht-lymphatischen Organen, wie Herz und Lunge, exprimiert wird (Fan et al., 1998). Man fand CRAM auf beinahe allen hämatopoetischen Zellen, einschließlich T-Lymphozyten, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und CD34⁺ Zellen (Migeotte et al., 2002). Außerdem wird CRAM in Abhängigkeit vom Reifegrad auch von B-Lymphozyten exprimiert (Hartmann et al., 2008). Weitere Untersuchungen zeigten, dass CRAM auch auf endothelialen Zellen in Lymphknoten vorhanden ist (Leick, 2010).

Es konnten bislang zwei Chemokine als Liganden für CRAM identifiziert werden: CCL5 und CCL19. Außerdem berichteten Zabel und Mitarbeiter im Jahre 2008, dass sowohl das humane als auch das murine Chemerin Liganden für CRAM und sein murines Ortholog sind (Zabel et al., 2008). Chemerin, das als Fettgewebshormon nicht in die Gruppe der Chemokine gezählt wird, bindet mit hoher Affinität an das murine CCRL2. Es findet allerdings nicht, wie bei anderen atypischen Chemokinrezeptoren, eine Internalisierung des Liganden statt, sondern lediglich die Bindung des Liganden und eine erhöhte lokale Konzentration von Chemerin (Zabel et al., 2008).

Die Stimulation mit CCL5 führt bei humanen prä-B-Zellen zur Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, welche jedoch nicht durch Pertussistoxin inhibiert werden kann. Dies führte zu der Vermutung, dass CRAM nicht an G-Proteine gekoppelt und in die Gruppe der atypischen Chemokinrezeptoren einzuordnen ist (Hartmann et al., 2008). Andere klassische Antworten, wie Calciumausschüttung oder Chemotaxis, konnten nicht nachgewiesen werden. Außerdem führt die Stimulation mit CCL5 zu einer erhöhten Expression von CRAM und zu einem ständigen Lokalisationswechsel des Rezeptors zwischen Zelloberfläche und Zytoplasma, während die Oberflächenexpression konstant bleibt (Leick, 2010).

Neben den zuletzt genannten Liganden konnte das homöostatische Chemokin CCL19 als Ligand für CRAM identifiziert werden (Leick, 2010). CCL19 und CCL21, das nicht an CRAM bindet, sind Liganden des klassischen Rezeptors CCR7 sowie des atypischen Rezeptors CCX-CKR. Im Gegensatz zur Stimulation seines klassischen Rezeptors CCR7 mit CCL19, können nach Stimulation von CRAM keine klassischen Antworten beobachtet werden. Nach Bindung von CCL19 wird dieses internalisiert und eine Verlagerung von CRAM in das Zytoplasma findet statt, sodass bereits nach fünf Minuten die Oberflächenexpression abfällt (Leick et al., 2009). Eine Phosphorylierung von MAPK wird durch CRAM-Stimulation mit CCL19 nicht erreicht. Schließlich konnten Catusse und Mitarbeiter nachweisen, dass CRAM einen hemmenden Einfluss auf die klassischen Antworten Chemotaxis, ERK-Phosphorylierung und Calciumausschüttung nach CCR7-Stimulation mit CCL19 hat (Catusse et al., 2010). Die klassischen Antworten nach CCR7-Stimulation mit CCL21, seinem zweiten Liganden, werden durch CRAM nicht beeinflusst.

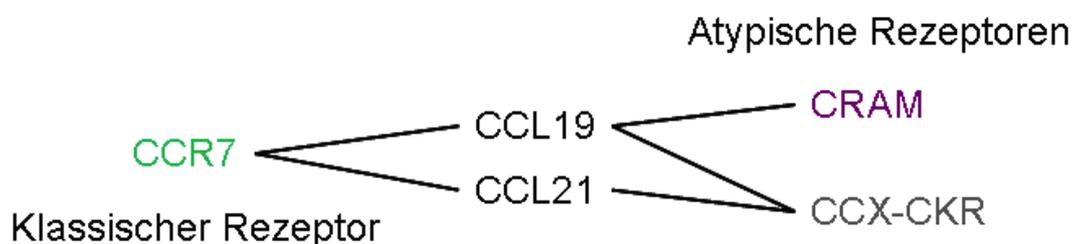


Abbildung 2.7: CCL19 und CCL21 mit den Rezeptoren CCR7, CRAM und CCX-CKR.

Die CRAM-Expression ist in der B-CLL Zelllinie Mec-1 im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten erhöht, während ebenfalls CCR7 stark exprimiert wird (Catusse et al.,

2010). An und Mitarbeiter vermuten einen Zusammenhang zwischen CRAM und der Anfälligkeit von AIDS-Patienten für eine *Pneumocystis*-Pneumonie, wobei CRAM eine Entzündung in der Lunge verursachen könnte (An et al., 2011). Außerdem ist die CRAM-Expression bei der Rheumatoiden Arthritis erhöht (Galligan et al., 2004). Dabei handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung der Gelenke, bevorzugt der Finger und Zehen. Hier exprimieren infiltrierende polymorphonukleäre Leukozyten (Granulozyten) und Makrophagen den atypischen Chemokinrezeptor CRAM (Galligan et al., 2004).

2.4 Chronische lymphatische Leukämie

Die Chronische lymphatische Leukämie wird laut WHO als indolentes chronisches B-Zell-Lymphom mit leukämischem Verlauf und niedriger Malignität beschrieben. Sie ist eine Sonderform des Non-Hodgkin-Lymphoms (Abbildung 2.8) und gekennzeichnet durch die vermehrte Anzahl von kleinen, rundkernigen, reifen, aber immunologisch inkompetenten B-Lymphozyten im Blut (Schmidt und Solenthaler, 2007). Nur selten liegt eine Vermehrung von T-Lymphozyten vor, die heute allerdings nicht mehr in die Gruppe der CLL eingeordnet, sondern T-Prolymphozyten-Leukämie (T-PLL) genannt wird (Wendtner et al., 2012).

Non-Hodgkin-Lymphome

B-Zell-Lymphome:

Prä-B-Zell-Lymphome

- Prä-B-lymphoblastische Leukämie (B-ALL)
- Prä-B-lymphoblastisches Lymphom

Reife B-Zell-Lymphome

- **Chronische lymphatische Leukämie (CLL)**
- Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom
- B-Prolymphozytenleukämie (PLL)
- Lymphoplasmazytisches Lymphom
- Follikuläres Lymphom
- Marginalzonenlymphom
- Haarzell-Leukämie
- Plasmozytom
- Burkitt-Lymphom
- ...

B-Zell-Proliferationen unklarer Malignität

- Lymphomatöse Granulomatose
- Posttransplantations-Lymphoproliferation

T-Zell-Lymphome:

Prä-B-Zell-Lymphome

- Prä-T-lymphoblastische Leukämie
- Prä-T-lymphoblastisches Lymphom

Reife T-Zell-Lymphome

- T-Prolymphozytenleukämie (T-PLL)
- Adultes T-Zell-Lymphom
- Enteropathisches T-Zell-Lymphom
- Hepatosplenisches T-Zell-Lymphom
- Mycosis fungoides
- Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom
- ...

T-Zell-Proliferationen unklarer Malignität

- Lymphomatoide Papulose

Abbildung 2.8: Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome. (Nach Berger et al., 2006)

2.4.1 Epidemiologie

Die CLL stellt mit 30 % die häufigste leukämische Erkrankung in der westlichen Welt dar, wobei die Häufigkeit der Neuerkrankungen pro Jahr bei vier pro 100.000 Einwohnern liegt (Eichhorst et al, 2011) und Männer etwas häufiger erkranken als Frauen (Verhältnis 1,7:1) (Wendtner et al., 2012). Das Alter bei Erstdiagnose liegt bei durchschnittlich 70 Jahren, wobei das Risiko an CLL zu erkranken mit steigendem Alter zunimmt (Göde, 2008).

2.4.2 Ätiologie

Die Ursachen der Chronischen lymphatischen Leukämie konnten bislang nicht geklärt werden. Genetische Faktoren werden angenommen, da das Risiko an CLL zu erkranken für Menschen mit bekannter CLL in der Familie dreifach erhöht ist. Außerdem erkranken Asiaten selten, auch wenn sie in der westlichen Welt leben. Man geht davon aus, dass Medikamente, Chemikalien, ionisierende Strahlen oder Viren keine CLL induzieren, jedoch Asbest und bestimmte Stoffe in Landwirtschaft und gummiverarbeitender Industrie für ein erhöhtes Risiko an CLL zu erkranken verantwortlich sind (Göde, 2008).

2.4.3 Diagnostik

Die Chronische lymphatische Leukämie wird häufig bei einer Routineuntersuchung diagnostiziert, wobei eine erhöhte Lymphozytenanzahl auffällt, ohne dass klinische Symptome vorhanden sind (Desai et al., 2011).

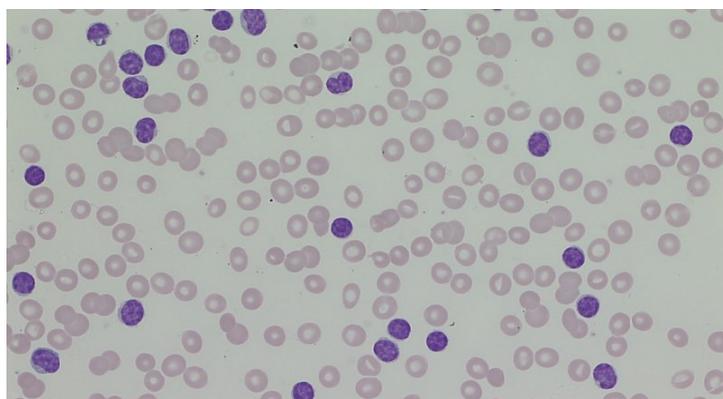


Abbildung 2.9: Blutausstrich eines Patienten mit Chronischer lymphatischer Leukämie. Es befinden sich kleine, rundkernige Lymphozyten in vermehrter Anzahl im peripheren Blut. (Aus Rawluk, 2012 mit freundlicher Genehmigung von Justyna Rawluk)

Besteht der Verdacht auf CLL werden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Anamnese
- Körperliche Untersuchung
- Blutbild
- Immunphänotypisierung
- evtl. Knochenmarkuntersuchung, Lymphknotenbiopsie, Coombs-Test, Lymphozytenverdopplungszeit

Über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten sind pro μl Blut > 5000 der kleinen, reifen B-Lymphozyten nachweisbar (Hallek und Emmerich, 2009). Typisch für CLL-Zellen ist die Koexpression der Oberflächenantigene CD5, CD19 und CD23 (Eichhorst et al., 2011). Sie sind in pathologisch vermehrter Anzahl nicht nur im Blut, sondern auch in Lymphknoten, Milz und Knochenmark zu finden. Durch die Ansammlung von CLL-Zellen im Knochenmark kann sowohl die Erythropoese als auch die Thrombopoese in einem Maße eingeschränkt sein, dass eine Anämie und/oder eine Thrombopenie entstehen.

2.4.4 Klassifikation

Um das Krankheitsstadium eines Patienten zu ermitteln, stehen zwei Klassifikationssysteme zur Verfügung: die Stadieneinteilung nach Rai (Tabelle 2-1) (Rai et al., 1975), die hauptsächlich in den Vereinigten Staaten angewandt wird, und die Stadieneinteilung nach Binet (Tabelle 2-2) (Binet et al., 1981), die vor allem in Europa zur Anwendung kommt. Beide berücksichtigen Lymphozytose, vergrößerte Lymphknoten und eine eventuell vorliegende Anämie oder Thrombopenie.

Tabelle 2-1: Stadieneinteilung der CLL nach Rai. (Nach Rai et al., 1975)

Stadium	Lymphozytose > 5x10 ³ /μl	Lymph- adenopathie	Hepato-/ Splénomegalie	Anämie Hb < 11 g/dl	Thrombopenie < 100x10 ³ /μl
0	+	-	-	-	-
I	+	+	-	-	-
II	+		+	-	-
III	+			+	-
IV	+				+

Tabelle 2-2: Stadieneinteilung der CLL nach Binet. Die mittlere Überlebenszeit ist ebenfalls aufgeführt. (Nach Binet et al., 1981; Berger et al., 2006)

Stadium	Lymphadenopathie (Anzahl befallener Regionen)	Anämie Hb < 10 g/dl	Thrombopenie < 100x10 ³ /μl	Mittleres Überleben (Jahre)
A	< 3	-	-	> 10
B	≥ 3	-	-	5
C		+	+	2

2.4.5 Klinischer Verlauf

Es gibt verschiedene Verlaufsformen der Chronischen lymphatischen Leukämie. So zeigen ca. 50 % der Patienten bei Diagnosestellung keine Symptome. Es ist möglich, dass jahrelang keinerlei Beschwerden auftreten und daher eine Therapie nicht notwendig ist. Bei anderen Patienten verläuft die Erkrankung progredient und es zeigen sich Symptome wie Nachtschweiß, Leistungs- und Abwehrschwäche, Lymphadenopathie, Blutungsneigung, Spleno- oder Hepatomegalie und Anämie

(Hallek und Emmerich, 2009). Als B-Symptome werden Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust bezeichnet, welche bei Erstdiagnose lediglich von 20 % der Patienten angegeben werden. Bei 70-80 % lässt sich dagegen eine Lymphknotenschwellung feststellen. Im weiteren Verlauf der Krankheit kommt es bei CLL-Patienten in unterschiedlichem Ausmaß zu einer Zunahme der Tumormasse und zum Auftreten von Symptomen durch die hämatopoetische und immunologische Insuffizienz. Die wichtigste Todesursache sind Infektionen mit Erregern, die in der Regel keine tödlichen Krankheiten verursachen, die aber durch das geschwächte Immunsystem der CLL-Patienten zu einer Pneumonie und einer Sepsis führen (Hallek und Emmerich, 2009).

2.4.6 Prognostische Faktoren

Bereits anhand des aktuellen Rai- bzw. Binet-Stadiums eines CLL-Patienten kann eine ungefähre Prognose abgegeben werden (Tabelle 2-2) (Binet et al., 1981).

Seit einigen Jahren stehen weitere Methoden zur Verfügung um Risikofaktoren zu untersuchen und eine präzisere Prognose bereits im frühen Stadium abgeben zu können (Tabelle 2-3) (Parker und Strout, 2011). Unter anderem wird die Mutation des Gens IgVH als wichtiges Kriterium für die prognostische Relevanz angesehen. Liegt keine Mutation dieses Gens vor, muss eine schlechtere Prognose angenommen werden (Zucchetto et al., 2006). Die Expression von ZAP-70 (Zeta-assoziiertes Protein, Molekulargewicht: 70 kD), einer Tyrosinkinase, die auf B-Zellen normalerweise nicht vorkommt, korreliert mit der Mutation von IgVH (Rassenti et al., 2004). Eine Expression von < 20 % (entspricht „ZAP-70 negativ“) korreliert mit einer besseren Prognose (Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3: Prognostische Faktoren bei der CLL. (Nach Parker und Strout, 2011)

Prognosefaktor	Inzidenz (%)	Mittleres Überleben (Jahre)
IgVH mutiert	55	24
IgVH nicht mutiert	45	8
CD38-Expression > 30 %	30	< 10
CD38-Expression < 30 %	70	> 15
ZAP-70-Expression > 20 %	60	6-10
ZAP-70-Expression < 20 %	30-40	> 15
Deletion 13q	55	17
Deletion 11q	18	6-8
Trisomie 12	16	9-11
Deletion 17p	7	2-3

2.4.7 Therapie

Eine Therapie der Chronischen lymphatischen Leukämie wird nur durchgeführt, wenn ein fortgeschrittenes Stadium nach Rai bzw. Binet vorliegt oder der Patient trotz eines frühen Stadiums Beschwerden hat (Eichhorst et al., 2011). Ist dies nicht der Fall, wird die Strategie „watch & wait“ (beobachten und abwarten) angewandt, bei der der Krankheitsverlauf unter regelmäßigen Kontrollen beobachtet wird (Hallek und Emmerich, 2009).

Mit Ausnahme der allogenen Stammzelltransplantation werden palliative Therapien angewandt. Zur Verfügung stehen hauptsächlich Chemotherapeutika, meist als Kombination verschiedener Medikamente, und Antikörper-basierte Therapien (Hallek und Emmerich, 2009). Um den Erfolg einer Chemotherapie zu optimieren wurde die in-vitro Chemosensibilitätstestung entwickelt, bei der für jeden CLL-Patienten ein

individuelles Chemosensibilitätsprofil erstellt wird (Lube, 2007). Dadurch kann das korrekte Medikament gewählt und unwirksame Behandlungen umgangen werden.

Befindet sich der Patient bei allgemeiner Fitness, wird intensiv therapiert. Liegen Begleitkrankheiten oder eine verminderte Fitness vor, wird weniger intensiv therapiert um die Lebensqualität zu erhalten.

2.5 Chronische lymphatische Leukämie des Hundes

Beim Hund werden ebenfalls akute und chronische Leukämie-Formen unterschieden (Tabelle 2-4 und Tabelle 2-5). Die Chronische lymphatische Leukämie des Hundes weist viele Gemeinsamkeiten mit der humanen CLL auf. Auch hier handelt es sich um eine Erkrankung, die durch eine monoklonale Proliferation von kleinen, reifen, aber funktionell defekten Lymphozyten gekennzeichnet ist (Mischke, 2003). Nachdem die Zellen im Knochenmark gebildet wurden, breiten sie sich vor allem im Blut und in hämatopoetischen Organen aus.

Es bestehen jedoch auch signifikante Unterschiede, sodass beim Hund mit 73 % meist eine Proliferation der T-Lymphozyten und nur selten (26 %) der B-Lymphozyten vorliegt (Workman und Vernau, 2003).

Tabelle 2-4: Klassifikation von Leukämien: Akute Leukämien. (Nach Nelson und Couto, 2010)

AKUTE LEUKÄMIEN	
Akute myeloische Leukämien (AML)	Akute lymphatische Leukämien (ALL)
Undifferenzierte myeloische Leukämie	ALL-L1
Akute myelozytäre Leukämie	ALL-L2
Akute progranulozytäre Leukämie	ALL-L3
Akute myelomonozytäre Leukämie	Akute Leukämie der LGL (large granular lymphocytes)
Akute monoblastische/monozytäre Leukämie	
Akute Erythroleukämie	
Akute megakaryoblastische Leukämie	

Tabelle 2-5: Klassifikation von Leukämien: Chronische Leukämien. (Nach Nelson und Couto, 2010)

CHRONISCHE LEUKÄMIEN
Chronische myeloische/myelozytäre Leukämie (CML)
Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML)
Chronische lymphatische/lymphozytäre Leukämie (CLL)
LGL-Variante

Die Chronische lymphatische Leukämie stellt beim Hund eine primäre Erkrankung des Knochenmarks dar, bei der die kleinen, reifen Lymphozyten im Knochenmark proliferieren. Die T-CLL vom LGL-Typ, bei der die T-Lymphozyten intrazelluläre

azurophile Granula besitzen, scheint dagegen eine primäre Erkrankung der Milz zu sein (Workman und Vernau, 2003).

Auch beim Hund ist die Ätiologie unbekannt. Im Gegensatz zur humanen CLL scheint jedoch keine familiäre Disposition vorzuliegen (Mischke, 2003).

2.5.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der Chronische lymphatischen Leukämie des Hundes ist aufgrund mangelnder wissenschaftlicher Erkenntnisse nicht genau bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass sie die häufigste Leukämieform darstellt (Weiss und Wardrop, 2010) bzw. beim Hund nach der Akuten lymphatischen Leukämie die zweithäufigste (Mischke, 2003).

Die CLL tritt bei mittelalten bis alten Hunden mit einem durchschnittlichen Alter von 9,75 Jahren auf (Vernau und Moore, 1999). Eine Rassedisposition scheint für Golden Retriever und Deutsche Schäferhunde vorzuliegen (Helfand und Kisseberth, 2010).

2.5.2 Diagnostik

Die primären Veränderungen bei der Chronischen lymphatischen Leukämie sind im Blutbild zu finden. Es besteht eine absolute Lymphozytose ($> 6000/\mu\text{l}$) und dadurch meist eine Leukozytose mit nicht selten einem Anteil von 90 % Lymphozyten (Mischke, 2003). Andere hämatologische Befunde wie eine nicht-regenerative, normozytäre, normochrome Anämie, Gumprechtsche Kernschatten, Thrombozytopenie, monoklonale Gammopathie und sehr selten Neutropenie können vorliegen (Helfand und Kisseberth, 2010). Mittels Organbiopsien von vor allem Knochenmark und Milz mit dem Nachweis von kleinen reifen Lymphozyten kann die Diagnose untermauert und das Stadium der Erkrankung ermittelt werden (Mischke, 2003).

Mittels spezifischer Zellmarker (CD3, CD4 und CD8 für T-Lymphozyten und CD21 und CD79a für B-Lymphozyten) wird der dominierende Zelltyp ermittelt (Wilkerson et al., 2005). In der klinischen Chemie finden sich zum Teil eine erhöhte Aktivität der Laktatdehydrogenase, der alkalischen Phosphatase und der Alaninaminotransferase, sowie selten eine Hypoglobulinämie (Mischke, 2003).

Im Jahre 2008 beschrieben Breen und Modiano bei fünf von sieben Hunden mit CLL eine Deletion des RB1-Gens mit Verlust oder Reduktion des RB Proteins in neun von

zehn Fällen (Breen und Modiano, 2008). Dies scheint der Deletion des 13q Gens bei der humanen CLL zu entsprechen.

2.5.3 Klinischer Verlauf

In der Regel verläuft die CLL beim Hund indolent und wird oft per Zufall bei einer Routinekontrolle festgestellt. Es kann eine moderate Lymphadenopathie oder Spleno- bzw. Hepatomegalie (Abbildung 2.10) auftreten. Bei einigen Patienten sind unspezifische Symptome, wie Lethargie, Anorexie und sehr selten Vomitus, Blutungen oder Fieber nachzuweisen (Mischke, 2003). Diese sind als Folge der Organomegalie oder der erhöhten Blutviskosität anzusehen.

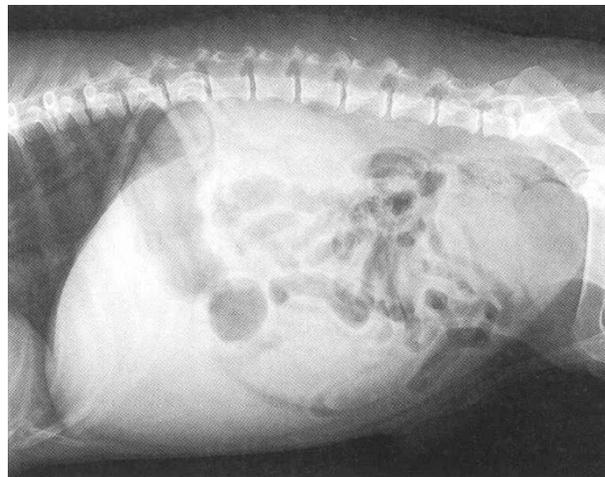


Abbildung 2.10: Röntgenbild eines 10 Jahre alten Scottish Terrier mit CLL. Spleno- und Hepatomegalie sind zu erkennen. (Aus Mischke, 2003 mit freundlicher Genehmigung von Schlütersche, Hannover)

2.5.4 Prognose

Generell hat die Chronische lymphatische Leukämie auch beim Hund eine gute Prognose, wobei die Tiere mit und ohne Therapie oft jahrelang überleben (Mischke, 2003). Im Jahre 2011 veröffentlichten Comazzi und Mitarbeiter Daten über die mittlere Überlebenszeit. Diese liegt für die B-CLL bei 480 Tagen und für T-CLL bei 930 Tagen (Comazzi et al., 2011). Außerdem konnten sie bei der T-CLL eine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Anämie und einer schlechteren Prognose beobachten. Ältere Hunde mit B-CLL überlebten signifikant länger als junge Hunde.

2.5.5 Therapie

In Anlehnung an die Vorgehensweise bei der humanen CLL wird häufig die bereits erwähnte „watch & wait“-Strategie angewandt. Treten allerdings schwere klinische Symptome auf bzw. liegt eine stark ausgeprägte Lymphozytose, eine deutliche Organomegalie oder Thrombopenie/Anämie vor, ist eine Chemotherapie angezeigt (Helfand und Kisseberth, 2010). Als Mittel der Wahl steht Chlorambucil zur Verfügung, welches im Allgemeinen mit Prednisolon und/oder Vincristin kombiniert wird, um eine schnellere Remission zu erreichen (Mischke, 2003).

Es ist zu beachten, dass beim Hund die Verbesserung der Lebensqualität und nicht die Verlängerung der Lebenszeit im Vordergrund steht.

3 Zielsetzung der Arbeit

3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle des atypischen Chemokinrezeptors CRAM bei der Chronischen lymphatischen Leukämie zu untersuchen. Es wurde vor allem auf die Interaktion von CRAM mit dem klassischen Rezeptor CCR7 Wert gelegt, da CCR7 für die Migration von B-Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe, die Positionierung innerhalb des lymphatischen Gewebes sowie für deren Auswanderung von großer Bedeutung ist. Die Versuche wurden mit primären Lymphozyten von humanen CLL-Patienten durchgeführt.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl CRAM als auch CCR7 auf B-Lymphozyten von CLL-Patienten stark exprimiert werden. Zudem hatte CRAM bei Versuchen mit einer CLL-Zelllinie hemmenden Einfluss auf die klassischen CCR7-induzierten Antworten wie Chemotaxis, ERK-Phosphorylierung und Calciumausschüttung.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die bisherigen Erkenntnisse über CRAM auch für primäre Zellen von CLL-Patienten zutreffen und welche Rolle diese Rezeptoren in der Pathophysiologie der CLL spielen könnten.

4 Material und Methoden

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Tabelle 4-1: Verwendete Geräte

Gerät	Beschreibung	Hersteller, Ort
Brutschrank	Heracell 240i	Heraeus, Hanau
Entwicklungsmaschine	Optimax	Protec, Oberstenfeld
FACS	FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Gefrierschrank -20 °C	ÖkoPlus	Siemens, München
Gefrierschrank -80 °C	Modell 917	Forma Scientific, Marietta, USA
Laborwaage	SBA41	Scaltec, Göttingen
Magnetrührer	Ikamag RCT	Ika, Staufen
Mikroskop	Olympus CK2	Olympus, Hamburg
Photometer	GeneQuant pro	Amersham Bioscience, Freiburg
Pipettierhilfe	Accu-jet [®] pro	Brand, Wertheim
Schüttelgerät	REAX 2000	Heidolph, Kelheim
Schüttler	Duomax 1030	Heidolph, Kelheim
Spannungsquelle	Modell 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, München
Sterilbank	Tecnoflow 2F 120-IIGS	Integra Biosciences, Fernwald
Stickstofftank	Chronos	Messer, Griesheim
Thermoblock	ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	5415 C und 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	Typ 1004	GFL, Burgwedel

Gerät	Beschreibung	Hersteller, Ort
Western Blot-Kammer	TransBlot [®] SD	Bio-Rad, München
Zählkammer	nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Megafuge 3.0 R	Heraeus, Hanau

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Ort
15 ml und 50 ml Tubes	Greiner, Frickenhausen
Chemotaxis-Platten ChemoTx [®] System 5 µm Porengröße	Neuro Probe, Gaithersburg
Einmalpipetten 2, 5, 10, 25 ml	Corning, Kaiserslautern
FACS-Tubes 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Fertiggel für Western Blot	Bio-Rad, München
Film für Western Blot	GE Healthcare, München
Filterpapier für Western Blot	Bio-Rad, München
Kryoröhrchen	Corning, Kaiserslautern
MACS [®] LS Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS [®] Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrotiterplatten 24-, 48-, 96-well	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipetten 10, 20, 200, 1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen 10, 20, 200, 1000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Transfermembran	Millipore, Eschborn
Western Blot-Apparatur	Bio-Rad, München
Zellfilter 40 µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen 275 cm ³	Greiner, Frickenhausen

4.1.3 Chemikalien

Tabelle 4-3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Ort
β-Mercaptoethanol	SERVA, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Roth, Karlsruhe
DiOC6 (3,3'-Dihexyloxacarbocyanin-Jodid)	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, München
ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence system)	GE Healthcare, München
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Sigma Aldrich, München
FACS-Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS (Fetales Rinderserum)	PAA, Pasching, Österreich
Glycerol	Sigma Aldrich, München
Glycin	AppliChem, Darmstadt
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	Gibco, Darmstadt
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Gibco, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich, München
MACS Separationspuffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magermilchpulver	Sigma Aldrich, München
Methanol	VWR, Batavia, USA

Chemikalie	Hersteller, Ort
Na ₃ VO ₄ (Natriumorthovanadat)	Sigma Aldrich, München
Pancoll	PAN Biotech, Aidenbach
PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Darmstadt
PI (Propidiumjodid)	Sigma Aldrich, München
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Merck, Darmstadt
Protein Marker	Bio-Rad, München
Ribonuklease A	Sigma Aldrich, München
RPMI (Rochester Polytechnical Medicinal Institute 1640)	Gibco, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA, Heidelberg
Stripping-Lösung	Millipore, Eschborn
Tris/Glycin/SDS Puffer (10-fach)	Bio-Rad, München
Tris-Base	Sigma Aldrich, München
Tris-HCl	Sigma Aldrich, München
TritonX-100	Sigma Aldrich, München
Trypanblau	Gibco, Darmstadt
Trypsin-EDTA (1x)	Gibco, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

4.1.4 Antikörper

Tabelle 4-4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller, Ort
anti-hCCR7	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
anti-hHCR/CRAM-A/B	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Antikörper	Hersteller, Ort
CD19-Antikörper	Becton Dickinson, Heidelberg
CD19-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD20-Antikörper	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD3-Antikörper	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotyp Kontrolle IgG2a	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Isotyp Kontrolle IgG2b	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
p44/42-MAPK Rabbit Antikörper (T202/Y204)	Cell Signaling, Danvers, USA
phospho-p44/42-MAPK Rabbit Antikörper (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling, Danvers, USA
phospho-STAT3 (S727) Rabbit Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
phospho-STAT3 (Y705) Rabbit AB	Cell Signaling, Danvers, USA
Sekundärintikörper Mouse IgG	GE Healthcare, München
Sekundärintikörper PE Polyklonal Rabbit Anti-Mouse	Dako, Eching
Sekundärintikörper Rabbit IgG	GE Healthcare, München
STAT3 Rabbit Antikörper	Cell Signaling, Danvers, USA
β -Actin	Sigma Aldrich, München

4.1.5 Chemokine

Tabelle 4-5: Verwendete Chemokine

Chemokin	Hersteller, Ort
CCL19 (Human MIP-3 β)	PeproTech, Hamburg
CCL21 (Human Exodus-2)	PeproTech, Hamburg

4.1.6 Untersuchungsmaterial

Blutproben	Primäre Tumorzellen von CLL-Patienten
Buffy Coats	B-Lymphozyten von gesunden Spendern
HS-5	Humane Stromazelllinie
Mec-1	CLL-Zelllinie

4.1.7 Software

Tabelle 4-6: Verwendete Software

Software	Version	Firma, Ort
FlowJo	6.4.1	Tree Star, Ashland, USA
CellQuest	3.3	Becton Dickinson, Heidelberg
Office	2003	Microsoft
Prism	5.02	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
MeDoc	4	medoc.cc IT & Design Solutions GmbH
ImageJ	1.41o	NIH, Bethesda, USA
SAS	9.2	SAS Institute Inc., Cary, USA

4.1.8 Puffer und Medien

<u>Transferpuffer für Western Blot:</u>	25 mM	Tris-Base
pH 8,3	190 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
	15 % (v/v)	Methanol

<u>Waschpuffer für Western Blot:</u>	10 mM	Tris-HCl
pH 7,4	100 mM	KCl
	0,1 % (v/v)	Tween 20
<u>Blocking-Puffer für Western Blot:</u>	Waschpuffer	
	5 %	BSA
<u>Laemmli-Puffer 4x:</u>	200 mM	Tris-HCl
	40 % (v/v)	Glycerol
	8 % (w/v)	SDS
	20 %	β -Mercaptoethanol
	0,01 %	Bromphenolblau
<u>IP-Puffer:</u>	20 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	150 mM	KCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	PMSF
	1 %	Triton X-100
		1 Tablette/50 ml Protease-Inhibitor-Mix, Roche
<u>Einfriermedium:</u>	FCS	
	10 %	DMSO
<u>FACS-Puffer:</u>	PBS	
	0,5 %	BSA

<u>Chemotaxis-Puffer:</u>	HBSS	
	0,1 %	BSA
<u>Färbelösung für Apoptose-Assay:</u>	RPMI	
	0,5 %	BSA
	6 µg/ml	PI
	0,2 µM	DiOC6
<u>Färbelösung für Zellzyklus-Assay:</u>	PBS	
	50 µg/ml	PI
	0,1 %	TritonX-100
	0,1 %	RNase
<u>Zählmedium 1:50:</u>	100 ml	Essigsäure 7 %
	20 µl	Trypanblau

4.2 Methoden

4.2.1 Zellen

4.2.1.1 Untersuchungsmaterial

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit Tumorzellen von CLL-Patienten gearbeitet. Außerdem wurden die Zelllinien Mec-1 (humane B-CLL-Zelllinie) und HS-5 (humane Stromazelllinie), sowie B-Lymphozyten von gesunden Spendern verwendet.

4.2.1.2 Zellgewinnung

Die Isolation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus Blutproben von Patienten wurde durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll (Dichte $\rho = 1,077 \text{ g/ml}$) durchgeführt. Eine Probe von 10 ml wurde 1:1 mit PBS gemischt und vorsichtig auf 15 ml Ficoll pipettiert. Die beiden Flüssigkeiten sollten sich nicht mischen, da dies die spätere Reinheit vermindern würde. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 1800 rpm ohne Bremse, sodass die Auftrennung der verschiedenen Anteile nicht wieder zerstört wurde. Die mononukleären Zellen bildeten einen Ring zwischen Ficoll und Plasma, der vorsichtig abpipettiert werden konnte. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen und im Zählmedium (1:50) gezählt.

Ebenso wurde mit Buffy Coats von gesunden Spendern verfahren. Der Buffy Coat setzt sich hauptsächlich aus Leukozyten und Blutplättchen zusammen und entsteht als Grenzschicht zwischen Erythrozyten und Blutplasma, wenn antikoaguliertes Blut zentrifugiert wird. Allerdings war hier im Gegensatz zu den Patientenproben der Anteil an B-Lymphozyten an der Gesamtzellzahl geringer als 85 %, sodass eine weitere Aufreinigung mittels MACS[®] Separator notwendig war.

Bei der MACS[®] Positivselektion wurden die gewünschten B-Lymphozyten mit einem Antikörper, der mit MicroBeads (ca. 50 nm große Magnetpartikel) konjugiert war, magnetisch markiert. Bei der anschließenden Passage durch ein magnetisches Feld wurden nur die markierten Zellen in der Säule angezogen. Alle anderen Zellen wurden verworfen. Nach der Entfernung der Säule aus dem magnetischen Feld konnten die markierten Zellen herausgewaschen und aufgefangen werden.

Im Einzelnen wurden die Zellen nach der Dichtegradientenzentrifugation erneut zentrifugiert und in MACS[®]-Puffer (80 µl Puffer pro 10⁷ Zellen) resuspendiert. Es folgte die Inkubation mit den CD19-MicroBeads (10 µl pro 10⁷ Zellen) für 10 min bei 4 °C. Nachdem zweimal mit Puffer gewaschen wurde, wurden die Zellen in MACS[®]-Puffer (500 µl pro 10⁸ Zellen) resuspendiert. Die Säule (MACS[®] LS Column) wurde im magnetischen Feld platziert, bevor die Zellsuspension hineingegeben wurde. Nachdem die Zellsuspension die Säule passiert hatte, wurde zweimal mit Puffer durchgespült. Die Säule konnte aus dem magnetischen Feld entfernt und die markierten Zellen herausgewaschen und aufgefangen werden.

Sowohl bei CLL-Patientenzellen, als auch bei Zellen von gesunden Spendern war eine Prüfung der Reinheit notwendig, da nur Proben mit > 85 % B-Lymphozyten für weitere Versuche verwendet werden sollten. Dafür wurde CD19 als B-Zellmarker und CD3 als T-Zellmarker verwendet. Um die Reinheit zu verbessern, konnte bei B-Lymphozyten von gesunden Spendern eine weitere Separation angeschlossen werden. Lag bei CLL-Patientenzellen der B-Zell-Anteil < 85 %, wurde die Probe nicht für weitere Versuche verwendet.

4.2.1.3 Zellkultivierung

Mec-1 benötigen für die Kultivierung das Medium IMDM, HS-5 benötigen RPMI. Den Medien wurden jeweils 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugefügt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Hatten die adhärennten Stromazellen eine nahezu vollständige Konfluenz erreicht, war eine Subkultivierung notwendig. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde dieser dünn mit Trypsin-EDTA bedeckt. Nach ca. 3-5 min lösten sich die Zellen und konnten in der gewünschten Dichte in frischem Medium weiterkultiviert werden.

Mec-1 Zellen wachsen nicht adhärennt und mussten daher nicht abgelöst werden. Hier wurde zur Weiterkultivierung lediglich die gewünschte Zellenzahl im Medium abgenommen, in eine neue Flasche überführt und mit frischem Medium aufgefüllt.

4.2.1.4 Zellzählung

Um die Zellzahl in einer Suspension zu bestimmen, wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Zusätzlich zur Zellzählung konnte mit Trypanblau auch die Vitalität der Zellen beurteilt werden. Es ist in der Lage die Zellmembran von toten Zellen zu durchdringen und diese, im Gegensatz zu vitalen Zellen, blau zu färben.

Für die Färbung wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau gemischt und auf die Neubauer Zählkammer gegeben. Bei 40-facher Vergrößerung wurden die vier großen Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die ermittelte Zellzahl wurde mit 10^4 , sowie mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert. Dies ergab die Zellzahl pro ml Medium.

Bei einer sehr großen Zellzahl, wie zum Beispiel nach der MACS Separation, wurde das Zählmedium 1:50 verwendet. Hierfür wurden 490 µl des Zählmediums mit 10 µl der Zellsuspension gemischt und ebenfalls der Mittelwert der in den vier großen Eckquadrate der Neubauer Zählkammer gezählten Zellzahl gebildet. Um die Zellzahl pro ml zu errechnen, wurde der Mittelwert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 50 multipliziert.

4.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) ist ein Verfahren, um zum Beispiel Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine zu bestimmen. Zellen einer Zellsuspension, die zuvor mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert wurden, werden an einem zentralen Lichtstrahl vorbeigeführt, wobei sie je nach Größe, Granularität und Fluoreszenz bestimmte Lichtsignale aussenden, die von Detektoren gemessen werden.

In dieser Arbeit wurden alle Messungen mit dem FACScalibur der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Zur Datenauswertung wurde die Software CellQuest und zur graphischen Datenbearbeitung die Software FlowJo verwendet.

4.2.2.1 Oberflächenexpression

Um zu sehen, wie stark die Chemokinrezeptoren CRAM und CCR7 bzw. die Oberflächenmoleküle CD19 und CD3 auf der Oberfläche der Zellen exprimiert

werden, wurden diese Moleküle mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen.

Hierfür wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS, 5×10^6 Zellen pro ml PBS, 0,1 % BSA, resuspendiert. 50 μ l der Zellsuspension wurden mit 2 μ l des Primärantikörpers für 45 min bei 4 °C inkubiert. Nachdem zweimal mit kaltem PBS, 0,1 % BSA, in der gekühlten Zentrifuge gewaschen wurde, wurde wiederum mit 2 μ l des Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers für 45 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimal gewaschen und in 400 μ l PBS, 0,1 % BSA, resuspendiert. Es folgte die Messung am FACScalibur.

Wurde die Färbung mit einem direkt-gekoppelten Antikörper durchgeführt, entfiel die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, sodass direkt nach der ersten Inkubation gewaschen, resuspendiert und gemessen werden konnte.

4.2.2.2 Apoptose-Assay

Die Färbung mit Propidiumjodid in Verbindung mit DiOC6 wird benutzt, um festzustellen, ob Zellen vital, apoptotisch oder tot sind. Dabei werden lebende Zellen durch DiOC6 und tote durch PI gefärbt. Zellen, die sich in Apoptose befinden, nehmen keinen der beiden Farbstoffe an.

Für diesen Versuch wurden 1×10^6 Zellen in 300 μ l FACS-Medium (RPMI mit 0,5 % BSA) resuspendiert und 300 μ l Apoptose-Färbelösung dazugegeben. Es folgte die Inkubation für 15 min bei 37 °C und danach direkt die Messung am FACS. Durch die Auswertung mittels FlowJo konnte der prozentuale Anteil vitaler, apoptotischer und toter Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt werden.

Die Messung wurde am dritten Tag des Versuches durchgeführt, nachdem die Zellen in Vollmedium unter folgenden Bedingungen kultiviert wurden:

1. Kontrolle
2. + CCL19 (Konzentration: 0,5 μ g/ml)
3. + CCL21 (Konzentration: 0,5 μ g/ml)

4.2.2.3 Zellzyklus-Assay

Auch für dieses Experiment wurden die Zellen unter oben genannten Konditionen für 72 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 5×10^5 Zellen gewaschen, in 1 ml PBS

resuspendiert und mit 2,3 ml Ethanol 100 % für mindestens 1 h bei 4 °C fixiert. Nach dieser Zeit wurden 400 µl Zellzyklus-Färbelösung hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 37 °C und schließlich die Messung am FACS und die Auswertung mittels FlowJo. Diese gab an, in welchem Stadium des Zellzyklus die Zellen sich jeweils befanden. Die Stadien sind: G₁-, S-, G₂-, M- und G₀-Phase, wobei in der Synthesephase (S-Phase) die Replikation der DNA stattfindet.

4.2.3 Chemotaxis-Assay

Für diesen Versuch wurde das ChemoTx[®]-System von Neuro Probe verwendet, bei dem die obere und die untere Kammer durch einen Filter mit der Porengröße 5 µm voneinander getrennt sind. Die Porengröße musste so gewählt werden, dass die Zellen hindurchwandern, aber nicht hindurchfallen konnten. In die untere Kammer wurden 31 µl Chemotaxis-Puffer (HBSS, 0,1 % BSA) gegeben, je nach Kondition versetzt mit CCL19 oder CCL21 (Konzentration: 100 ng/ml). Nachdem 10x10⁶ Zellen pro ml HBSS, 0,1 % BSA resuspendiert wurden, wurden 50 µl dieser Zellsuspension auf den Filter gegeben. Es schloss sich die Inkubation von 90 min bei 37 °C an, nach der die Zellsuspension mit einem Tuch von dem Filter gewischt wurde. Die Platte wurde für zwei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Inhalt der unteren Kammer in FACS Röhrchen überführt. Im FACScalibur konnte die Anzahl der migrierten Zellen gemessen werden. Hierzu wurde bei hoher Durchflussrate 30 sec gemessen und anschließend der chemotaktische Index (CI) nach folgender Formel berechnet:

$$CI = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Anzahl der Zellen in der Negativkontrolle}}$$

Sollte zuvor die Inhibition der Chemokinrezeptoren erreicht werden, wurde die Zellsuspension mit dem monaklonalen CCR7- oder CRAM-Antikörper (Konzentration: 5 µg/ml) für 30 min bei 37 °C präinkubiert, bevor der Chemotaxis-Assay durchgeführt wurde.

4.2.4 Pseudoemperipolese (PEP)

Dieser Versuch beruht darauf, dass bei einer Kokultur von adhärennten Knochenmark-Stromazellen und malignen lymphatischen Zellen die Lymphozyten zwischen bzw. unter die Stromazellen migrieren und an sie adhärieren.

In die zuvor mit Kollagen beschichteten Vertiefungen einer 24-well Mikrotiterplatte wurden 3×10^5 Zellen der humanen Stromazelllinie HS-5, welche sich in 500 μl RPMI-Vollmedium befanden, gegeben. Über Nacht wurde die Platte im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, sodass die Stromazellen einen dichten Zellrasen in den Vertiefungen ausbildeten. Am nächsten Tag wurden die zu untersuchenden CLL-Patientenzellen zunächst zweimal gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in HBSS mit 0,1 % BSA resuspendiert. 6 ml der Zellsuspension wurden anschließend mit 3,5 μl Calcein versetzt, das in der folgenden Inkubation von 30 min bei 37 °C zur Färbung der Zellen führte. Das Calcein wird heruntergewaschen und die Zellen in 6 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert. Bevor die Zellen in die Vertiefungen gegeben wurden, wurden sie in drei Partien aufgeteilt, wobei diese wie folgt behandelt wurden:

1. Kontrolle
2. + CCR7-Antikörper (Konzentration: 5 $\mu\text{g/ml}$)
3. + CRAM-Antikörper (Konzentration: 5 $\mu\text{g/ml}$)

Anschließend wurden die Zellen in den verschiedenen Konditionen bei 37 °C für 30 min inkubiert, während der die Inhibition der Rezeptoren stattfand.

Das Medium der Stromazellen wurde abgenommen und durch 500 μl der CLL-Zellsuspension ersetzt, sodass sich 5×10^6 CLL Zellen in jeder Vertiefung befanden. Nach der anschließenden Inkubation bei 37 °C für 2 h, während der die Migration und Adhäsion der Zellen stattfand, wurde der Überstand mit den nicht adhären Zellen wieder abgenommen und gründlich mit warmem RPMI gewaschen. In jede Vertiefung wurden 200 μl vorgewärmtes Trypsin gegeben, das nach einer Einwirkzeit von ca. 1 min mit 300 μl RPMI-Vollmedium neutralisiert wurde. Medium und Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und im FACS gemessen. Basierend auf der unterschiedlichen Größe und der Calcein-Färbung konnte bei der Analyse mit FlowJo der jeweilige prozentuale Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl (Lymphozyten und Stromazellen) ermittelt werden.

4.2.5 Biochemische Methoden

4.2.5.1 Herstellen von Proteinlysaten

Die Zellen, aus denen die Lysate hergestellt werden sollten, wurden zunächst 4 h in Serum-freiem Medium bei 37 °C inkubiert, sodass alle Stoffwechselprozesse in den Zellen auf ein Minimum reduziert wurden. Anschließend erfolgte je nach gewünschter Kondition eine Stimulation mit 20 ng/ml CCL19 und/oder eine Rezeptorinhibition mit 5 µg/ml CRAM- bzw. CCR7-Antikörper. Zum Beenden der Stimulation wurde das Röhrchen mit kaltem PBS aufgefüllt und auf Eis gestellt. Nun wurde 10 min mit 1200 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abpipetiert. Nachfolgend wurden, je nach Größe der Zellpellets, 30-50 µl IP-Puffer dazugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Hierbei zerstörte der IP-Puffer die Zellmembran und lysierte die Zellen. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 1200 rpm und 4 °C wurde der Überstand, in dem sich die Proteine befanden, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

4.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration der einzelnen Lysate zu erhalten, wurde die Messung mittels Photometer angewandt. Hierzu wurden die Proben in Glaskapillaren aufgenommen. Diese wurde verschlossen in das Photometer eingesetzt und gemessen. Als Reagenzienleerwert (Blank) wurde RNase-freies Wasser benutzt. Man erhielt die Proteinkonzentration in µg/µl.

4.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine eines Lysates entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli durchgeführt. Dazu wurden zunächst 7-15 µg Protein im Verhältnis 1:3 mit Laemmli-Puffer gemischt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Danach wurden die Proben und 10 µl des Proteinmarkers jeweils in eine Geltasche des 10 %igen SDS-Polyacrylamidgels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in der Western Blot-Apparatur der Firma Bio-Rad mit Tris/HCL/Glycin-Puffer bei zunächst 100 Volt und nach ca. 10 min bei 130 Volt für ca. 2 h.

4.2.5.4 Western Blot

Bei diesem Verfahren wurden die Proteine, die sich nach der SDS-PAGE im Gel befanden, im Semi-Dry-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese musste zunächst in 100 % Methanol für 30-40 sec. aktiviert werden, bevor sie verwendet werden konnte.

Nachdem die Materialien in Transferpuffer getränkt und in der Reihenfolge

- Anode
- Filterpapier
- Transfermembran
- Gel
- Filterpapier
- Kathode

in die Western Blot-Kammer gelegt wurden, folgte der Proteintransfer von dem Gel auf die Membran bei 12 V für 50 min. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, schloss sich die Inkubation mit Blocking-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur an.

Spezifische Proteine konnten nun auf der Membran detektiert werden. Hierzu erfolgte zunächst die Inkubation mit dem Primärantikörper, welcher in Waschpuffer mit 2,5 % BSA gelöst wurde, über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer für je 10 min wurde die Membran 1 h mit dem Sekundärantikörper (ebenfalls in Waschpuffer mit 2,5 % BSA) inkubiert. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, schloss sich nach erneutem Waschen für 1 h die Inkubation mit 2 ml der ECL Plus Lösung an. Im Entwickler konnten dadurch nach Belichtung die zuvor markierten Proteine auf Röntgenfilmen im Entwickler sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung der Banden wurde mit der Software ImageJ durchgeführt.

5 Ergebnisse

5 Ergebnisse

5.1 Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurden Proben von 81 CLL-Patienten untersucht. Diese sind Patienten der Uniklinik Freiburg Abteilung Hämatologie/Onkologie, deren Blutproben vor Ort im CCCF entnommen und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Davon konnten 58 für die durchgeführten Versuche verwendet werden, während 23 aufgrund des zu geringen Anteils (< 85 %) von B-Lymphozyten an der Gesamtzellzahl aussortiert wurden. Unter den 58 CLL-Patienten (Tabelle 5-1) waren 44 Männer und 14 Frauen im Alter von 39 bis 89 Jahren. Das mittlere Alter lag bei 67,5 Jahren (Median: 69 Jahre). 12 (20,7 %) Patienten befand sich zum Zeitpunkt der Blutabnahme im Rai-Stadium 0, 5 (8,6 %) im Rai-Stadium I, 25 (43,1 %) im Rai-Stadium II, 3 (5,2 %) im Rai-Stadium III und 13 (22,4 %) im Rai-Stadium IV. 35 (60,3 %) Patienten wiesen eine Lymphadenopathie auf, 23 (39,7 %) nicht. Die Zellen von 28 CLL-Patienten wurden hinsichtlich der ZAP-70-Expression überprüft. Dabei waren 17 (60,7 %) Patienten ZAP-70 negativ und 11 (39,3 %) ZAP-70 positiv.

Tabelle 5-1: Charakteristika des Patientenkollektivs.

Patientencharakteristika		Anzahl bzw. Alter (Prozent)	
Gesamt		58	
Geschlecht	Männlich	44 (75,9 %)	
	Weiblich	14 (24,1 %)	
Alter (Jahre)		39 – 89 Mittelwert: 67,5 (Median: 69)	
Rai-Stadium	0	12 (20,7 %)	Mittleres Alter: 69,8
	I	5 (8,6 %)	67,6
	II	25 (43,1 %)	65
	III	3 (5,2 %)	70,3
	IV	13 (22,4 %)	69,3

Patientencharakteristika	Anzahl bzw. Alter (Prozent)
Lymphadenopathie ja	35 (60,3 %)
nein	23 (39,7 %)
ZAP-70 gesamt	28
positiv	11 (39,3 %)
negativ	17 (60,7 %)

5.2 CRAM- und CCR7-Oberflächenexpression

Die CLL-Patienten werden zum einen anhand ihres Krankheitsstadiums nach Rai eingeteilt (Rai 0-IV). Diese Klassifikation findet vorwiegend in den USA Anwendung und berücksichtigt die Faktoren Lymphozytose, Lymphadenopathie, Hepato- und Splenomegalie, Anämie und Thrombopenie (Tabelle 2-1). Dabei zeigt sich die Krankheit im Stadium 0 mit lediglich einer Lymphozytose nahezu asymptomatisch, während sie im Stadium IV mit dem Auftreten einer Thrombopenie bereits weit fortgeschritten ist.

Um die Korrelation der Expressionslevel von CRAM und CCR7 mit dem Rai-Stadium der Patienten zu untersuchen, wurde die Oberflächenexpression der beiden Rezeptoren auf B-Lymphozyten der 58 CLL-Patienten mittels Fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchflusszytometrisch bestimmt. Die Expression war bei den CLL-Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) lagen zwischen 2,77 und 54,99 für CRAM und zwischen 18,73 und 733,8 für CCR7.

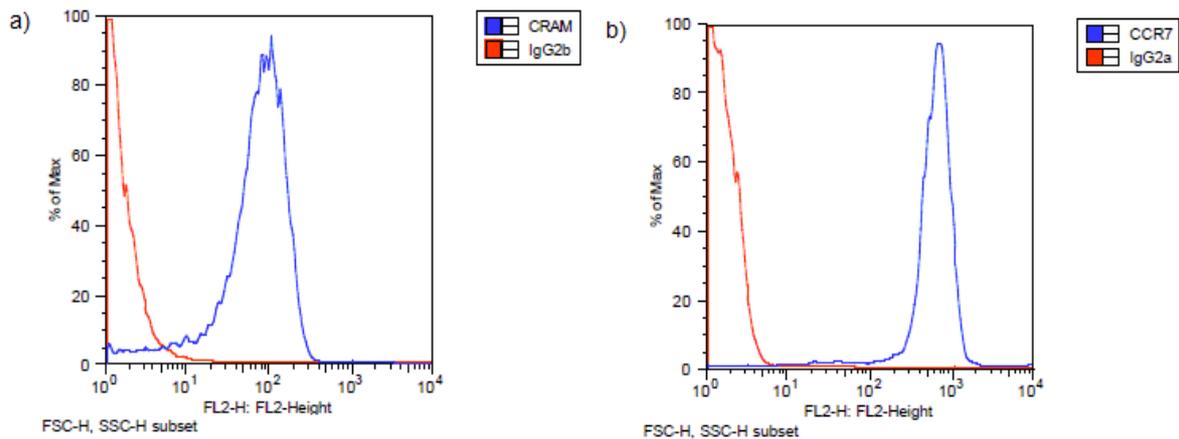


Abbildung 5.1: Repräsentatives Beispiel der CRAM- und CCR7-Expression eines CLL-Patienten. a) zeigt die CRAM-Expression, b) die CCR7-Expression. In blau ist jeweils die Rezeptor-expression, in rot die Isotypkontrolle dargestellt.

Mit Hilfe einer Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Höhe der CRAM- und CCR7-Expressionen nicht mit dem Krankheitsstadium der Patienten korrelierte.

Zum anderen wurde die Klassifikation der CLL-Patienten anhand des Auftretens einer eventuellen Lymphadenopathie vorgenommen, wobei kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein vergrößerter Lymphknoten und dem Rezeptorexpressionslevel bestand (Wilcoxon Rangsummentest). Zwischen der Höhe der CRAM- und der CCR7-Expression wurde in dieser Arbeit kein Zusammenhang nachgewiesen.

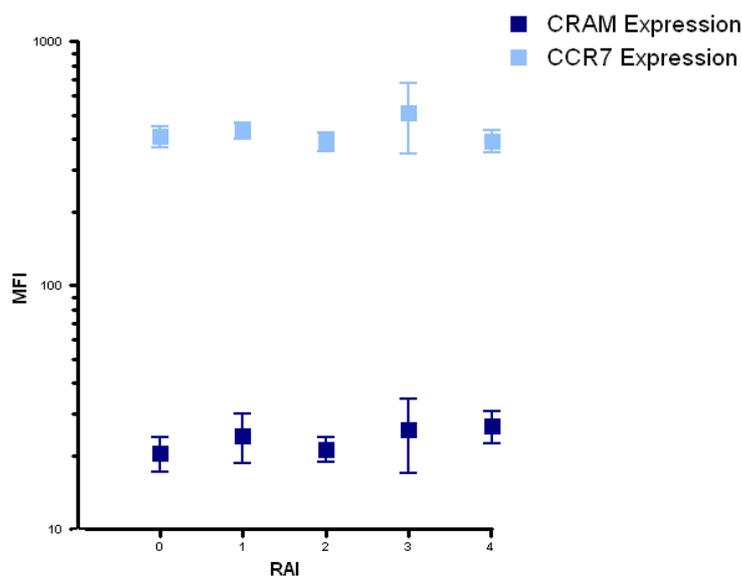


Abbildung 5.2: CRAM- und CCR7-Rezeptorexpression in Abhängigkeit vom Rai-Stadium der CLL-Patienten. $n=58$ Es besteht keine signifikante Korrelation zwischen der CRAM- bzw. CCR7-Expression und dem Rai-Stadium. (Pearson Test, Mittelwert \pm SEM)

Zusätzlich wurde kontrolliert, inwieweit die Rezeptorexpression mit der ZAP-70-Expression, einem prognostischen Faktor, in Relation steht (Abbildung 5.3). Sind die B-Zellen eines Patienten ZAP-70 negativ, d.h. liegt die Expression bei $< 20\%$, korreliert dies mit einer guten Prognose. Bei ZAP-70 positiven Zellen mit einer Expression $> 20\%$ wird dagegen eine schlechtere Prognose für den Patienten angenommen (Parker und Strout, 2011). Die Untersuchung der B-Lymphozyten von 28 CLL-Patientenzellen ergab, dass kein Zusammenhang zwischen der CRAM- und CCR7-Expression und der ZAP-70-Expression bestand.

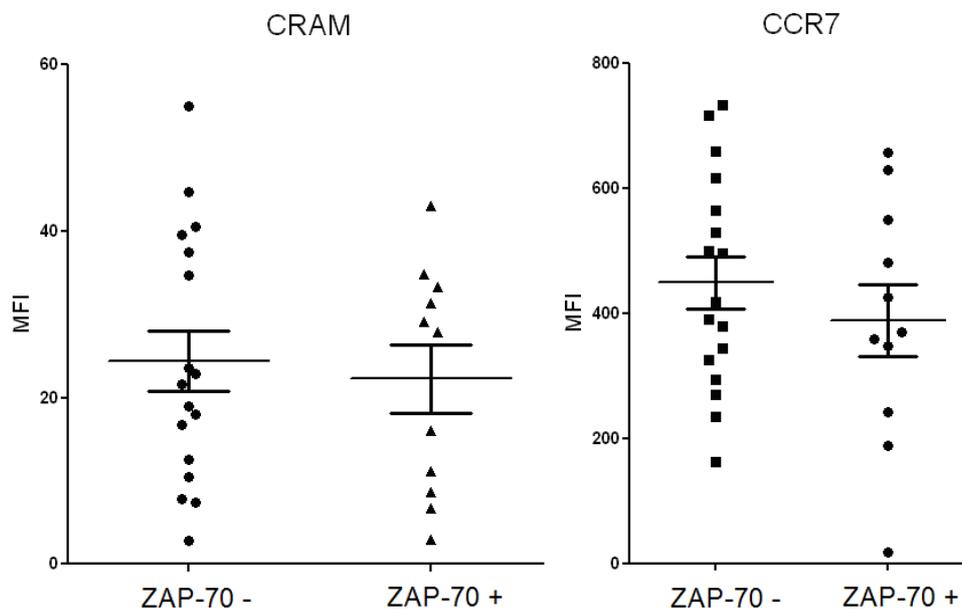


Abbildung 5.3: Rezeptorexpression von CLL-Patienten, eingeteilt anhand deren ZAP70-Expression. $n=28$ Kein signifikanter Unterschied zwischen der CRAM- und CCR7-Rezeptorexpression bei ZAP-70 positiven und ZAP-70 negativen CLL-Zellen. (Ungepaarter t-Test, Mittelwert \pm SEM)

Um einen Vergleichswert zu erhalten, wurde die Rezeptorexpression ebenfalls auf B-Zellen von gesunden Spendern kontrolliert (Abbildung 5.4). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression des atypischen Rezeptors CRAM auf B-Lymphozyten von deren Reifegrad abhängt (Hartmann et al., 2008). Dabei zeigte sich, dass CRAM auf der Oberfläche von pro- und prä-B-Zellen sowie von reifen B-Lymphozyten konstant exprimiert wird. Die CLL-Patientenzellen wiesen im Vergleich zu B-Lymphozyten gesunder Spender eine signifikant höhere Oberflächenexpression der Rezeptoren CRAM und CCR7 auf (Abbildung 5.5).

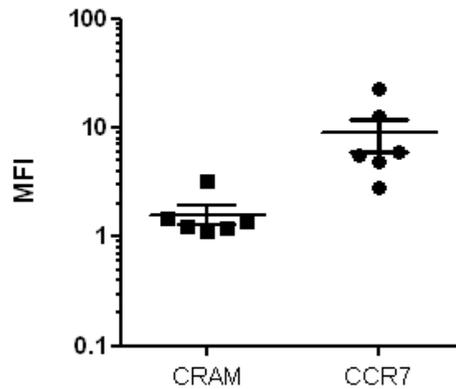


Abbildung 5.4: CRAM- und CCR7-Rezeptorexpression reifer B-Zellen gesunder Spender. $n=6$
Die Mittlere Fluoreszenzintensität liegt für CRAM bei 1,8 und für CCR7 bei 8,6. (Mittelwert \pm SEM)

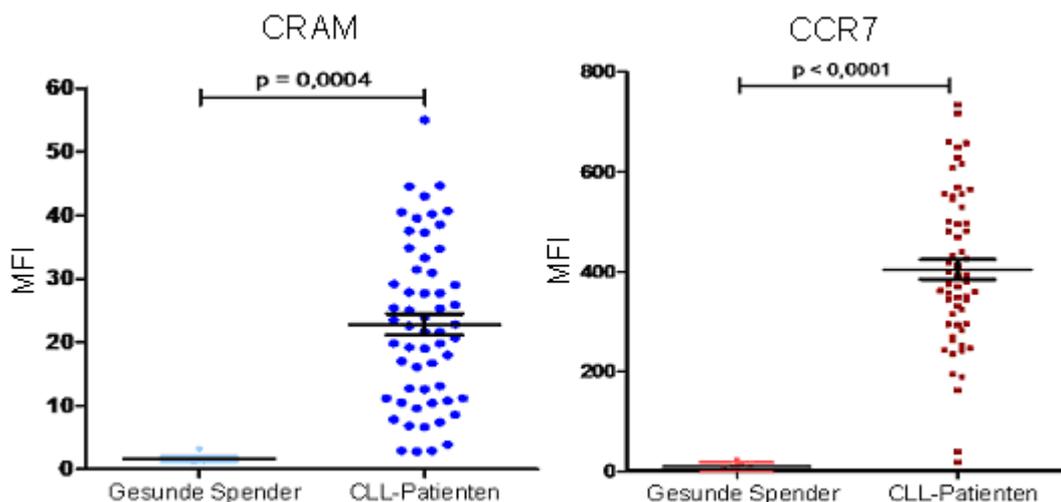


Abbildung 5.5: Vergleich der CRAM- und CCR7-Expression gesunder Spender und CLL-Patienten. Die Expression beider Rezeptoren auf CLL-Patientenzellen ist signifikant erhöht. (Ungepaarter t-Test, Mittelwert \pm SEM)

5.3 Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21

Die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen ist notwendig für die Metastasierung eines Primärtumors. Die Chemotaxis der B-Lymphozyten entlang eines Chemokingradienten führt bei der Chronischen lymphatischen Leukämie zur Infiltrierung von Lymphknoten und verursacht dadurch Lymphadenopathien. Eine wichtige Rolle bei der Chemotaxis konnte dem klassischen Chemokinrezeptor CCR7 und seinen Liganden, CCL19 und CCL21, nachgewiesen werden.

Um das Migrationsverhalten von CLL-Patientenzellen zu analysieren, wurden Chemotaxis-Assays durchgeführt. Dabei wanderten die Zellen der CLL-Patienten

entlang eines Chemokingradienten durch einen Filter in die untere Kammer des Chemotaxis-Systems. Darin befanden sich die Chemokine CCL19 bzw. CCL21 in einer Konzentration von 100 ng/ml. Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem die untere Kammer reinen Puffer ohne Chemokin enthielt. Dadurch konnte der chemotaktische Index berechnet werden.

Es zeigte sich, dass der chemotaktische Index in allen Versuchen nach Zugabe der Chemokine im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht war. Fand man bei den einzelnen Patienten Unterschiede bei der Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21 (Abbildung 5.6), so konnte zusammengefasst keine stärkere Tendenz für eines der beiden Chemokine nachgewiesen werden (Abbildung 5.7).

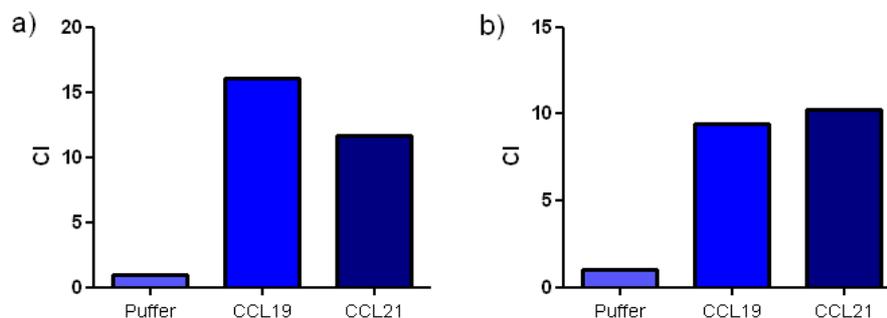


Abbildung 5.6: Repräsentative Beispiele zweier Chemotaxis-Versuche mit CLL-Patientenzellen. Es findet eine starke Migration in Richtung CCL19 und CCL21 (jeweils 100 ng/ml) statt. **a)** Die B-Lymphozyten dieses Patienten zeigen eine deutlich stärkere Chemotaxis in Richtung CCL19 im Vergleich zu CCL21. **b)** Bei diesem Patienten ist die Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21 ähnlich stark.

Nicht nur der klassische Chemokinrezeptor CCR7, sondern auch der atypische Chemokinrezeptor CRAM, nehmen bekanntermaßen Einfluss auf die Zellmigration und die Aktivierung intrazellulärer Signalwege (Catusse et al., 2010). Nachdem dieser Versuch mit Proben der 58 Patienten durchgeführt wurde, konnte der chemotaktische Index jedes Patienten mit der jeweiligen Rezeptorexpression verglichen werden. Es wurde keine Korrelation zwischen der Expression von CRAM oder CCR7 und dem chemotaktischen Index nachgewiesen. Es bestand kein Zusammenhang zwischen der Migrationsrate und der ZAP-70-Expression. Ebenso wurden keine Korrelationen zwischen dem Rai-Stadium der Patienten (Abbildung 5.7) bzw. dem Auftreten einer Lymphadenopathie und dem chemotaktischen Index nachgewiesen (Wilcoxon Rangsummentest). Allerdings war bei Zellen von CLL-Patienten im Rai-Stadium IV im Vergleich zu Patienten im Rai-Stadium 0 eine

verstärkte Chemotaxis zu beobachten, wobei mit einem p-Wert von 0,0611 die statistische Signifikanz beinahe erreicht wurde. Das CCR7- und CRAM-Expressionslevel hatte jeweils keinen Effekt auf das Migrationsverhalten der CLL-Patientenzellen.

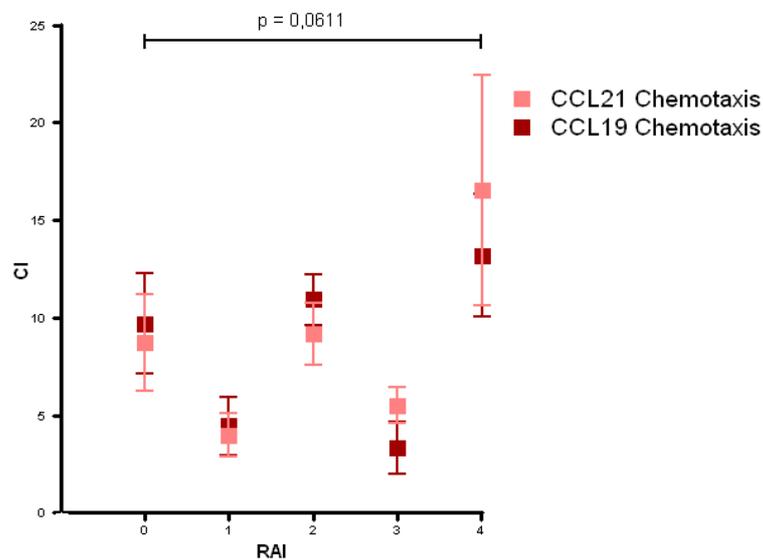


Abbildung 5.7: Mittelwerte der chemotaktischen Indizes in Abhängigkeit des Rai-Stadiums der Patienten. $n=58$ Es liegt keine Korrelation zwischen chemotaktischem Index und dem Rai-Stadium der Patienten vor. (Wilcoxon Rangsummentest, Mittelwert \pm SEM)

Um das Migrationsverhalten von CLL-Patientenzellen mit dem von B-Lymphozyten gesunder Spender zu vergleichen, wurde eine Kontrolle mit B-Lymphozyten von gesunden Spendern durchgeführt. Es zeigte sich eine ähnliche Tendenz im Migrationsverhalten, wobei eine starke Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21 detektiert wurde (Abbildung 5.8).

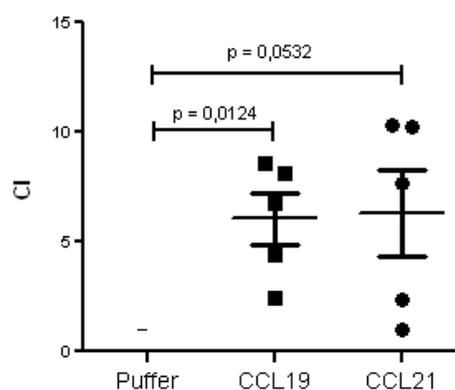


Abbildung 5.8: Chemotaktischer Index der gesunden Spender. $n=5$ Die starke Migration in Richtung CCL19 und CCL21 (jeweils 100 ng/ml) ist zu erkennen. (Gepaarter t-Test, Mittelwert \pm SEM)

5.3.1 Chemotaxis nach Rezeptorinhibition

Nicht nur der klassische Chemokinrezeptor CCR7, sondern auch CRAM als atypischer Chemokinrezeptor nehmen bekanntermaßen Einfluss auf die Migration von CLL-Zellen (Catusse et al., 2010). In diesem Assay wurde untersucht, inwieweit das Migrationsverhalten der CLL-Patientenzellen in Richtung CCL19 und CCL21 von den Rezeptoren CRAM und CCR7 abhängt. Aus diesem Grund wurden die Rezeptoren CRAM und CCR7 mittels monoklonaler Antikörper inhibiert, indem die Zellen mit einem CRAM- bzw. CCR7-Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml für 30 min präinkubiert wurden. Danach wurde der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt.

Wurde der klassische Rezeptor CCR7 inhibiert, war eine deutliche Reduktion der Chemotaxis in Richtung CCL19 oder CCL21 festzustellen. Nach CRAM-Inhibition war keine Änderung des Migrationsverhaltens der CLL-Zellen detektierbar (Abbildung 5.9).

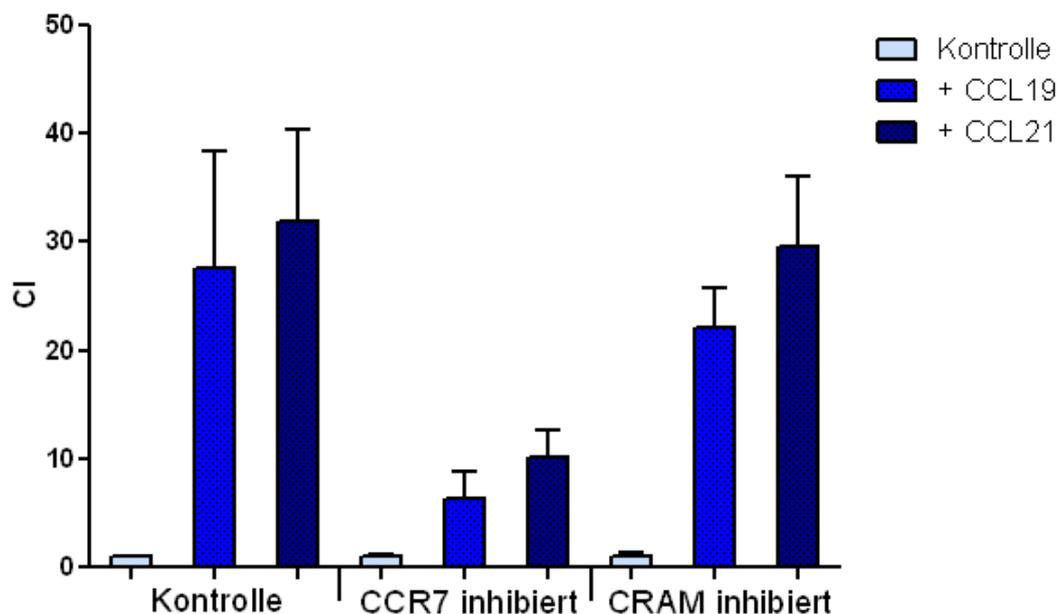


Abbildung 5.9: Chemotaxis von CLL-Patientenzellen nach Inhibition der Rezeptoren CRAM und CCR7. n=3 Die Inhibition von CCR7 durch einen monoklonalen Antikörper (5 µg/ml) reduziert die Chemotaxis in Richtung CCL19 oder CCL21 (jeweils 100 ng/ml). Die CRAM-Inhibition durch einen Antikörper (5 µg/ml) hat keinen Effekt auf das Migrationsverhalten der Zellen. (Gepaarter t-Test, Mittelwert + SD)

5.4 Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3

Sowohl die extrazellulär regulierte Kinase ERK1/2 als auch STAT3 als Transkriptionsfaktor beeinflussen Wachstum, Differenzierung und Apoptose verschiedener Zellen (Robinson und Cobb, 1997; Rawlings et al., 2004). Aus diesem Grund spielen sie auch bei der CLL eine wichtige Rolle.

Mittels Western Blot Analysen wurde die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von ERK1/2 und STAT3 untersucht. Bei der Herstellung der Proteinlysate wurden die CLL-Patientenzellen zunächst 4 h in serumfreiem Medium kultiviert und je nach Kondition anschließend mit CCR7- oder CRAM-Antikörpern und/oder CCL19 präinkubiert.

Um die optimale Stimulationszeit zu ermitteln, wurde ein repräsentativer Zeitverlauf erstellt (Abbildung 5.10). Es zeigte sich, dass nach einer Stimulation mit CCL19 von 5 min das beste Ergebnis erzielt werden konnte, sodass bei allen weiteren Versuchen diese Inkubationszeit eingehalten wurde.

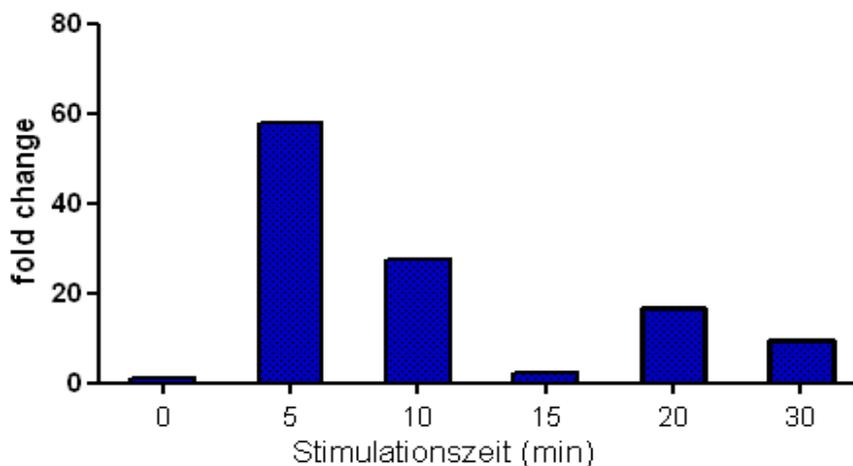


Abbildung 5.10: Phosphorylierung der MAPK p44/42 (ERK1/2). Stimulation mit 100 ng/ml CCL19 (0, 5, 10, 15, 20, 30 Minuten). Die stärkste Aktivierung ist nach einer Stimulation von 5 min zu beobachten.

Die weiteren Untersuchungen wurden jeweils unter folgenden Konditionen durchgeführt:

- Kontrolle
- stimuliert mit CCL19 (20 ng/ml – 5 min)
- CCR7 inhibiert (anti-hCCR7, 5 µg/ml – 30 min)
- CCR7 inhibiert, stimuliert mit CCL19
- CRAM inhibiert (anti-hCRAM-A/B, 5 µg/ml – 30 min)
- CRAM inhibiert, stimuliert mit CCL19

5.4.1 Phosphorylierung von ERK1/2

Die ERK1/2 Phosphorylierung wurde durch Stimulation der CLL-Patientenzellen mit CCL19 induziert (Abbildung 5.11). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war nach Stimulation mit CCL19 ein weitaus stärkeres Signal zu erkennen. Die Inhibition des Chemokinrezeptors CCR7 führte verglichen mit der CCL19-stimulierten Kontrolle zu einer deutlichen Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung. Dagegen hatte die CRAM-Inhibition einen positiven Effekt auf die Phosphorylierung, sodass das Signal im Vergleich zur CCL19-stimulierten Kontrolle deutlich verstärkt war.

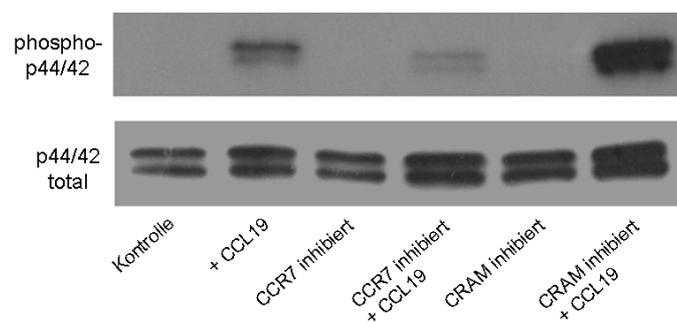


Abbildung 5.11: Repräsentativer Western Blot eines CLL-Patienten. Die Stimulation mit CCL19 (20 ng/ml) führt zur Phosphorylierung der MAPK p44/42 (ERK1/2). Die CCR7-Inhibition durch einen monoklonalen Antikörper (5 µg/ml) reduziert das Signal, die CRAM-Inhibition (monoklonaler Antikörper: 5 µg/ml) verstärkt das Signal im Vergleich zur CCL19-stimulierten Kontrolle.

Als Kontrolle wurde dieser Versuch ebenfalls mit Zellen von gesunden Spendern durchgeführt. Die densitometrische Auswertung der Ergebnisse zeigte ähnliche Tendenzen (Abbildung 5.12). Die CCR7-Inhibition führte zu einer Reduktion des Signals, während die CRAM-Inhibition das Signal verstärkte.

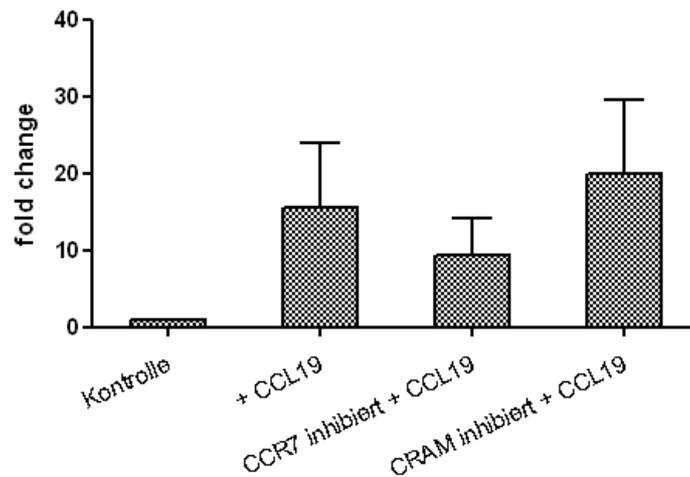


Abbildung 5.12: Phosphorylierung von ERK1/2; B-Lymphozyten von gesunden Spendern. $n=3$ Die Inhibition von CCR7 durch einen monoklonalen Antikörper ($5 \mu\text{g/ml}$) führt zur Reduktion, die Inhibition von CRAM (monoklonaler Antikörper: $5 \mu\text{g/ml}$) zur Verstärkung des Signals. (Gepaarter t-Test, Mittelwert + SD)

5.4.2 Phosphorylierung von STAT3

Zu Beginn dieser Versuchsreihe wurde gezeigt, dass bei CLL-Patientenzellen durch die Stimulation mit CCL19 lediglich eine vermehrte STAT3-Phosphorylierung am Serinrest auf der Transkriptionsaktivierungsdomäne (Serin 727) von STAT3 α induziert wurde. Eine Phosphorylierung am Tyrosinrest (Tyrosin 705) konnte nicht nachgewiesen werden.

Bereits ohne Stimulation mit CCL19 konnte eine STAT3-Phosphorylierung am Serinrest detektiert werden (Abbildung 5.13). Trotz dieser konstitutiven Aktivierung induzierte die Stimulation mit CCL19 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine Verstärkung des Signals.

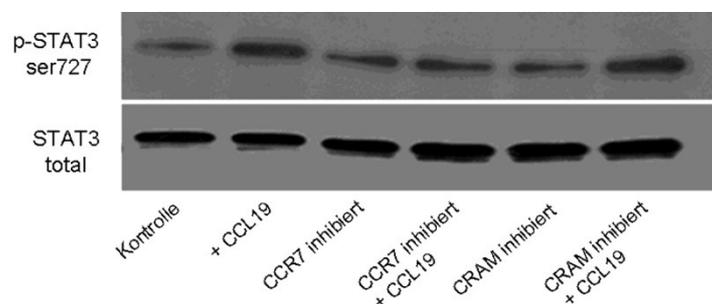


Abbildung 5.13: Repräsentativer Western Blot eines CLL-Patienten. Die konstitutive Aktivierung von STAT3 ist zu erkennen. Die Stimulation mit CCL19 (20 ng/ml) verstärkt das Signal im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

In der densitometrischen Auswertung wurde besonders deutlich, dass nach CCR7-Inhibition das Signal im Vergleich zur CCL19-stimulierten Kontrolle gemindert und nach CRAM-Inhibierung verstärkt wurde (Abbildung 5.14).

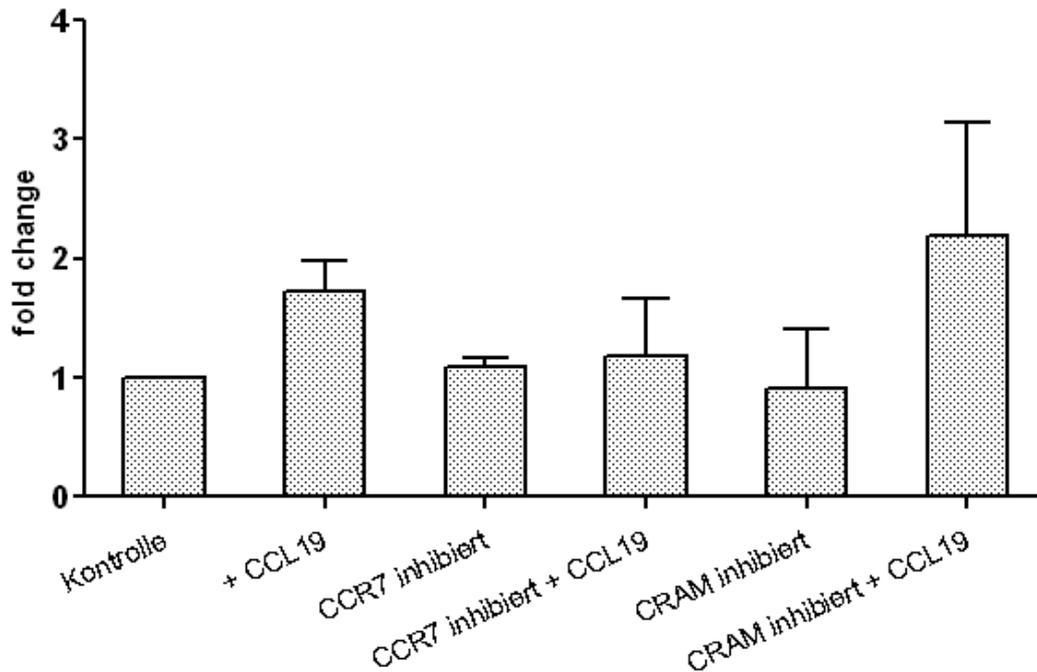


Abbildung 5.14: Phosphorylierung von STAT3; CLL-Patientenzellen. $n=5$ Die Stimulation mit CCL19 (20 ng/ml) erhöht das Signal im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Das verminderte Signal nach CCR7-Inhibition mit einem monoklonalen Antikörper (5 $\mu\text{g/ml}$) und das verstärkte Signal nach CRAM-Inhibition (monoklonaler Antikörper: 5 $\mu\text{g/ml}$) im Vergleich zur CCL19-stimulierten Kontrolle sind zu erkennen. (Gepaarter t -Test, Mittelwert + SD)

Als Kontrolle wurden diese Versuche ebenfalls mit Zellen von gesunden Spendern durchgeführt. Hierbei wurde keine konstitutive STAT3-Phosphorylierung am Serinrest nachgewiesen (Abbildung 5.15). Eine Stimulation mit CCL19 führte zur Phosphorylierung von STAT3 ser727. Die CCR7-Inhibition hatte auch hier hemmenden Effekt auf die Phosphorylierung, während die Inhibition von CRAM keine Auswirkungen auf die Stärke des Signals hatte.

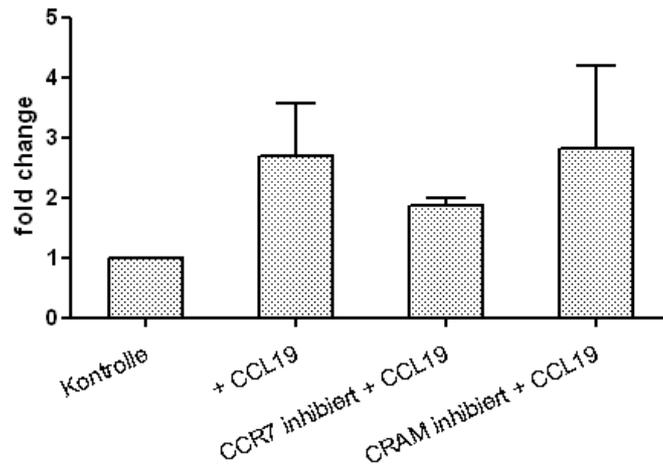


Abbildung 5.15: Phosphorylierung von STAT3 ser727; B-Lymphozyten von gesunden Spendern. $n=5$ CCL19 (20 ng/ml) induziert die Phosphorylierung von STAT3. CCR7-Inhibition mit einem monoklonalen Antikörper (5 μ g/ml) reduziert das Signal im Vergleich zur CCL19-stimulierten Kontrolle. Die CRAM-Inhibition (monoklonaler Antikörper: 5 μ g/ml) hat keinen Einfluss auf die STAT3-Phosphorylierung. (Gepaarter t-Test, Mittelwert + SD)

5.5 Pseudoemperipoese

Bei der Pseudoemperipoese handelt es sich um einen Versuch, bei dem CLL-Patientenzellen in vitro unter die Stromazellen migrieren und an diese adhären. Hierbei wurde das Verhalten der Zellen bei Homing-Prozessen in vivo imitiert.

In diesem Experiment wurde überprüft, welchen Einfluss die Rezeptoren CRAM und CCR7 auf das Migrations- und Adhäsionsverhalten der CLL-Patientenzellen haben. Dazu wurde die Aktivität der Rezeptoren CCR7 und CRAM durch die Präinkubation mit den jeweiligen monoklonalen Antikörpern inhibiert.

24 h vor Versuchsbeginn wurden die Stromazellen (Zelllinie HS5) auf einer mit Kollagen beschichteten 24-well Mikrotiterplatte ausgesät, sodass diese einen dichten Zellrasen bildeten. Die Kokultivierung von CLL-Patientenzellen mit den Stromazellen dauerte 2 h, während der Migration und Adhäsion stattfinden konnten.

Sowohl die Inhibition des klassischen Rezeptors CCR7 als auch die CRAM-Inhibition hatte einen stark hemmenden Effekt auf die Adhäsion der CLL-Patientenzellen an Stromazellen (Abbildung 5.16). Dabei war der Effekt nach CRAM-Inhibition deutlich stärker als nach CCR7-Inhibition.

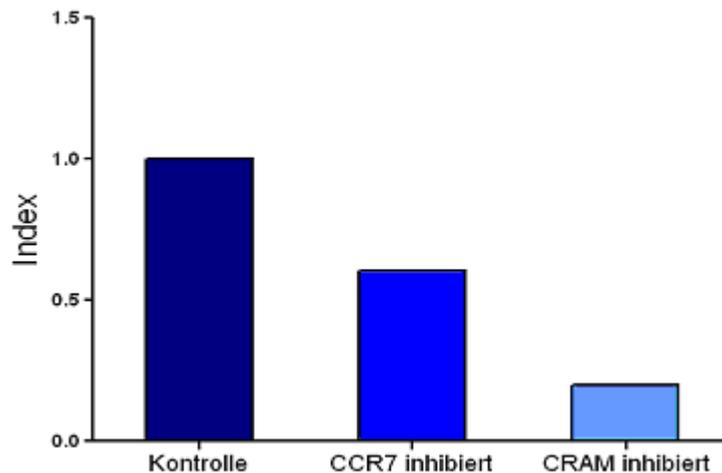


Abbildung 5.16: Repräsentative Pseudoemperipolese mit CLL-Patientenzellen. Die CRAM- und CCR7-Inhibition durch einen monoklonalen Antikörper (5 µg/ml) reduziert die Adhäsion der CLL-Patientenzellen an Stromazellen deutlich, wobei die CRAM-Inhibition im Vergleich zur CCR7-Inhibition einen noch stärkeren Einfluss hat.

5.6 Apoptose-Assay

Die Chronische lymphatische Leukämie ist gekennzeichnet durch das Auftreten einer Lymphozytose. Dieser liegt nicht alleine eine Überproduktion von B-Lymphozyten zugrunde, sondern es besteht zudem ein Fehler im programmierten Zelltod. Dadurch ist die Lebenszeit der Tumorzellen im Vergleich zu B-Lymphozyten gesunder Personen erhöht (Seke Etet et al., 2012). Im Apoptose-Assay wurde untersucht, inwieweit die Chemokine CCL19 und CCL21, als Liganden von CCR7 und CRAM, einen Einfluss auf die Überlebenszeit der CLL-Patientenzellen haben.

Die Zellen wurden für 72 h mit den Chemokinen CCL19 und CCL21, jeweils in einer Konzentration von 0,5 µg/ml, inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zugabe von Chemokinen. Danach folgte die Färbung mit DiOC6 und PI um die Zellen bei der durchflusszytometrischen Analyse in drei Fraktionen (lebend, apoptotisch, tot) einzuteilen (Abbildung 5.17).

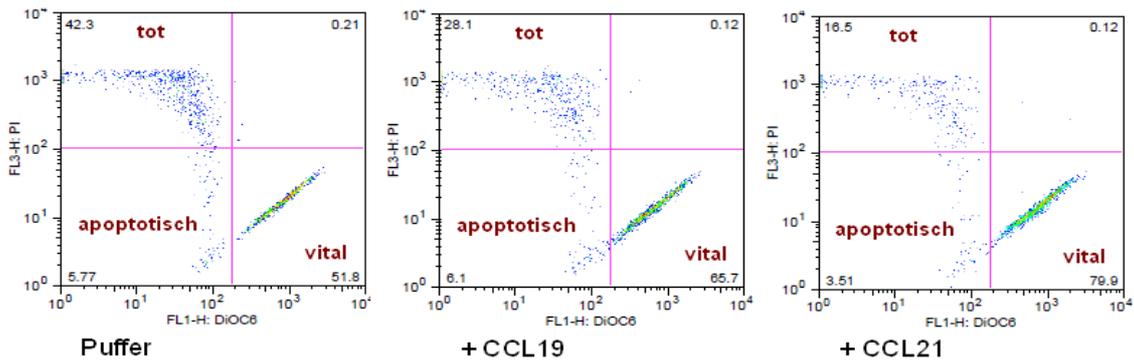


Abbildung 5.17: Repräsentative FACS-Analyse eines Apoptose-Assays mit CLL-Zellen eines Patienten. (Chemokinkonzentration: 0,5 µg/ml) Auswertung nach 72 h Inkubation. Kontrolle: 51,8 % vitale Zellen; mit CCL19: 65,7 %, mit CCL21: 79,9 % vitale Zellen.

Die Stimulation mit CCL19 oder CCL21 führte jeweils zu einer moderaten, aber dennoch signifikanten Steigerung der Vitalität der CLL-Patientenzellen (Abbildung 5.18). Nach 72 h war der prozentuale Anteil vitaler Zellen an der Gesamtpopulation um ca. 5 % erhöht. Ein Unterschied zwischen CCL19 und CCL21 war dabei nicht zu erkennen.

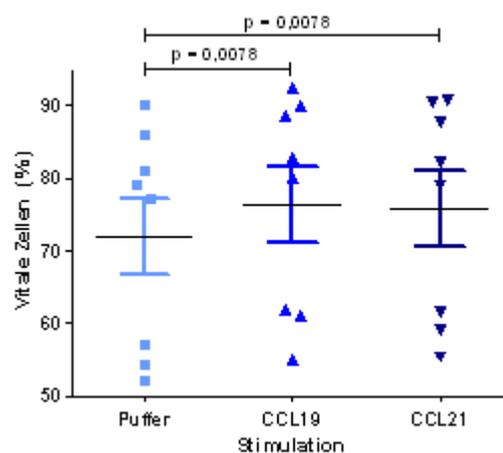


Abbildung 5.18: Auswertung der Apoptose-Assays der CLL-Patienten. n=8 Nach Zugabe von CCL19 oder CCL21 (jeweils 0,5 µg/ml) ist der Anteil vitaler Zellen signifikant erhöht. (Wilcoxon Rangsummentest, Mittelwert ± SEM)

Zur Kontrolle wurde auch dieser Versuch mit B-Zellen von gesunden Spendern durchgeführt (Abbildung 5.19). Dabei war die Vitalität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle lediglich nach Stimulation mit CCL21 erhöht, wobei jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte. CCL19 hatte keinen Effekt auf den Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtpopulation.

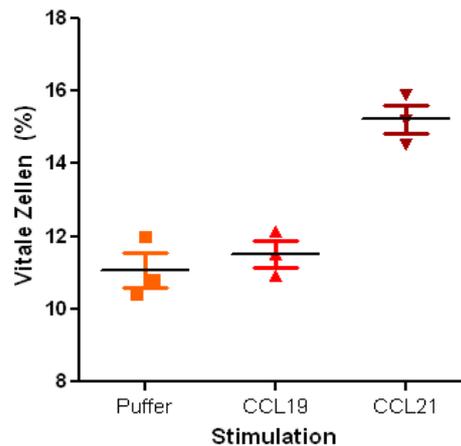


Abbildung 5.19: Apoptose-Assay mit B-Lymphozyten von gesunden Spendern. $n=3$ Nach Stimulation mit CCL21 ($0,5 \mu\text{g/ml}$) ist der Anteil vitaler Zellen erhöht. CCL19 ($0,5 \mu\text{g/ml}$) hatte keinen Effekt auf das Überleben der Zellen. (Wilcoxon Rangsummentest, Mittelwert \pm SEM)

Im Versuch mit CLL-Patientenzellen war nach 72 h der durchschnittliche prozentuale Anteil vitaler Zellen an der Gesamtpopulation mit ca. 75 % deutlich höher, als dies bei der gesunden Kontrolle mit ca. 11 % zu beobachten war.

5.7 Zellzyklus-Assay

Zusätzlich zu der Messung der Apoptoserate wurde auch eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die Zellzyklusphase ermittelt, in der sich die CLL-Patientenzellen zum Zeitpunkt der Analyse befanden. Es wurde untersucht, ob die Stimulation der Zellen mit den Chemokinen CCL19 und CCL21 deren Anzahl in der Synthesephase (S-Phase) verändert.

Hierzu wurden die CLL-Patientenzellen analog zum Apoptose-Assay für 72 h mit CCL19 bzw. CCL21 bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Es folgten die Fixierung mit Ethanol und die Inkubation für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ mit der Zellzyklus-Färbelösung. Um die Anzahl der Zellen in der S-Phase in der Kontrolle und in dem Ansatz mit Chemokin vergleichen zu können, wurde der Index wie folgt berechnet:

$$\text{Index} = \frac{\text{prozentualer Anteil der Zellen in der S - Phase}}{\text{prozentualer Anteil der Zellen in der S - Phase der Negativkontrolle}}$$

Die Auswertung ergab, dass die Stimulation der CLL-Patientenzellen mit CCL19 und CCL21 keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklusstatus der Zellen hatte (Abbildung 5.20).

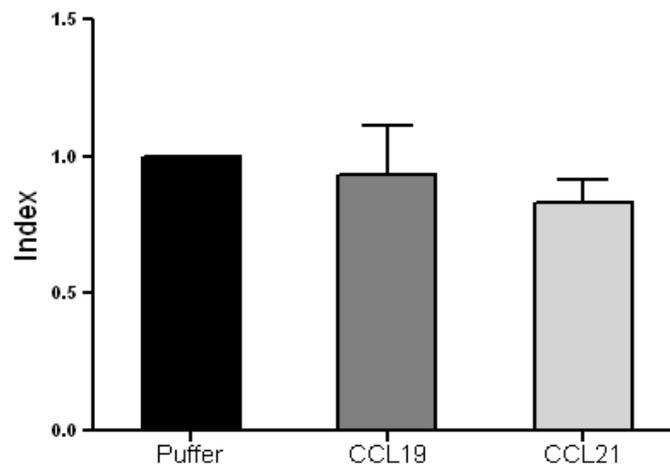


Abbildung 5.20: Zellzyklus-Assay von CLL-Patientenzellen nach 72 h Inkubation mit Chemokinen. $n=3$ Die Chemokine CCL19 und CCL21 (jeweils $0,5 \mu\text{g/ml}$) haben keinen deutlichen Einfluss auf die Anzahl der Zellen in der S-Phase. (Gepaarter t-Test, Mittelwert + SD)

6 Diskussion

6 Diskussion

6.1 Erhöhte Rezeptorexpression auf CLL-Patientenzellen

In dieser Arbeit konnte auf CLL-Patientenzellen eine variable CRAM-Expression nachgewiesen werden, wobei diese im Vergleich zu B-Lymphozyten gesunder Spender im Mittel dennoch stark erhöht war. Die starke Expression konnte bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe bei Mec-1, einer humanen CLL-Zelllinie, und ebenfalls bei wenigen CLL-Patientenzellen (Catusse et al., 2010) gezeigt werden. Hier konnte dies bei 58 Patientenproben im Vergleich zu gesunden B-Lymphozyten von gesunden Spendern bestätigt werden. Eine Ursache für die beobachtete Variabilität der CRAM Expression könnte eine Korrelation mit dem unterschiedlichen Krankheitsverlauf der Patienten sein.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte im Jahre 2008 erstmals die Oberflächenexpression des atypischen Chemokinrezeptors CRAM auf B-Lymphozyten nachgewiesen werden (Hartmann et al., 2008). Dabei zeigte sich, dass die CRAM-Expressionsrate stark vom Reifegrad der B-Zellen abhängt. In dem frühen Entwicklungsstadium der pro- und prä-B-Zellen lag eine starke Expression vor, die bei unreifen B-Lymphozyten nicht mehr und bei reifen wieder nachweisbar war. Zuvor war die CRAM-Expression lediglich für T-Lymphozyten, NK-Zellen, neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und CD34⁺ Zellen beschrieben (Migeotte et al., 2002). In aktuelleren Untersuchungen konnte hingegen keine CRAM-Expression auf T-Lymphozyten detektiert werden (Leick et al., 2009).

Außerdem konnten Interaktionen zwischen dem atypischen Chemokinrezeptor CRAM und dem klassischen Chemokinrezeptor CCR7 festgestellt werden (Catusse et al., 2010). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zusätzlich zur CRAM-Expression ebenfalls die Oberflächenexpression von CCR7 auf CLL-Patientenzellen untersucht.

Es zeigte sich eine konstant hohe Oberflächenexpression des Rezeptors CCR7 auf B-Zellen der 58 CLL-Patienten. Es waren kleinere Schwankungen sichtbar, die jedoch im Vergleich zu der Variabilität der CRAM-Expression vernachlässigbar gering waren. In weiteren Publikationen wurde ebenfalls von einer stark erhöhten

CCR7-Expression auf CLL-Zellen berichtet (Wong und Fulcher, 2004; Cuesta-Mateos, 2010; Ghobrial et al., 2004). Als Vergleichswerte wurde die CCR7-Expression auf B-Zellen gesunder Spender herangezogen. Sowohl in dieser Arbeit, als auch in bereits veröffentlichter Literatur konnte lediglich eine geringe CCR7-Expression detektiert werden (Chunsong et al., 2006).

Dem klassischen Chemokinrezeptor CCR7 werden unter physiologischen Bedingungen wichtige Aufgaben innerhalb des Immunsystems zugesprochen. CCR7 ist an der Migration der Zellen des Immunsystems in Lymphknoten und ihrer Positionierung innerhalb der Lymphknoten beteiligt. Die Chemokine CCL19 und CCL21, die Liganden von CCR7, werden konstitutiv exprimiert und kontrollieren die Zellmigration während der Immunzell-Homöostase (Förster et al., 2008). Durch die Fähigkeit, die Migration von Lymphozyten zu kontrollieren, könnte CCR7 bei der Chronischen lymphatischen Leukämie eine Rolle spielen (Cuesta-Mateos et al., 2010).

Weitere Beispiele neoplastischer Erkrankungen, bei denen der Chemokinrezeptor CCR7 erhöht exprimiert wird, sind Brustkrebs (Liu et al., 2010), Melanom (Kühnelt-Leddihn et al., 2012), Ösophaguskarzinome (Ding et al., 2003) und gastrointestinale Karzinome (Sun et al., 2009). Bei diesen nicht-hämatopoetischen Neoplasien spielt CCR7 vor allem bei der Metastasierung eine große Rolle. Die Tumorzellen scheinen entlang eines Chemokingradienten zu migrieren um an einer anderen Stelle im Organismus eine Metastase zu entwickeln (Liu et al., 2010).

6.2 Vergleich: Rezeptorexpression mit prognostischen Faktoren

Nachdem die Daten der Rezeptorexpression erhoben waren, wurde untersucht inwieweit diese mit dem prognostischen Faktor, der ZAP-70-Expression, korrelieren. Weder die CRAM- noch die CCR7-Expression der ZAP-70 positiven Patienten unterschieden sich von den Expressionsraten der ZAP-70 negativen Patienten.

Bei ZAP-70 handelt es sich um eine Tyrosinkinase, die auf normalen B-Lymphozyten nicht vorkommt und bei CLL-Patienten exprimiert werden kann. Liegt die Expression bei > 20 %, spricht man von ZAP-70 positiven Zellen. Dies korreliert mit einer schlechteren Prognose (Rassenti et al., 2004).

Es wurde vermutet, dass eine hohe CCR7-Expression mit einer ZAP-70-Positivität und damit mit einer schlechteren Prognose korreliert. Da von Catusse und Mitarbeitern gezeigt wurde, dass CRAM einen hemmenden Effekt auf CCR7-induzierte Antworten hat (Catusse et al., 2010), war eine Korrelation zwischen einer hohen CRAM-Expression und einer besseren Prognose, also ZAP-70-Negativität, wahrscheinlich. In dieser Arbeit wurde allerdings weder für die CRAM- noch für die CCR7-Expression ein Einfluss auf die Prognose für die CLL-Patienten gezeigt.

In bereits veröffentlichter Literatur wurde dies für CCR7 von Cuesta-Mateos und Mitarbeitern bestätigt (Cuesta-Mateos et al., 2010), die bei 70 untersuchten CLL-Patientenproben keine signifikante Korrelation zwischen der CCR7- und der ZAP-70-Expression erkennen konnten. Im Gegensatz dazu berichteten jedoch Richardson und Mitarbeiter von einer erhöhten CCR7-Expression bei ZAP-70 positiven CLL-Patientenzellen (Richardson et al., 2006). Außerdem korrelierte in einer weiteren Veröffentlichung eine erhöhte CCR7-Expression mit dem unmutierten IgVH-Gen (Zucchetto et al., 2011), wobei einem unmutierten Status des IgVH-Gens und einer ZAP-70-Expression von > 20 % eine ähnliche Aussagekraft bezüglich der Prognose zugesprochen wird (Rassenti et al., 2004).

Für den erst kürzlich charakterisierten atypischen Chemokinrezeptor CRAM existiert derzeit noch keine Literatur, in der die CRAM-Expression mit prognostischen Faktoren verglichen wurde.

Da CCR7 nicht unerheblich an der Migration von Leukozyten in Lymphknoten beteiligt ist (Beauvillain et al., 2010), wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der CCR7-Expression und dem Vorhandensein vergrößerter Lymphknoten (Lymphadenopathie) überprüft. Entgegen bereits veröffentlichter Literatur (Till et al., 2002) wurde in dieser Arbeit keine Korrelation zwischen erhöhter CCR7-Expression und dem Auftreten einer Lymphadenopathie festgestellt. López-Giral und Mitarbeiter bestätigten die Ergebnisse dieser Arbeit (López-Giral et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich keine Korrelation zwischen der CRAM-Expression und dem Auftreten einer Lymphadenopathie nachgewiesen werden.

Als weiteres prognostisches Kriterium wurde die Einteilung nach Rai verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Möglichkeit, CLL-Patienten zu klassifizieren, wobei die Faktoren Lymphozytose, Lymphadenopathie, Hepato-/ Splenomegalie, Anämie

und Thrombopenie berücksichtigt werden (Rai et al., 1975). Es wurde kontrolliert, ob Patienten in einem weiter fortgeschrittenem Stadium (Rai IV) eine höhere CCR7- bzw. eine geringere CRAM-Expression aufweisen, als Patienten im Stadium Rai 0 (keine Lymphadenopathie). Dies war bei den Zellen der 58 CLL-Patienten nicht der Fall. Dagegen fanden Ghobrial und Mitarbeiter bei von ihnen untersuchten CLL-Patienten einen signifikanten Anstieg der CCR7-Expression bei Patienten im Stadium Rai IV verglichen mit Patienten im Stadium Rai 0 (Ghobrial et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit zeigten Zellen von CLL-Patienten im Rai-Stadium 0 geringere CCR7-Expressionslevel, vor allem im Vergleich zu Zellen von CLL-Patienten im Rai-Stadium III. Eine statistische Signifikanz könnte vermutlich durch ein größeres Patientenkollektiv erreicht werden.

6.3 Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21

Die CLL-Patientenzellen wiesen nach Zugabe von CCL19 und CCL21 eine deutliche Migration in Richtung CCL19 und CCL21 auf. Dies verdeutlicht die Rolle der CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 bei der Chemotaxis der CLL-Patientenzellen. B-Lymphozyten von gesunden Spendern zeigten in diesem Versuch ähnliche Tendenzen, obwohl deren CCR7-Expression signifikant niedriger ist als bei CLL-Patientenzellen.

Um zu zeigen, inwieweit die beiden Chemokinrezeptoren CRAM und CCR7 an dem Migrationsverhalten der Zellen beteiligt sind, wurde der Chemotaxis-Assay mit einigen CLL-Patientenproben unter Zugabe eines monoklonalen CRAM- oder CCR7-Antikörper durchgeführt. Durch die Präinkubation mit dem Antikörper erfolgte die Inhibition der Rezeptoren.

Die Inhibition des klassischen Chemokinrezeptors CCR7 führte zu signifikant verminderter Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21. Daher ist davon auszugehen, dass die Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21 CCR7-induziert ist. Dies wurde für CLL-Patientenzellen auch von Cuesta-Mateos und Mitarbeitern bestätigt, die eine Inhibition des Rezeptors CCR7 mittels monoklonalem Antikörper induzierten und durch die folgende Reduktion der Chemotaxis deren CCR7-Abhängigkeit bewiesen (Cuesta-Mateos et al., 2010).

Die Inhibition des atypischen Chemokinrezeptors CRAM hatte keinen Effekt auf das Migrationsverhalten der CLL-Patientenzellen. Es wurde keine signifikante Steigerung der Chemotaxis detektiert. Dies deutet darauf hin, dass sich das Migrationsverhalten in An- oder Abwesenheit von CRAM nicht verändert. Allerdings ist eine unzureichende CRAM-Inhibition durch den verwendeten Antikörper denkbar. Aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, dass CRAM kontinuierlich zwischen Zellmembran und Zytoplasma zirkuliert, wobei auch der Antikörper mit in das Zytoplasma aufgenommen wird (Leick et al., 2009). Daher ist noch unklar, inwieweit der Antikörper die Rezeptorfunktion hemmt. Da in weiteren Vorarbeiten mittels siRNA-Technik gezeigt werden konnte, dass CRAM einen hemmenden Einfluss auf die CCR7-induzierte Chemotaxis hatte (Catusse et al., 2010), scheint in dieser Arbeit tatsächlich eine inkomplette CRAM-Inhibition für die unveränderte Chemotaxis verantwortlich zu sein.

6.4 Vergleich: Migrationsverhalten mit prognostischen Faktoren

Auch die Ergebnisse aus den Chemotaxis-Assays wurden mit der ZAP-70-Expression der CLL-Patienten verglichen. Es wurde keine Korrelation zwischen dem chemotaktischen Index und der ZAP-70-Expression festgestellt. ZAP-70 positive CLL-Patientenzellen wiesen demnach keinen höheren chemotaktischen Index auf als ZAP-70 negative. In der Literatur weichen die Aussagen bezüglich einer Korrelation voneinander ab. So wurde in zwei Veröffentlichungen die CCR7-induzierte Migration der CLL-Patientenzellen mit dem IgVH-Status der Patienten verglichen. Beide fanden keine Korrelationen zwischen dem Mutationsstatus und dem chemotaktischen Index der CLL-Patientenzellen (López-Giral et al., 2004; Cuesta-Mateos et al., 2010). Da der ZAP-70-Expression > 20 % und dem unmutierten IgVH-Gen eine ähnliche Aussagekraft bezüglich der Prognose zugesprochen werden kann (Rassenti et al., 2004), stimmen deren Daten mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten überein (López-Giral et al., 2004; Cuesta-Mateos et al., 2010). Außerdem untersuchten Cuesta-Mateos und Mitarbeiter zusätzlich einen weiteren prognostischen Faktor, die CD38-Expression. Liegt die CD38-Expression > 30 % ist die Prognose für den Patienten schlechter als bei einer CD38-Expression < 30 % (Parker und Strout, 2011). Auch hier wurde keine Korrelation zum

Migrationsverhalten festgestellt. Dies spricht zusätzlich für die These, dass kein Zusammenhang zwischen erhöhter Chemotaxis und einer schlechteren Prognose besteht (Cuesta-Mateos et al., 2010). Im Gegensatz dazu berichteten Richardson und Mitarbeiter von einer signifikanten Steigerung der Chemotaxis bei ZAP-70 positiven CLL-Patientenzellen (Richardson et al., 2006).

Ein Zusammenhang zwischen dem chemotaktischen Index und dem Rai-Stadium der Patienten bzw. dem Auftreten einer Lymphadenopathie wurde ebenfalls nicht nachgewiesen. Dies widerspricht den Ergebnissen von López-Giral bzw. Cuesta-Mateos und Mitarbeitern, die zeigen konnten, dass Zellen von CLL-Patienten mit klinischer Lymphadenopathie stärker in Richtung CCL19 und CCL21 migrieren (López-Giral et al., 2004; Cuesta-Mateos et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnten zwar die deutliche Tendenz beobachtet werden, dass Zellen von CLL-Patienten im Rai-Stadium 0 weniger stark migrieren als Zellen von CLL-Patienten im Rai-Stadium IV, eine statistische Signifikanz konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Dennoch wurde die statistische Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0611 nahezu erreicht. Eventuell könnte auch hier eine Erweiterung des Patientenkollektivs zu einer Signifikanz führen.

Es bestand kein Zusammenhang zwischen der CCR7- bzw. CRAM-Expression und dem Migrationsverhalten der CLL-Patientenzellen. Dies bestätigt die Ergebnisse bereits veröffentlichter Literatur, in der keine Korrelation zwischen der CCR7-Expression und der Chemotaxis nachgewiesen wurde (Cuesta-Mateos et al., 2010).

6.5 Phosphorylierung von ERK1/2

Die extrazellulär regulierte Kinase ERK1/2, die zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen gehören, haben nach ihrer Aktivierung Einfluss auf Apoptose, Zellwachstum und -differenzierung (Robinson und Cobb, 1997, Rawlings et al., 2004). Aus diesem Grund war in dieser Arbeit von großem Interesse, inwieweit die Chemokinrezeptoren CRAM und CCR7 bzw. ihre Liganden bei der Aktivierung des ERK1/2-Signalweges beteiligt sind.

In dieser Arbeit konnte nach einer Stimulation mit CCL19, dem gemeinsamen Liganden von CCR7 und CRAM, eine Phosphorylierung von ERK1/2 detektiert werden. Die Inhibition des klassischen Chemokinrezeptors CCR7 mit einem

monoklonalen Antikörper führte zu einer signifikanten Reduktion der CCL19-induzierten Phosphorylierung. Dies zeigt, dass die ERK1/2-Aktivierung eine CCR7-abhängige Antwort auf die Stimulation mit CCL19 darstellt. Die Zugabe eines monoklonalen CRAM-Antikörpers potenzierte hingegen die CCL19-induzierte Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (ohne Zugabe von Antikörpern).

Es ist bekannt, dass CCR7 als klassischer Chemokinrezeptor den ERK1/2-Signalweg über G-Proteine anstößt. Dies wurde unter anderem für Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Xu et al., 2012) und CLL-Zellen gezeigt (Cuesta-Mateos et al., 2010; Kohout et al., 2004). Dabei induzierte CCL19 eine vielfach stärkere Phosphorylierung, als dies bei CCL21 der Fall ist (Kohout et al., 2004, Catusse et al., 2010). Es ist außerdem beschrieben, dass eine Inhibition von ERK1/2 den proapoptotischen Effekt bestimmter Medikamente fördert (Smal et al., 2007). Dies verdeutlicht die antiapoptotische Wirkung von ERK1/2 (Cuesta-Mateos et al., 2010).

Der hemmende Effekt von CRAM auf die ERK1/2-Aktivierung wurde ebenfalls bei Mec-1, einer CLL-Zelllinie, beobachtet (Catusse et al., 2010). Über die zugrunde liegenden Mechanismen ist bisher nichts bekannt.

6.6 Phosphorylierung von STAT3

In dieser Arbeit konnte eine Phosphorylierung von STAT3 am Serin 727 detektiert werden. Die Phosphorylierung am Tyrosin 705 wurde nach CCL19-Stimulation nicht induziert. STAT3 war am Serinrest konstitutiv (bereits ohne Stimulation mit CCL19) phosphoryliert. Eine Stimulation mit dem Chemokin CCL19 bewirkte jedoch eine weitere Verstärkung des Signals.

STAT3 als Transkriptionsfaktor fördert in der Onkogenese Proliferation, Überleben und Invasion der Zellen, während die Immunantwort gegen Tumoren heruntergesetzt wird (Lin et al., 2000; Yu et al., 2009). Auch in bereits veröffentlichter Literatur wird für CLL-Zellen eine konstitutive STAT3-Phosphorylierung am Serin 727 beschrieben (Frank et al., 1997; Lee et al., 2005).

Die erhöhte Phosphorylierung nach Stimulation mit CCL19 spricht für eine Beteiligung des klassischen Chemokinrezeptors CCR7 an der STAT3-Aktivierung, die auf die Zellen antiapoptotisch wirkt (Ishdorj et al., 2010). Nach Inhibition des

atypischen Chemokinrezeptors CRAM konnte im Vergleich zur Kontrolle ein leicht verstärktes Signal beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass CRAM auch die CCR7-induzierte STAT3-Phosphorylierung hemmt. Da die STAT3-Aktivierung einen antiapoptotischen Effekt auf die CLL-Zellen hat, könnte CRAM somit die Apoptose begünstigen.

Zum einen könnte die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung am Serin 727 selbst therapeutische Bedeutung erlangen (Ishdorj et al., 2010). Zum anderen wurde in einigen Veröffentlichungen gezeigt, dass eine Inhibition der STAT3-Aktivität zu erhöhter Sensibilität gegenüber Chemotherapeutika führt (Ghosh et al., 2009; Real et al., 2002).

In anderen Tumorentitäten liegt eine erhöhte STAT3-Phosphorylierung am Tyrosin 705 vor, was die Aktivierung von STAT3 anzeigt (Schoppmann et al., 2012; Su et al., 2012). In dieser Arbeit konnte in Übereinstimmung mit bisherigen Veröffentlichungen bestätigt werden, dass in CLL-Zellen STAT3 am Serin 727 konstitutiv aktiviert und eine Phosphorylierung am Tyrosin 705 nicht nachweisbar ist (Frank et al., 1997; Lee et al., 2005). Normalerweise scheint die Phosphorylierung von STAT3 am Tyrosinrest für die Verlagerung in den Zellkern notwendig zu sein. Wie dies in CLL-Patientenzellen ohne Tyrosin-Phosphorylierung funktioniert ist noch unklar (Lee et al., 2005).

6.7 CRAM fördert die Adhäsion von CLL-Patientenzellen an Stromazellen

Bei dem hier als „Pseudoemperipolese“ bezeichneten Versuch, bei dem CLL-Patientenzellen zwischen Stromazellen migrieren und an diese adhären, wird versucht, die Interaktion von CLL-Zellen mit Stromazellen „in vivo“ zu imitieren.

In dieser Arbeit führte die CRAM-Inhibition zu einer stark verminderten Adhäsion der CLL-Patientenzellen an Stromazellen, während die CCR7-Inhibition ebenfalls einen deutlichen, jedoch weniger starken Effekt auf das Verhalten der Zellen hatte. Daher förderten CRAM und CCR7 die Adhäsion der CLL-Patientenzellen an Stromazellen.

Die Pseudoemperipolese wurde mit zwei Proben von CLL-Patienten durchgeführt. Um die Ergebnisse zu bestätigen, sollte dieser Versuch demnach mit weiteren CLL-Patientenzellen wiederholt werden. Dieser Effekt von CRAM auf die Adhäsion von

CLL-Patientenzellen an Stromazellen ist völlig neu und noch nicht untersucht. Dies stellt einen sehr interessanten neuen Aspekt für die funktionelle Charakterisierung des atypischen Chemokinrezeptors CRAM dar. Im Gegensatz zu den Chemotaxis-Assays konnte hier ein deutlicher Effekt durch den monoklonalen CRAM-Antikörper erzielt werden. Dies spricht dafür, dass zumindest eine teilweise funktionelle Inhibierung durch den Antikörper erzielt werden kann.

6.8 Apoptose-Assay

Mittlerweile ist bekannt, dass CLL-Zellen einen Defekt im programmierten Zelltod (Apoptose) aufweisen und daher die mittlere Überlebenszeit von CLL-Zellen im Vergleich zu B-Lymphozyten gesunder Spender um ein Vielfaches erhöht ist (Herishanu und Polliack, 2005). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit kontrolliert, inwieweit die Chemokine CCL19, als gemeinsamer Ligand von CCR7 und CRAM, und CCL21, als Ligand von CCR7, die Vitalität der Zellen beeinflussen.

Es konnte bestätigt werden, dass die Vitalität von CLL-Patientenzellen nach Zugabe von CCL19 oder CCL21 leicht, aber dennoch signifikant, ansteigt.

Dieses Phänomen zeigt das antiapoptotische Potential von CCL19 und CCL21 an und wurde für die Chronische lymphatische Leukämie bereits untersucht (Cuesta-Mateos et al., 2010; Chunsong et al., 2006). Ähnliches wurde auch für dendritische Zellen (Sánchez-Sánchez et al., 2004), CD8⁺ Lymphozyten (Kim et al., 2005) und maligne Zellen des Plattenepithelkarzinoms von Kopf und Hals (Wang et al., 2005) beschrieben.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CCL19 und CCL21 nicht nur für die Migration der CLL-Zellen in Lymphknoten verantwortlich sind. Sie scheinen außerdem durch ihr antiapoptotisches Potential das Überleben der CLL-Zellen im Lymphknoten zu fördern.

6.9 Zellzyklus-Assay

Da in dieser Arbeit das antiapoptotische Potential der Chemokine CCL19 und CCL21 nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob ebenfalls ein Einfluss auf den Zellzyklusstatus der CLL-Zellen möglich ist. Dabei war der Anteil der Zellen, die sich in der Synthesephase befinden, entscheidend.

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit Zugabe der Chemokine CCL19 bzw. CCL21 und der Kontrolle beobachtet werden. Dies ist nicht verwunderlich, da bekannt ist, dass primäre B-Lymphozyten üblicherweise in Kultur nicht proliferieren (Schattner et al., 1998).

6.10 Übertragbarkeit auf die CLL des Hundes

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in Bezug auf die humane CLL können mit Sicherheit nicht komplett auf die CLL des Hundes übertragen werden. Zum einen gibt es neben Gemeinsamkeiten auch bedeutende Unterschiede zwischen der CLL beim Menschen und beim Hund. Zum anderen fehlen bis heute Erkenntnisse über das Auftreten und die Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren beim Hund.

Bei der CLL, sowohl des Menschen als auch des Hundes, liegt eine Proliferation von kleinen, reifen, aber immunologisch inkompetenten Lymphozyten vor, wodurch eine absolute Lymphozytose entsteht (Mischke, 2003). Während beim Mensch jedoch in über 90 % der Fälle eine Proliferation der B-Lymphozyten vorliegt (Schmidt und Solenthaler, 2007), handelt es sich beim Hund in 73 % der Fälle um eine T-Zell-Neoplasie (Workman und Vernau, 2003).

In Bezug auf das klinische Erscheinungsbild und den Verlauf der Erkrankung bestehen viele Gemeinsamkeiten zwischen der CLL bei Mensch und Hund. Bei beiden handelt es sich um Neoplasien des Alters (Göde, 2008; Helfand und Kisseberth, 2010), die einen oft indolenten und wenig progressiven Verlauf aufweisen (Mischke, 2003; Hallek und Emmerich, 2009). Dennoch können klinische Symptome auftreten, sodass eine therapeutische Intervention nötig wird. Diese besteht meist aus einer konventionellen Chemotherapie (Hallek und Emmerich, 2009; Helfand und Kisseberth, 2010).

Der atypische Chemokinrezeptor CRAM, der in dieser Arbeit näher untersucht wurde, konnte beim Menschen erst kürzlich charakterisiert werden (Leick, 2010). Es ist noch nicht bekannt, ob dieser ebenfalls auf kaninen Zellen und speziell auf CLL-Zellen exprimiert wird. Daten hierzu und bezüglich des Einflusses von CRAM bei der CLL des Hundes oder einer eventuellen Interaktion mit dem kaninen CCR7-Homolog liegen bisher nicht vor.

Die kanine Variante des klassischen Chemokinrezeptors CCR7 wurde bis heute in der CLL des Hundes noch nicht untersucht. Es ist allerdings bekannt, dass CCR7 und CCL19 in vom kaninen epitheliotropen Lymphom betroffenen Hautbereichen erhöht exprimiert werden (Chimura et al., 2011). Dies lässt vermuten, dass CCR7 und CCL19 mit der Ausbreitung des kaninen epithelialen Lymphoms assoziiert ist. Indessen berichteten Hillman und Mitarbeiter von einer erhöhten CCR7-Expression auf Zellen des oralen/perioralen Mastzelltumors (Hillman et al., 2010). Hier konnte für CCR7 kein Einfluss auf die Metastasierung nachgewiesen werden. Zuvor wurde CCR7 ebenfalls auf CD40⁺ Zellen entdeckt. Sowohl CD40⁺ Zellen gesunder Menschen und Hunde als auch CD40⁺ Zellen von Hunden, die an einem Lymphom erkrankten, wiesen erhöhte CCR7-Expressionslevel auf (Mason et al., 2008). Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass CCR7 auch bei Neoplasien des Hundes einen gewissen Einfluss haben könnte. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob CCR7 auch bei der CLL des Hundes eine Rolle spielt.

In der humanen CLL sind bis heute einige prognostische Faktoren identifiziert worden (Tabelle 2-3). Die Expression von ZAP-70 auf CLL-Patientenzellen ist dabei mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Parker und Strout, 2011). Beim Hund wird ZAP-70 ebenfalls stark auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten exprimiert (Mortarino et al., 2009). Das Expressionslevel wies allerdings starke Schwankungen bei CLL-Zellen auf. Dabei konnte keine erhöhte Expression auf B-CLL-Zellen im Vergleich zu normalen B-Lymphozyten des Hundes beobachtet werden (Mortarino et al., 2009). Es muss also angenommen werden, dass ZAP-70 bei der CLL des Hundes eine andere Rolle spielt, als in der humanen CLL.

Breen und Modiano berichteten von einer Deletion des RB1-Gens bei fünf von sieben Hunden mit CLL mit Verlust oder Reduktion des RB Proteins in neun von zehn Fällen (Breen und Modiano, 2008). Dies scheint der Deletion des 13q Gens bei der humanen CLL zu entsprechen.

Comazzi und Mitarbeiter berichteten beim Hund von einer Korrelation zwischen dem Immunphänotyp der CLL-Zellen und der Überlebenszeit (Comazzi et al., 2011). Liegt eine Neoplasie der T-Zellen vor, wird eine bessere Prognose mit einer langen Überlebenszeit angenommen. Während die B-CLL des alten Hundes ebenfalls mit einer langen Überlebenszeit assoziiert ist, nimmt sie bei jungen Hunden einen aggressiveren Verlauf.

7 Zusammenfassung

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des atypischen Chemokinrezeptors CRAM bei der Chronischen lymphatischen Leukämie des Menschen untersucht. Die CLL ist eine hämatopoetische Erkrankung, die sowohl beim Mensch als auch beim Hund mit einer hohen Inzidenz auftritt. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten reifer aber immunologisch inkompetenter B-Lymphozyten im Blut und deren Wanderung in sekundäre lymphatische Organe. Hierbei spielen unter anderem der klassische Chemokinrezeptor CCR7 und seine Liganden CCL19 und CCL21 eine bedeutende Rolle. Das homöostatische Chemokin CCL19 ist ein Ligand von CRAM. Als atypischer Chemokinrezeptor vermittelt CRAM nach Bindung von CCL19 keine klassischen Funktionen wie Migration oder Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Es wurde allerdings nachgewiesen, dass CRAM einen hemmenden Einfluss auf die CCR7-induzierten Antworten wie Chemotaxis, Calciumausschüttung und ERK-Phosphorylierung hat.

Auf primären CLL-Patientenzellen wurde im Vergleich zu primären B-Lymphozyten gesunder Spender eine erhöhte CCR7- und CRAM-Expression nachgewiesen. Sowohl die Chemotaxis in Richtung CCL19 und CCL21, als auch die Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 sind CCR7-induziert und konnten durch die Inhibition von CRAM verstärkt werden. Trotz der konstitutiven STAT3-Phosphorylierung am Serinest konnte nach Stimulation mit CCL19 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine verstärkte Phosphorylierung induziert werden. Dieser Effekt wurde nach CRAM-Inhibition nochmals verstärkt. Daher hat CRAM bei CLL-Patientenzellen einen hemmenden Effekt auf die CCR7-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT3. Weder die Rezeptorexpressionen noch die chemotaktischen Indizes korrelierten mit dem Rai-Stadium der Patienten, einer klinischen Lymphadenopathie oder der ZAP-70-Expression. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass CRAM an der Adhäsion der CLL-Patientenzellen an Stromazellen beteiligt ist. Im Apoptose-Assay konnte der antiapoptotische Effekt von CCL19 und CCL21 gezeigt werden.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit der hemmende Einfluss von CRAM auf CCR7-induzierte Antworten bei primären CLL-Patientenzellen bestätigt werden. Ebenso wurden erste Erkenntnisse über eine Beteiligung von CRAM an der Adhäsion von CLL-Patientenzellen an Stromazellen gewonnen.

8 Summary

8 Summary

The aim of this study was to evaluate the role of CRAM, an atypical chemokine receptor, in human chronic lymphocytic leukemia. CLL is a hematopoietic disorder, which, both in humans and dogs, appears with a high incidence. It is characterised by the appearance of mature yet immunologically incompetent B lymphocytes in the peripheral blood and their migration to secondary lymphoid organs. For this process, the classical chemokine receptor CCR7 and its ligands CCL19 and CCL21 play a crucial role. The homeostatic chemokine CCL19 is a ligand for CRAM. Belonging to the atypical chemokine receptors, CRAM does not evoke classical reactions like migration or activation of intracellular signaling cascades after binding CCL19. Rather it was shown to impede CCR7 induced responses like chemotaxis, intracellular calcium mobilisation and ERK phosphorylation.

An elevated level of CRAM and CCR7 surface expression could be detected in primary tumor cells from CLL patients compared to B lymphocytes from healthy donors. Chemotaxis towards CCL19 and CCL21, as well as ERK phosphorylation after CCL19 stimulation are CCR7 mediated responses of CLL cells that could be amplified by blocking CRAM. Besides a constitutive phosphorylation of STAT3 on serine, further increase of this phosphorylation could be achieved by stimulating the tumor cells with CCL19. This effect could as well be potentiated by blocking CRAM. Thus a repressive effect of CRAM on the CCR7 mediated ERK and STAT3 phosphorylation could be demonstrated in CLL cells. To investigate a putative role of CRAM in the disease development, correlations between receptor expression and chemotactic indices and the Rai stage, the development of lymphadenopathy or ZAP-70 expression were sought. None of them were found to be significant. However, preliminary analyses point to a supporting role of CRAM in the adhesion of CLL cells to stromal cells. Furthermore an antiapoptotic effect of CCL19 and CCL21 on CLL cells could be demonstrated.

In summary, the dampening effect of CRAM on CCR7 induced answers in primary cells from CLL patients could be confirmed in this work. First results indicate that CRAM promotes the adhesion of CLL cells on stromal cells.

9 Literaturverzeichnis

9 Literaturverzeichnis

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. Molecular Biology of the Cell. *Garland Science*, 5th edition, **2008**

Allen, S. J., Crown, S. E. und Handel, T. M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820, **2007**.

An, P., Li, R., Wang, J. M., Yoshimura, T., Takahashi, M., Samudralal, R., O'Brien, S. J., Phair, J., Goedert, J. J., Kirk, G. D., Troyer, J. L., Sezgin, E., Buchbinder, S. P., Donfield, S., Nelson, G. W. und Winkler, C. A. Role of exonic variation in chemokine receptor genes on AIDS: CCRL2 F167Y association with pneumocystis pneumonia. *PLoS Genet* 7, e1002328, **2011**.

Baggiolini, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-8, **1998**.

Baggiolini, M. Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250, 91-104, **2001**.

Baggiolini, M. und Dahinden, C. A. CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today* 15, 127-33, **1994**.

Baggiolini, M., Walz, A. und Kunkel, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84, 1045-9, **1989**.

Beauvillain, C., Cunin, P., Doni, A., Scotet, M., Jaillon, S., Loiry, M. L., Magistrelli, G., Masternak, K., Chevaller, A., Delneste, Y. und Jeannin, P. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* 117, 1196-204, **2011**.

Belperio, J. A., Keane, M. P., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Ehlert, J. E., Burdick, M. D. und Strieter, R. M. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68, 1-8, **2000**.

Biethahn, S., Alves, F., Wilde, S., Hiddemann, W. und Spiekermann, K. Expression of granulocyte colony-stimulating factor- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-associated signal transduction proteins of the JAK/STAT pathway in normal granulopoiesis and in blast cells of acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 27, 885-94, **1999**.

Berger, D. P., Engelhardt, R. und Mertelsmann, R. Das Rote Buch. Hämatologie und Internistische Onkologie. *Ecomed Medizin*, 3. Auflage, **2006**.

Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M. T., Monconduit, M., Belabbes, S. und Gremy, F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48, 198-206, **1981**.

Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q. und Raz, E. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 132, 463-73, **2008**.

Bonecchi, R., Borroni, E. M., Savino, B., Buracchi, C., Mantovani, A. und Locati, M. Non-signaling chemokine receptors: mechanism of action and role in vivo. *J Neuroimmunol* 198, 14-9, **2008**.

Buettner, R., Mora, L. B. und Jove, R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 8, 945-54, **2002**.

Catusse, J., Leick, M., Groch, M., Clark, D. J., Buchner, M. V., Zirlik, K. und Burger, M. Role of the atypical chemoattractant receptor CRAM in regulating CCL19 induced CCR7 responses in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer* 9, 297, **2010**.

Chimura, N., Kondo, N., Shibata, S., Kimura, T., Mori, T., Hoshino, Y., Murayama, N., Nagata, M., die, K., Nishifuji, K., Kamishina, H. und Maeda, S. Gene transcription analysis in lesional skin of canine epitheliotropic cutaneous lymphoma using quantitative real-time RT-PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 144, 329-36, **2011**.

Chung, J., Uchida, E., Grammer, T. C. und Blenis, J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17, 6508-16, **1997**.

Chunsong, H., Yuling, H., Li, W., Jie, X., Gang, Z., Qiuping, Z., Qingping, G., Kejian, Z., Li, Q., Chang, A. E., Youxin, J. und Jinqun, T. CXC chemokine ligand 13 and CC chemokine ligand 19 cooperatively render resistance to apoptosis in B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia CD23+CD5+ B cells. *J Immunol* 177, 6713-22, **2006**.

Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C. und Lusso, P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270, 1811-5, **1995**.

Comazzi, S., Gelain, M. E., Martini, V., Riondato, F., Miniscalco, B., Marconato, L., Stefanello, D. und Mortarino M. Immunophenotype predicts survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. *J Vet Intern Med* 25, 100-6, **2011**.

Comerford, I., Milasta, S., Morrow, V., Milligan, G. und Nibbs, R. The chemokine receptor CCX-CKR mediates effective scavenging of CCL19 in vitro. *Eur J Immunol* 36, 1904-16, **2006**.

Cuesta-Mateos, C., López-Giral, S., Alfonso-Pérez, M., de Soria, V. G., Loscertales, J., Guasch-Vidal, S., Beltrán, A. E., Zapata, J. M. und Muñoz-Calleja, C. Analysis of migratory and prosurvival pathways induced by the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 38, 756-64, **2010**.

Darnell, J. E. Jr, Kerr, I.M. und Stark, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-21, **1994**.

Darnell, J. E. Jr. STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-5, **1997**.

Desai, S. und Pinilla-Ibarz, J. Front-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Control* 19, 26-36, **2012**.

Deuel, T. F., Senior, R. M., Chang, D., Griffin, G. L., Heinrikson, R. L. und Kaiser, E. T. Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 4584-7, **1981**.

Ding, Y., Shimada, Y., Maeda, M., Kawabe, A., Kaganoi, J., Komoto, I., Hashimoto, Y., Miyake, M., Hashida, H. und Imamura, M. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 9, 3406-12, **2003**.

Eichhorst, B., Dreyling, M., Robak, T., Montserrat, E. und Hallek, M.; ESMO Guidelines Working Group. Chronic lymphocytic leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 22, vi50-4, **2011**.

Fan, P., Kyaw, H., Su, K., Zeng, Z., Augustus, M., Carter, K. C. und Li, Y. Cloning and characterization of a novel human chemokine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 264-8, **1998**.

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

Frank, D. A., Mahajan, S. und Ritz, J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest* 100, 3140-8, **1997**.

Gadina, M., Hilton, D., Johnston, J. A., Morinobu, A., Lighvani, A., Zhou, Y. J., Visconti, R. und O'Shea, J. J. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol* 13, 363-73, **2001**.

Galligan, C. L., Matsuyama, W., Matsukawa, A., Mizuta, H., Hodge, D. R., Howard, O. M. und Yoshimura, T. Up-regulated expression and activation of the orphan chemokine receptor, CCRL2, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 1806-14, **2004**.

Gangur, V., Birmingham, N. P. und Thanavorakul, S. Chemokines in health and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 86, 127-36, **2002**.

Ganju, R. K., Brubaker, S. A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W. und Groopman, J. E. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273, 23169-75, **1998**.

Gardner, L., Patterson, A. M., Ashton, B. A., Stone, M. A. und Middleton, J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 306-12, **2004**.

Gether, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 21, 90-113, **2000**.

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

Ghosh, A. K., Kay, N. E., Secreto, C. R. und Shanafelt, T. D. Curcumin inhibits prosurvival pathways in chronic lymphocytic leukemia B cells and may overcome their stromal protection in combination with EGCG. *Clin Cancer Res* 15, 1250-8, **2009**.

Göde, V. Chronische lymphatische Leukämie. *Kompetenznetz Maligne Lymphome* <http://www.lymphome.de/>, **2008**.

Gosling, J., Dairaghi, D. J., Wang, Y., Hanley, M., Talbot, D., Miao, Z. und Schall, T. J. Cutting edge: identification of a novel chemokine receptor that binds dendritic cell- and T cell-active chemokines including ELC, SLC, and TECK. *J Immunol* 164, 2851-6, **2000**.

Graham, G. J. und McKimmie, C. S. Chemokine scavenging by D6: a movable feast? *Trends Immunol* 27, 381-6, **2006**.

Hallek, M. und Emmerich, B. Chronische lymphatische Leukämie. *UNI-MED* 4. Auflage, **2009**.

Hamm, H.E. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273, 669-72, **1998**.

Hartmann, T. N., Leick, M., Ewers, S., Diefenbacher, A., Schraufstatter, I., Honczarenko, M. und Burger, M. Human B cells express the orphan chemokine receptor CRAM-A/B in a maturation-stage-dependent and CCL5-modulated manner. *Immunology* 125, 252-62, **2008**.

Heim, M. H. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J Recept Signal Transduct Res* 19, 75-120, **1999**.

Helfand, S. C. und Kisseberth W. C. General features of leukemia and lymphoma. Kapitel 65, 455-466, aus **Weiss, D. J. und Wardrop, K. J.** Schalm's Veterinary Hematology. *Blackwell Publishing*, 6th edition, **2010**.

Herishanu, Y. und Polliack, A. Chronic lymphocytic leukemia: a review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options. *Transfus Apher Sci* 32, 85-97, **2005**.

Hillman, L. A., Garrett, L. D., de Lorimier, L. P., Charney, S. C., Borst, L. B. und Fan, T. M. Biological behavior of oral and perioral mast cell tumors in dogs: 44 cases (1996-2006). *J Am Vet Med Assoc* 237, 936-42, **2010**.

Ihle, J. N. The Janus protein tyrosine kinase family and its role in cytokine signaling. *Adv Immunol* 60, 1-35, **1995**.

Ishdorj, G., Johnston, J. B. und Gibson, S. B. Inhibition of constitutive activation of STAT3 by curcubitacin-I (JSI-124) sensitized human B-leukemia cells to apoptosis. *Mol Cancer Ther* 9, 3302-14, **2010**.

Kennedy, J., Kelner, G. S., Kleyensteuber, S., Schall, T. J., Weiss, M. C., Yssel, H., Schneider, P. V., Cocks, B. G., Bacon, K. B. und Zlotnik, A. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol* 155, 203-9, **1995**.

Kim, J. W., Ferris, R. L. und Whiteside, T. L. Chemokine C receptor 7 expression and protection of circulating CD8+ T lymphocytes from apoptosis. *Clin Cancer Res* 11, 7901-10, **2005**.

Kohout, T. A., Nicholas, S. L., Perry, S. J., Reinhart, G., Junger, S. und Struthers, R. S. Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7. *J Biol Chem* 279, 23214-22, **2004**.

Kühnelt-Leddihn, L., Müller, H., Eisendle, K., Zelger, B. und Weinlich, G. Overexpression of the chemokine receptors CXCR4, CCR7, CCR9, and CCR10 in human primary cutaneous melanoma: a potential prognostic value for CCR7 and CCR10? *Arch Dermatol Res* 304, 185-93, **2012**.

Lee, Y. K., Shanafelt, T. D., Bone, N. D., Strege, A. K., Jelinek, D. F. und Kay, N. E. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia* 19, 513-23, **2005**.

Leick, M. Characterization of the orphan chemokine receptor CRAM-A,B. **2010**.

Leick, M., Catusse, J., Follo, M., Nibbs, R. J., Hartmann, T. N., Veelken, H. und Burger, M. CCL19 is a specific ligand of the constitutively recycling atypical human chemokine receptor CRAM-B. *Immunology* 129, 536-46, **2010**.

Levoye, A., Dam, J., Ayoub, M. A., Guillaume, J. L. und Jockers, R. Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep* 7, 1094-8, **2006**.

Li, N., Venkatesan, M. I., Miguel, A., Kaplan, R., Gujuluva, C., Alam, J. und Nel, A. Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element. *J Immunol* 165, 3393-401, **2000**.

Lin, T. S., Mahajan, S. und Frank, D. A. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene* 19, 2496-504, **2000**.

Liu, Y., Ji, R., Li, J., Gu, Q., Zhao, X., Sun, T., Wang, J., Li, J., Du, Q. und Sun, B. Correlation effect of EGFR and CXCR4 and CCR7 chemokine receptors in predicting breast cancer metastasis and prognosis. *J Exp Clin Cancer Res* 29, 16, **2010**.

López-Giral, S., Quintana, N. E., Cabrerizo, M., Alfonso-Pérez, M., Sala-Valdés, M., De Soria, V. G., Fernández-Rañada, J. M., Fernández-Ruiz, E. und Muñoz, C. Chemokine receptors that mediate B cell homing to secondary lymphoid tissues are highly expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphomas with widespread nodular dissemination. *J Leukoc Biol* 76, 462-71, **2004**.

Lube, R. Individuelle Vorhersage des Chemotherapieansprechens mittels in-vitro Chemosensibilitätstestung bei Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie. *VVB Laufersweiler Verlag*, 2007.

Luster, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338, 436-45, 1998.

Mantovani, A., Bonecchi, R. und Locati, M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol* 6, 907-18, 2006.

Mason, N. J., Coughlin, C. M., Overley, B., Cohen, J. N., Mitchell, E. L., Colligon, T. A., Clifford, C. A., Zurbriggen, A., Sorenmo, K. U. und Vonderheide, R. H. RNA-loaded CD40-activated B cells stimulate antigen-specific T-cell responses in dogs with spontaneous lymphoma. *Gene Ther* 15, 955-65, 2008.

Metchnikoff, E. Lectures on the comparative pathology of inflammation. *Kegan Paul, Trench, Trübner: London*, 1893.

Migeotte, I., Franssen, J. D., Goriely, S., Willems, F. und Parmentier, M. Distribution and regulation of expression of the putative human chemokine receptor HCR in leukocyte populations. *Eur J Immunol* 32, 494-501, 2002.

Miller, L. H., Mason, S. J., Clyde, D. F. und McGinniss, M. H. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 295, 302-4, 1976.

Mischke, R. Praktische Hämatologie bei Hund und Katze. *Schlütersche Hannover*, 143-149, 2003

Morris, A. J. und Malbon, C. C. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79, 1373-430, 1999.

Mortarino, M., Gelain, M. E., Gioia, G., Ciusani, E., Bazzocchi, C. und Comazzi, S. ZAP-70 and Syk expression in canine lymphoid cells and preliminary results on leukaemia cases. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 395-401, **2009**.

Moser, B. und Loetscher, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2, 123-8, **2001**.

Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verástegui, E. und Zlotnik, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-6, **2001**.

Mukaida, N. und Baba, T. Chemokines in tumor development and progression. *Exp Cell Res* 318, 95-102, **2012**.

Mukaida, N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 72, 391-8, **2000**.

Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hébert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J. und Power, C. A. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52, 145-76, **2000**.

Nelson, R. W. und Couto, C. G. Innere Medizin der Kleintiere. *Elsevier*, 2. deutsche Auflage, **2010**.

New, D. C. und Wong, J. T. The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa. *Biol Signals Recept* 7, 98-108, **1998**.

Nibbs, R. J., Kriehuber, E., Ponath, P. D., Parent, D., Qin, S., Campbell, J. D., Henderson, A., Kerjaschki, D., Maurer, D., Graham, G. J. und Rot, A. The beta-chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. *Am J Pathol* 158, 867-77, **2001**.

Nibbs, R. J., Wylie, S. M., Yang, J., Landau, N. R. und Graham, G. J. Cloning and characterization of a novel promiscuous human beta-chemokine receptor D6. *J Biol Chem* 272, 32078-83, **1997**.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M. und Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-45, **2000**.

Parker, T. L. und Strout, M. P. Chronic lymphocytic leukemia: prognostic factors and impact on treatment. *Discov Med* 11, 115-23, **2011**.

Pepper, C., Thomas, A., Fegan, C., Hoy, T. und Bentley, P. Flavopiridol induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia cells through a p38 and ERK MAP kinase-dependent mechanism. *Leuk Lymphoma* 44, 337-42, **2003**.

Prydz, K. und Dalen K. T. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 113, 193-205, **2000**.

Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N. und Pasternack, B. S. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 46, 219-34, **1975**.

Rassenti, L. Z., Huynh, L., Toy, T. L., Chen, L., Keating, M. J., Gribben, J. G., Neuberg, D. S., Flinn, I. W., Rai, K. R., Byrd, J. C., Kay, N. E., Greaves, A., Weiss, A. und Kipps, T. J. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 351, 893-901, **2004**.

Rawlings, J. S., Rosler K. M. und Harrison, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117, 1281-3, **2004**.

Rawluk, J. Das bunte Buch. Intranet der Abteilung Hämatologie/Onkologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, **2012**.

Real, P. J., Sierra, A., De Juan, A., Segovia, J. C., Lopez-Vega, J. M. und Fernandez-Luna, J. L. Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene* 21, 7611-8, **2002**.

Richardson, S. J., Matthews, C., Catherwood, M. A., Alexander, H. D., Carey, B.S., Farrugia, J., Gardiner, A., Mould, S., Oscier, D., Copplestone, J.A. und Prentice, A. G. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 107, 3584-92, **2006**.

Robinson, M.J. und Cobb, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9, 180-6, **1997**.

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

Sánchez-Sánchez, N., Riol-Blanco, L., de la Rosa, G., Puig-Kröger, A., García-Bordas, J., Martín, D., Longo, N., Cuadrado, A., Cabañas, C., Corbí, A. L., Sánchez-Mateos, P. und Rodríguez-Fernández, J. L. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* 104, 619-25, **2004**.

Schaeffer, H. J. und Weber, M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19, 2435-44, **1999**.

Schattner, E. J., Mascarenhas, J., Reyfman, I., Koshy, M., Woo, C., Friedman, S. M. und Crow, M. K. Chronic lymphocytic leukemia B cells can express CD40 ligand and demonstrate T-cell type costimulatory capacity. *Blood* 91, 2689-97, **1998**.

Schmidt, A. und Solenthaler, M. Einteilung, Verlauf, Therapie und Prognose der CLL. *Onkologie* 1, **2007**.

Schoppmann, S. F., Jesch, B., Friedrich, J., Jomrich, G., Maroske, F. und Birner, P. Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) correlates with Her-2 status, carbonic anhydrase 9 expression and prognosis in esophageal cancer. *Clin Exp Metastasis*. **2012**.

Seke Etet, P. F., Vecchio, L., Nwabo Kamdje, A. H. Interactions between bone marrow stromal microenvironment and B-chronic lymphocytic leukemia cells: Any role for Notch, Wnt and Hh signaling pathways? *Cell Signal* 24, 1433-1443, **2012**.

Smal, C., Lisart, S., Maerevoet, M., Ferrant, A., Bontemps, F. und Van Den Neste, E. Pharmacological inhibition of the MAPK/ERK pathway increases sensitivity to 2-chloro-2'-deoxyadenosine (CdA) in the B-cell leukemia cell line EHEB. *Biochem Pharmacol* 73, 351-8, **2007**.

Su, F., Ren, F., Rong, Y., Wang, Y., Geng, Y., Wang, Y., Feng, M., Ju, Y., Li, Y., Zhao, Z. J., Meng, K. und Chang, Z. Protein tyrosine phosphatase Meg2 dephosphorylates signal transducer and activator of transcription 3 and suppresses tumor growth in breast cancer. *Breast Cancer Res* 14, R38, **2012**.

Sun, R. H., Wang, G. B., Li, J. und Cui, J. Role of CCL21/CCR7 in invasion of colorectal carcinoma cell line SW480. *Ai Zheng* 28, 708-13, **2009**.

Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. und Akira, S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 3801-4, **1997**.

Thelen, M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2, 129-34, **2001**.

Till, K. J., Lin, K., Zuzel, M. und Cawley, J. C. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* 99, 2977-84, **2002**.

Walz, D. A., Wu, V. Y., de Lamo, R., Dene, H. und McCoy, L. E. Primary structure of human platelet factor 4. *Thromb Res* 11, 893-8, **1977**.

Wang, J., Zhang, X., Thomas, S. M., Grandis, J. R., Wells, A., Chen, Z. G. und Ferris, R. L. Chemokine receptor 7 activates phosphoinositide-3 kinase-mediated invasive and prosurvival pathways in head and neck cancer cells independent of EGFR. *Oncogene*. 24, 5897-904, **2005**.

Weiss, D. J. und Wardrop, K. J. Schalm's Veterinary Hematology. *Blackwell Publishing*, 6th edition, **2010**.

Wen, Z., Zhong, Z. und Darnell, J. E. Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, 241-50, **1995**.

Wendtner, C. M., Dreger, P., Gregor, G., Greil, R., Knauf, W., Schetelig, J., Steurer, M., Stilgenbauer, S. Leitlinie Chronische lymphatische Leukämie, http://www.dgho-onkopedia.de/onkopedia/leitlinien/cll/index_html, **2012**.

Wilkerson, M. J., Dolce, K., Koopman, T., Shuman, W., Chun, R., Garrett, L., Barber, L. und Avery, A. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Vet Immunol Immunopathol* 106, 179-96, **2005**.

Wong, S. und Fulcher, D. Chemokine receptor expression in B-cell lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 45, 2491-6, **2004**.

Workman, H. C. und Vernau, W. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 33, 1379-99, viii, **2003**.

Xu, Y., Liu, L., Qiu, X., Liu, Z., Li, H., Li, Z., Luo, W. und Wang, E. CCL21/CCR7 Prevents Apoptosis via the ERK Pathway in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS One* 7, e33262, **2012**.

Yoshimura, T. und Oppenheim, J. J. Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); two multifunctional receptors with unusual properties. *Exp Cell Res* 317, 674-84, **2011**.

Yu, H. und Jove, R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4, 97-105, **2004**.

Yu, H., Pardoll, D. und Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9, 798-809, **2009**.

Zabel, B. A., Nakae, S., Zúñiga, L., Kim, J. Y., Ohya, T., Alt, C., Pan, J., Suto, H., Soler, D., Allen, S. J., Handel, T. M., Song, C. H., Galli, S. J. und Butcher, E. C. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J Exp Med* 205, 2207-20, **2008**.

Ziegler, E., Oberbarnscheidt, M., Bulfone-Paus, S., Förster, R., Kunzendorf, U. und Krautwald, S. CCR7 signaling inhibits T cell proliferation. *J Immuno.* 179, 6485-93, **2007**.

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

Zucchetto, A., Bomben, R., Bo, M. D., Nanni, P., Bulian, P., Rossi, F. M., Del Principe, M. I., Santini, S., Del Poeta, G., Degan, M. und Gattei, V. ZAP-70 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: evaluation by external (isotypic) or internal (T/NK cells) controls and correlation with IgV(H) mutations. *Cytometry B Clin Cytom* 70, 284-92, **2006**.

Zucchetto, A., Cattarossi, I., Nanni, P., Zaina, E., Prato, G., Gilestro, M., Marconi, D., Bulian, P., Rossi, F. M., Del Vecchio, L., Omedè, P., Geuna, M., Del Poeta, G. und Gattei, V. Cluster analysis of immunophenotypic data: the example of chronic lymphocytic leukemia. *Immunol Lett* 134, 137-44, **2011**.

10 Anhang

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz aus der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig Universität Gießen für die Übernahme der Arbeit und die Vertretung am Fachbereich Veterinärmedizin.

Herrn Prof. Dr. Roland Mertelsmann danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation an der Medizinischen Universitätsklinik Abteilung Hämatologie/Onkologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Meike Burger für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation und für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten in ihrem Labor durchführen zu können. Ich bin sehr dankbar für ihr Vertrauen und die herzliche und kompetente Betreuung.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Burger danke ich herzlich für die Ratschläge und konstruktiven Diskussionen. Mein besonderer Dank geht an Andrea Härzschel, die mir bei allen Fragen rund um CRAM zur Seite stand, und an Dr. Julie Catusse, die mich freundlich und mit Geduld in die Arbeiten im Labor einführte.

Den Arbeitsgruppen von Monika Engelhardt und Ralph Wäsch danke ich für ihren Beitrag zu einem netten Arbeitsklima im Labor. Mein besonderer Dank gilt Dagmar Wider, die mir mit ihrer wunderbaren Art stets bei allen technischen Fragen beistand.

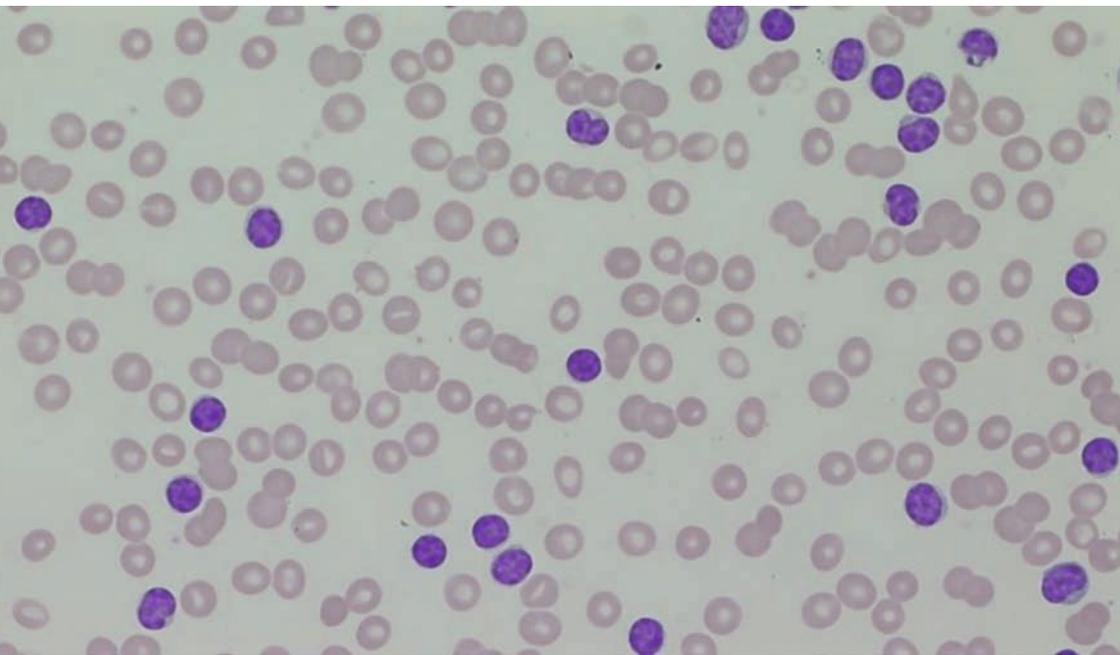
Ich danke allen Freunden und Kollegen, die mir bei Computerfragen und Korrekturen der Arbeit tatkräftig zur Seite standen. Weiterhin bedanke ich mich bei Gabriele Ihorst für die Unterstützung bei den statistischen Untersuchungen.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie für das Verständnis und die Unterstützung während der letzten Monate.

Erklärung

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Nathalie Maria Burger



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5985-9



9 783835 195985 9