Aus der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Schipper

# FUNKTIONELLE RELEVANZ VON CHEMOKINEN IM METASTASIERUNGSPROZESS VON KOPF-HALS KARZINOMEN

<u>Dissertation</u> zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christine Eulert

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. T.K. Hoffmann Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. B. Homey

# Inhaltsverzeichnis

<ul> <li>1 Einleitung</li> <li>1.1 Metastasierung</li> <li>1.1.1 Pathogenese</li> </ul>	2 3 4 5
1.1Metastasierung1.1.1Pathogenese	3 3 4 5
1.1.1 Pathogenese	3 4 5
	4 5
1.1.2 Die Organspezifität der Metastasierung	5
1.2 Chemokine	_
1.2.1 Die Chemokinsuperfamilie	5
1.2.2 Biologische Funktionen von Chemokinen und ihren Rezeptoren	11
1.2.3 Funktion von Chemokinen in malignen Erkrankungen	12
1.3 Maligne Kopf-Hals Tumore	13
1.3.1 Plattenepithelkarzinome	15
1.3.2 Adenoid-zystische Karzinome	16
1.4 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Charakterisierung der Chemokinrezeptorexpression in AZK und PEK de	r
Kopf-Hals-Region	19
2.1.1 Zelllinien und Zellkultur	19
2.1.2 Analyse der Chemokinrezeptorexpression auf RNS-Ebene mittels	
guantitativer real-time PCR (Tag-Man®)	21
2.1.3 Analyse der Chemokinrezeptorexpression auf Proteinebene <i>in vitro</i>	
mittels Durchflußzvtometrie	23
2.1.4 Analyse der Chemokinrezeptorexpression auf Proteinebene <i>in vivo</i>	
mittels Immunhistochemie	23
2.2 In vitro Funktion und Regulation tumorassozijerter Chemokinrezeptoren	25
2.2.1 Analyse von Migration und Invasion von Tumorzellen auf	
Chemokingradienten mittels Chemotaxis Assavs	25
2.2.2 Modulation von Chemokinrezentoren durch Chemotherapie	26
2.2.3 Analyse intrazellulärer Signaltransduktionswege mittels Western-	0
Blotting zum Nachweis aktivierter Signalmoleküle	27
224 Analyse chemokinvermittelter antiapontotischer Signale	28
3 Ergebnisse	

	3.1	Tumorzelllinien von adenoid-zystischen Karzinomen und	
	Platte	nepithelkarzinomen exprimieren distinkte Chemokinrezeptorprofile in vitro.	30
	3.1	.1 Chemokinrezeptorexpression von AZK und PEK auf RNS-Ebene	30
	3.1	.2 Chemokinrezeptorexpression von AZK und PEK auf Protein-Ebene	33
	3.2	AZK und PEK exprimieren distinkte Chemokinrezeptoren in vivo	36
	3.3	CXCR4 mediiert die gerichtete Migration von Tumorzellen in vitro	39
	3.4	Das antineoplastische Agens Cisplatin induziert CXCR4-Expression auf	
	Tumo	rzellen	40
	3.5	CXCL 12/CXCR4-Interaction führt zur Aktivierung von "survival nathwavs"	in
		CACE 12/CACIT-Interaction funit 201 Activitienting von Salvival pairways	
	Tumo	rzellen	43
4	Tumo Dis	rzellen	43 45
4 5	Tumo Dis Lite	instant 201 Activity of Survival pairways         instant 201 Activity of Survival pairwa	43 45 52
4 5 6	Tumo Dis Lite Zus	excel izrexert - interaction funitized Activitiening von Survival pairways erzellen kussion eraturverzeichnis	43 45 52 59

# Abkürzungen

Abb	-	Abbildung
Akt	_	Proteinkinase B
AZK	_	adenoid-zystisches Karzinom
DNS	-	Desoxyribonukleinsäure
cAMP	_	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	-	complementary DNA
ERK1/2	-	extrazellulär Signal-regulierte Kinasen 1 und 2
GPCR	-	G-Protein gekoppelter Rezeptor
IP <sub>3</sub>	-	Inositoltrisphosphat
KHT	_	Kopf-Hals Tumore
MAPK	_	durch Mitogene aktivierte Proteinkinasen
mRNS	_	Boten-RNS
PE	_	Phycoerythrin
PEK	_	Plattenepithelkarzinom
PIP <sub>2</sub>	_	Phosphatidylinositolbiphosphat
PKB	_	Proteinkinase B, Akt
RNS	_	Ribonukleinsäure
RT-PCR	_	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS PAGE	_	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophorese
Tab	_	Tabelle

# 1 Einleitung

Metastasierung ist das Resultat multipler, aufeinanderfolgender Ereignisse und stellt einen hochgradig organisierten, nicht zufälligen und organspezifischen Prozess dar<sup>1</sup>. Gerichtete Migration von Tumorzellen sowie ihre invasive Kapazität sind fundamentale Bestandteile des Metastasierungsprozesses. Obwohl eine Anzahl von bekannten, physiologischen Molekülen für die Stimulation von Tumorzellmotilität und -invasion von Bedeutung sind, sind die genauen molekularen Mechanismen, die die gerichtete Wanderung/Metastasierung von Tumorzellen in spezifische Organe vermitteln, weitestgehend unbekannt<sup>1-3</sup>.

Schlüsselprozesse stellen die Adhäsion an Endothelzellen, transendotheliale Migration sowie die gerichtete Wanderung durch extrazelluläre Matrix dar. In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß Chemokine und deren Rezeptoren für die Wanderung und das organspezifische "Homing" von Leukozyten von zentraler Bedeutung sind<sup>4</sup>. Chemokine sind Vertreter einer Superfamilie von kleinen, zytokinähnlichen Proteinen, die aufgrund ihrer Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die Polymerisation des Zytoskeletts, die feste Adhäsion an das Endothel sowie die gerichtete Wanderung von Leukozyten vermitteln<sup>4</sup>. Diese sezernierten Proteine interagieren in einer koordinierten Art und Weise mit Zelloberflächenproteinen wie beispielsweise Integrinen, um das spezifische "*homing*" von unterschiedlichen Subtypen hämatopoietischer Zellen in definierte anatomische Kompartimente zu steuern<sup>4,5</sup>.

Muller et al. konnten 2001 erstmals die funktionelle Bedeutung von Chemokin-Rezeptor-Interaktionen für den Metastasierungsprozess zeigen<sup>6-9</sup>. Dabei wurde der Chemokinrezeptor CXCR4 als zentraler Vermittler der hämatogenen Metastasierung Mammakarzinomzellen identifiziert und seine Relevanz in Rezeptorvon Antagonisierungsstudien *in vivo* demonstriert<sup>6</sup>. Anknüpfend an diese Beobachtungen sollte in der vorliegenden Arbeit die funktionelle Rolle von Chemokinen im Invasionsund Metastasierungsprozess von Kopf-Hals-Tumoren untersucht werden. Dabei stellen insbesondere zwei Tumorentitäten innerhalb der Gruppe der malignen Kopf-Hals-Karzinomen aufgrund distinkten ihres aber unterschiedlichen Metastasierungsmusters ein interessantes Untersuchungsobjekt dar: Während Plattenepithelkarzinome (PEK) der oropharyngealen Mukosa durch eine hohe Rate an lymphogenen Metastasen ( $\sim 60\%$ )<sup>10</sup> bei insgesamt später und seltener hämatogener Disseminierung (< 10%) charakterisiert sind<sup>11</sup>, zeigen die von den Speicheldrüsen ausgehenden adenoid-zystischen Karzinome (AZK) eine hohe Inzidenz an hämatogenen Metastasen (40-60%) bei gleichzeitig niedriger Inzidenz von Lymphknotenmetastasen (<10%)<sup>12</sup>. Bisher ist ungeklärt, welche molekularen Mechanismen diesen unterschiedlichen, annähernd reziproken Metastasierungsmustern zugrunde liegen.

#### 1.1 Metastasierung

Die wesentlichen Kriterien für die Malignität einer Neoplasie sind ihre autonome, invasive und destruktive Proliferation sowie die Fähigkeit zur Metastasierung. Unter dem Begriff der Metastasierung versteht man die Absiedlung von Tumorzellen abseits des Primärtumors. Metastasierung beruht auf dem komplexen Zusammenspiel verschiedener molekularer Ereignisse und stellt einen hochgradig organisierten, nicht zufälligen und organspezifischen Prozess dar<sup>13,14</sup> Statistisch betrachtet gelangen täglich pro Gramm Primärtumor bis zu 4 Mio. Zellen in den systemischen Kreislauf, wobei nur ein Bruchteil hiervon tatsächlich zur Entstehung einer Metastase führt<sup>15</sup>.

#### **1.1.1 Pathogenese**

Die Metastasierung stellt einen komplexen, mehrstufigen Prozess dar. Im ersten Schritt kommt es durch Veränderungen in den Zell-Zell-Kontakten zu einem Verlust der Adhäsion und Lösung von Tumorzellen aus dem Verband des Primärtumors<sup>16</sup>. Nachfolgend gewinnen Tumorzellen einzeln oder im Zellverbund Anschluß an das Blut- bzw. Lymphgefäßsystem, ein Vorgang welcher als Intravasation bezeichnet wird<sup>13,14,16</sup>. Von elementarer Bedeutung hierfür sind die Proteolyse extrazellulärer Matrix sowie die gerichtete Migration/Invasion von Tumorzellen<sup>14</sup>. Nach erfolgreicher Extravasation im Zielorgan stellen invasive Kapazität, Proliferation und Angiogenese Schlüsselprozesse dar, welche für die Entstehung eines metastatischen Focus sind<sup>13,14,16</sup>. Obwohl notwendiae Voraussetzung eine Anzahl bekannter. physiologischer Moleküle für die Stimulation von Tumorzellmotilität und -invasion von Bedeutung sind (Tab.1), sind die genauen molekularen Mechanismen, die die gerichtete Wanderung/Metastasierung von Tumorzellen in spezifische Organe vermitteln, weitestgehend unbekannt<sup>3,14,15</sup>.

<b>Biologische Funktion</b>	Beispielmoleküle	Literaturstelle
Überleben	Insuline like Growth Factor IGF	Bogenrieder 2003 <sup>14</sup>
Adhäsion	Cell adhesion molecules CAMs, Cadherine, Integrine	Hsu 2002 <sup>17</sup>
Migration	Chemokine, Met-SF/HGF- Signalweg	Müller 2001 <sup>6</sup> Boccaccio <sup>18</sup>
Proteolyse	MMPs, Heparanase	Egeblad 2002 <sup>19</sup>
immune escape	Verlust der MHC-Expression	Bogenrieder 2003 <sup>14</sup>

Tabelle 1. Molekulare Mechanismen der Metastasierung.

#### 1.1.2 Die Organspezifität der Metastasierung

Bereits 1889 beobachtete der Chirurg Stephen Paget, daß bei Karzinompatienten bestimmte Organe eine große Anzahl von Metastasen aufwiesen, während andere kaum Metastasen zeigten<sup>20</sup>. Die Ursache hierfür blieb jedoch ein Rätsel, da die beobachteten Metastasierungsmuster nicht allein durch anatomische Unterschiede in Blut- und Lymphfluss verschiedener Organe erklärt werden konnten<sup>15,20</sup>. Bis heute wurden drei verschiedene wissenschaftliche Konzepte entwickelt, die die Problematik organspezifischer Metastasierung versuchen, zu erklären.

Das erste Konzept ist die sogenannte "*growth factor theory*". Sie postuliert, daß Tumorzellen in allen Organen in Abhängigkeit von der Hämodynamik extravadieren, aber nur in solchen Organen multiplizieren, die entsprechende Wachstumsfaktoren bereitstellen<sup>16</sup>.

Die "*adhesion theory*" besagt, daß die Extravasation von Tumorzellen durch bestimmte Adhäsionsmoleküle gesteuert wird, die ihrerseits wiederum vom Endothel in einer organspezifischen Art und Weise exprimiert werden<sup>21</sup>.

Die dritte Theorie ist die "*chemoattractant theory*". In Studien wurde gezeigt, daß Tumorzellen aufgrund von Chemokingradienten in bestimmte Organe metastasieren können<sup>6,7,9,22</sup> (Abb. 1). Chemokine sind chemotaktisch wirksame, zytokinähnliche Moleküle, deren Struktur und Funktion im Folgenden näher erläutert wird.



Abbildung 1. Chemokine im Metastasierungsprozess. Schematische Darstellung der funktionellen Relevanz von Chemokinen im Metastasierungsprozess.

(Lance A. Liotta, Nature 2001)

# 1.2 Chemokine

Chemokine sind kleine (8-14 kD), zytokinähnliche Proteine, die aufgrund der Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) verschiedene Zellen anlocken und aktivieren können. In ihrer Paraderolle kontrollieren sie physiologischerweise das Wanderungsverhalten von Leukozyten<sup>4,23,24</sup>.

# 1.2.1 Die Chemokinsuperfamilie

Typisches Merkmal der Chemokine ist ihre Aminosäuresequenz. In der Regel finden sich vier konservierte Cystein-Aminosäuren. Anhand der Abfolge der ersten beiden Cystein-Aminosäuren werden vier distinkte Chemokin-Subfamilien unterschieden (Tab.2)<sup>23</sup>. Erstens, die CC-Chemokinfamilie, bei der die ersten beiden Cysteine in direkter Nachbarschaft angeordnet sind, zweitens, die CXC-Chemokinfamilie mit Separation der ersten beiden Cystein-Aminosäuren durch ein "Nicht-Cystein"; drittens, die C-Chemokine, die als Besonderheit nur einen Cystein-Rest aufweisen und viertens, die CX3C-Chemokinfamilie, deren Vertreter drei "Nicht-Cysteine"

zwischen den ersten beiden Cystein-Aminosäuren in der Aminosäuresequenz zeigen<sup>4,23,24</sup>.

Struktur	Name
NH2 C X CCCCOOH	CXC – Chemokinfamilie (alpha)
NH2 C CCCCOOH	CC – Chemokinfamilie (beta)
NH2 C CCOOH	C – Chemokinfamilie (gamma)
NH2 <mark>C X3 C</mark> CCCOOH	CX3C – Chemokinfamilie (delta)

Tabelle 2. Struktur und Name der Chemokine.

Nach anfänglich uneinheitlicher Benennung der Chemokine regten die Drs Yoshie und Zlotnik eine systematische Nomenklatur an (Keystone Conference 1999), die mittlerweile von der WHO übernommen wurde und bei der sich der Name aus der Chemokinsubfamilie (z.B. CC oder CXC) und dem Zusatz L für Ligand (Chemokin) oder R für Rezeptor ergibt (IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature, 2003). Bislang sind 25 humane CC-Chemokine, 15 humane CXC–Chemokine, zwei humane C–Chemokine und ein humanes CX3C–Chemokin bekannt.

CC Chemokin / Rezeptor Familie						
Systematischer Name	Humaner Ligand	Muriner Ligand	Chemokinrezeptor(en)			
CCL1	I-309	TCA-3, P500	CCR8			
CCL2	MCP-1, MCAF	MCP-1, JE	CCR2, CCR5			
CCL3	MIP-1α, LD78α, LD78β, AT464.1, AT464.2, GOS19-1, GOS19-2	MIP-1α	CCR1, CCR5			
CCL4	MIP-1β, AT744.1, AT744.2, Act-2, G-26, HC21, H400, LAG-1	ΜΙΡ-1β	CCR1, CCR5, CCR8			
CCL5	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3,CCR4, CCR5			
CCL6	Unbekannt	C10, MRP-1				
CCL7	MCP-3	NC28, FIC, MARC	CCR1, CCR2, CCR3			
CCL8	MCP-2, HC14	MCP-2	CCR2, CCR3			
CCL9/10	Unbekannt	MRP-2, CCF18, ΜΙΡ-1γ	Unbekannt			
CCL11	Eotaxin	Eotaxin	CCR3			
CCL12	Unbekannt	MCP-5	CCR2			
CCL13	MCP-4, NCC-1, CKβ–10	Unbekannt	CCR2, CCR3			
CCL14	HCC-1, HCC-3, NCC-2	Unbekannt	CCR1			
CCL15	HCC-2, MIP-1∂, NCC-3, MIP-5, Lkn-1	Unbekannt	CCR1, CCR3			
CCL16	HCC-4, NCC-4, LEC, LMC	LCC-1	CCR1			
CCL17	TARC, dendrokine	TARC	CCR4, CCR8			
CCL18	DC-CK1, PARC, MIP-4, AMAC-1	Unbekannt	Unbekannt			
CCL19	MIP-3 $\beta$ , ELC, exodus-3, Ck $\beta$ –11	ΜΙΡ-3β	CCR7			
CCL20	MIP-3 $\alpha$ , LARC, exodus-1,	MIP-3α	CCR6			
CCL21	6Ckine, SLC, exodus-2, TCA-4	6Ckine	CCR7			
CCL22	MDC, STCP-1, DCtactin- $\beta$	ABCD-1	CCR4			
CCL23	MPIF-1, MIP-3, CKβ8, CKβ8-1	Unbekannt	CCR1			
CCL24	Eotaxin-2, MPIF-2, Ckβ–6	Unbekannt	CCR3			
CCL25	TECK	TECK	CCR9 (GPR9-6)			
CCL26	Eotaxin-3	Unbekannt	CCR3			
CCL27	CTACK, ALP	CTACK, ALP	CCR10			
CCL28	CCL28, MEC	CCL28	CCR10			

 Tabelle 3. Systematische Nomenklatur f
 ür Chemokine (Keystone Meeting 1999).

## CXC Chemokin / Rezeptor Familie

<i>Systematischer Name</i>	Humaner Ligand	Muriner Ligand	Chemokinrezeptor(en)
CXCL1	GRO-1, GRO $\alpha$ , MGSA- $\alpha$	GRO/KC	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	GRO2, GRO $\beta$ , MIP-2 $\alpha$ , MGSA- $\beta$	GRO/KC	CXCR2
CXCL3	GRO3, GRO $\gamma$ , MIP-2 $\beta$	GRO/KC	CXCR2
CXCL4	PF4	PF4var1, PF4alt	Unbekannt
CXCL5	ENA-78	LIX	CXCR2
CXCL6	GCP-2	ΟΚα-3	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	Unbekannt	CXCR2
CXCL8	IL-8, MDNCF, NAP-1, NCF	Unbekannt	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig, Humig	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	crg-2, mob-1	CXCR3
CXCL11	I-TAC, H174, b-R1	Unbekannt	CXCR3
CXCL12	SDF-1 $\alpha$ , SDF-1 $\beta$ , PBSF	SDF-1 $\alpha/\beta$	CXCR4
CXCL13	BLC, BCA-1,	BLR1L, Angie	CXCR5
CXCL14	BRAK, bolekine	BRAK	Unbekannt
CXCL15	Unbekannt	Lungkine	Unbekannt
CXCL16	CXCL16	CXCL16	CXCR6 (STRL33)
C Chemokin / Re	ezeptor Familie		
Systematischer Name	Humaner Ligand	Muriner Ligand	Chemokinrezeptor
XCL1	Lymphotactin, SCM-1α, ATAC	Lymphotactin	XCR1
XCL2	SCM-1β		XCR1
CX3C Chemokir	n / Rezeptor		
Systematischer Name	Humaner Ligand	Muriner Ligand	Chemokinrezeptor
CX3CL1	Fractalkine, neurotactin	Fractalkine	CX3CR1

Die biologischen Effekte von Chemokinen werden durch die Interaktion mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die sieben transmembranäre Domänen besitzen, vermittelt (Abb.2). Ähnlich wie die Chemokinliganden zeigt die Familie der Chemokinrezeptoren in den letzten Jahren eine deutliche Expansion. Zur Zeit kennen wir 10 CC-, 6 CXC und je einen XC- sowie CX3C-Rezeptor (Tab.3). Neben den identifizierten Chemokinrezeptoren gibt es jedoch eine Reihe weiterer sogenannter "verwaister" GPCR, für die bis heute noch kein Ligand identifiziert werden konnte.

Ausgehend von rekrutierten G-Proteinen verwenden Chemokinrezeptoren verschiedene Signaltransduktionswege, um unterschiedliche biologische Funktionen zu vermitteln (Tab.3, Abb.2)<sup>4,23,24</sup>.



#### Abbildung 2. Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren.

Chemokinrezeptoren umfassen sieben transmembranäre Domänen und sind an G-Proteine gekoppelt. Zur Zeit kennen wir 10 CC-, 6 CXC-Rezeptoren, und je einen XC- und CX<sub>3</sub>C- Rezeptor. Verschiedene Signaltransduktionswege werden von Chemokinrezeptoren verwendet, um biologische Funktionen wie Integrinaktivierung, Apoptose, Genexpression, Adhäsion und Chemotaxis zu vermitteln.

Interessanterweise existiert ein gewisser Grad an Promiskuität innerhalb der Chemokinsuperfamilie. Dies äußert sich in der Tatsache, daß einige Liganden denselben Rezeptor für die Vermittlung ihrer biologischen Funktionen verwenden (Tab.3). Sortiert man Chemokinliganden nach ihrer chromosomalen Lage und ihrem Rezeptorbindungsverhalten, so fällt auf, daß sogenannte "Cluster"-Chemokine, die auf dem selben Chromosom lokalisiert sind und identische Rezeptoren binden, existieren (Tab.3, Abb.3). Eine kleinere Anzahl an Chemokinen, die sogenannten "Non-Cluster"-Chemokine, binden häufig einen spezifischen Rezeptor und haben eine besondere chromosomale Lokalisation (Tab.3, Abb.3)<sup>3</sup>.

Betrachtet man die Chemokinsuperfamilie in ihrer Gesamtheit, so fällt auf, daß die Vertreter, die als erstes identifiziert wurden, zu großen Mengen in vielen verschiedenen Zelltypen gebildet werden (z.B. CCL3-5). Die Chemokine, die als letztes gefunden wurden, zeigen im Gegensatz dazu ein sehr restriktives Expressionsmuster und sind nur in sehr wenigen Geweben und Zellen vorhanden (z.B. CCL25, CCL27, CCL28)<sup>3</sup>.



**Abbildung 3. "Cluster"- versus "Non-Cluster"-Chemokine.** Das Schema stellt die Rezeptor/Liganden-Interaktionen sowie die chromosomale Lokalisation von Chemokinen dar (rot = 4q12-q13, orange = 4q21.21, gelb = 10q11.1, violett = 17q11.2, rosa = 2q33-q37, hellblau = 1q23, dunkelblau = 19p13.2, hellgrün = 4q21, dunkelgrün = 16q13, tiefgrün = unbekannt, braun = 9p13, grau = 5p13). Es können "Cluster"-Chemokine (Liganden, die identische chromosomale Lage aufweisen) und "Non-Cluster"-Chemokine (Liganden in spezifischer chromosomaler Lokalisation) unterschieden werden.

Nach Bindung des Chemokins an den spezifischen Rezeptor können verschiedene Signalwege zur weiteren Signaltransduktion aktiviert werden, wie beispielsweise die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels, Aktivierung der Phospholipase C und Umwandlung von Phosphatidylinositolbiphosphat ( $PIP_2$ ) in Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerin, Aktivierung der Proteinkinase C, Phosphorylierung der Proteine Akt und ERK, sowie die Beeinflussung des cAMP Spiegels<sup>2,25</sup>. Besondere Erwähnung verdienen die Proteinkinase B (PKB), auch Akt genannt, und die durch Mitogene aktivierten Proteinkinasen (MAPK), vor allem die extrazellulär Signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2), da sie in den verschiedenen Signaltransduktionswegen Schlüsselpositionen besetzen<sup>26-29</sup>. Zentrale Elemente dieser Transduktionswege sind die Phosphoinositid-3 Kinase, die ihrerseits zur Phosphorylierung und Aktivierung von Akt führt und das Oncogen Ras, welches in der Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 mündet<sup>29,30</sup>. Die vermittelten Funktionen sind beispielsweise die Induktion von Aktinpolymerisation und Chemotaxis<sup>31</sup> sowie Zellreifung und Reduktion der Apoptoserate<sup>32,33</sup>. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass verschiedene Malignome eine erhöhte Akt-Aktivität besitzen, was in einer verminderten Apoptoserate, einer vermehrten Proliferation und Invasivität des jeweiligen Tumors resultiert<sup>27,34-37</sup>.

Auf zellulärer Ebene werden durch Chemokin/Rezeptor-Interaktionen zentrale Prozesse reguliert<sup>26</sup>: der Zellzyklus, das Wachstum, die Zellmotilität sowie das Überleben der Zelle<sup>26,28</sup>, wobei die Steuerung direkt über die Beeinflussung regulatorischer Proteine oder indirekt über die Kontrolle der Transkription und des Zellmetabolismus erfolgen kann<sup>29</sup>. Die biologischen Funktionen, die durch Chemokine und ihre Rezeptoren vermittelt werden können, wie z.B. Apoptose, Genexpression, Integrinaktivierung, Reorganisation des Zytoskeletts, Adhäsion sowie gerichtete Migration (Tab. 3, Abb. 2) werden im Folgenden näher beleuchtet<sup>4,23,24</sup>.

#### 1.2.2 Biologische Funktionen von Chemokinen und ihren Rezeptoren

In ihrer Paraderolle regulieren Chemokine die Leukozytenmigration. Zusammen mit Adhäsionsmolekülen vermitteln Chemokine die feste Adhäsion von Leukozyten an das Endothel, die transendotheliale Migration sowie Wanderung durch extrazelluläre Matrix und bestimmen die spezifische Lokalisierung distinkter Leukozytensubpopulationen in peripheren Geweben<sup>4,23,24</sup>. Diese initialen Befunde zur Biologie von Chemokinen identifizieren Angehörige dieser Proteinsuperfamilie als potente die Kandidaten, die Rekrutierung von pathogenetisch relevanten Leukozytensubpopulationen in periphere Organe steuern und somit sowohl in der Initiierung als auch in der Chronifizierung von Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen<sup>4</sup>. Chemokine sind für das Zusammenspiel und die Funktion des Immunsystems von elementarer Bedeutung. Sie regulieren die zielgerichtete Migration naiver und auch reifer immunkompetenter Zellen, sie beeinflussen wesentlich den Aufbau der primären und sekundären lymphatischen Organe, die T-**B-Zellreifung** sowie Tropismus und "Homing" und den das von Leukozytensubpopulationen<sup>23,34,37</sup>. Auch bei vielen entzündlichen Erkrankungen konnte die Schlüsselrolle von Chemokinen und ihren Rezeptoren gezeigt werden. Akute Entzündungen wie beispielsweise Sepsis oder bakterielle Pneumonien werden wesentlich von Chemokinen reguliert<sup>35,38</sup>. Auch chronische oder rezidivierende Entzündungen sind durch das Zusammenspiel spezifischer Chemokine und ihrer Rezeptoren charakterisiert. Wichtige Beispiele sind die Multiple Sklerose<sup>33</sup>, die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen<sup>34</sup>, die rheumatoide Arthritis<sup>35</sup>, die Psoriasis<sup>37</sup> sowie Erkrankungen des atopischen Formenkreises<sup>38</sup>.

Mit Fortschreiten der Chemokinforschung konnten weitere biologische Funktionen entdeckt werden. So werden zum Beispiel Angiogenese und Angiostase unter anderem von Chemokinen beeinflusst<sup>23</sup>. In Tierversuchen führte das Fehlen des Chemokin-Rezeptorenpaares CXCL12/CXCR4 zu schweren kardiovaskulären Fehlbildungen<sup>31</sup>. Darüber hinaus vermitteln Chemokine Veränderungen in der Genexpression, die Reorganisation des Zytoskeletts und können die Apoptose von Zellen beeinflussen<sup>4,23,24</sup>.

#### 1.2.3 Funktion von Chemokinen in malignen Erkrankungen

Neben ihrer zentralen Bedeutung für die Leukozytenwanderung spielen Chemokine eine komplexe Rolle im Tumormikromilieu. Dabei vermitteln Chemokine nicht nur die Anti-Tumor-Immunantwort, sondern agieren als potentielle Tumorprogressoren beispielsweise durch die Stimulation von Wachstumsfaktoren und angiogenetischen Faktoren, durch Induktion von Matrix-Remodellierung oder Tumorzellmigration, durch Modulation von Adhäsionsmolekülen und durch eine Umkehrung der Anti-Tumor-Immunantwort<sup>2</sup>. Darüber hinaus können Chemokine direkt Angiogenese induzieren<sup>2</sup> und die Proliferation von Tumorzellen beeinflussen<sup>2</sup>. Ein Meilenstein gelang 2001 Müller et al., die die funktionelle Relevanz von Chemokin/Rezeptor-Interkationen für die Migration und Metastasierung von Tumorzellen im Mammakarzinom demonstrieren konnten<sup>6,7,9</sup>. Eine umfassende guantitative real-time PCR-Analyse aller bekannten Chemokinrezeptoren (CCR1-CCR10, CXCR1-CXCR5, XCR1 und CX3CR1) ergab, daß Zellen dieser Tumorentität Chemokinrezeptoren in definierter Weise auf mRNS-Ebene exprimieren. Dabei zeigten Mammakarzinomzellen im Vergleich zu normalen duktalen Mammaepithelzellen eine deutliche Überexpression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR7. Diese Beobachtungen ließen sich auf Proteinebene sowohl in vitro als auch in vivo bestätigen. Vergleichende, quantitative PCR-Analysen der korrespondierenden Liganden für CXCR4, CXCL12, bzw. für CCR7, CCL21, ergaben, daß diese Chemokine selektiv und am höchsten in Organen gebildet werden, die primäre Metastasierungsziele des Mammakarzinoms darstellen (Lunge, Leber, Knochenmark, Lymphknoten), jedoch auf signifikant niedrigerem Niveau in Organen gebildet werden, die seltener Mammakarzinommetastasen aufweisen (Haut, Skelettmuskel). In vitro induzierten CXCL12 und CCL21 Aktinpolymerisation, Pseudopodienbildung sowie Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen. Eine Neutralisation der CXCL12-CXCR4-Signaltransduktion in vivo mittels eines blockierenden anti-CXCR4-Antikörpers führte zu einer signifikanten Reduktion (65-83%) Metastasierung der von humanen Mammakarzinomzellen in Lunge und Lymphknoten in einem orthotopen Mammakarzinommodell.

Diese Beobachtungen beschränken sich nicht nur auf das Mammakarzinom, Chemokine scheinen prinzipiell für den Metastasierungsprozess maligner Tumoren von Bedeutung zu sein<sup>39</sup>. Auch andere Gruppen konnten aktuell dieses Konzept stützen und zeigen, daß beispielsweise die akute myeloische und lymphoblastische Leukämie<sup>40</sup>, die chronische lymphatische Leukämie<sup>41</sup>, das Non-Hodgkin B-Zell-Lymphom<sup>42</sup>, das Ovarialkarzinom<sup>43</sup> sowie das Pankreaskarzinom<sup>44</sup> funktionell aktive Chemokinrezeptoren ausprägen, welche die Migration von Tumorzellen vermitteln. Weitere Beispiele sind auch das Bronchialkarzinom, das maligne Melanom und das Endometriumkarzinom<sup>45-47</sup>.

#### 1.3 Maligne Kopf-Hals Tumore

Unter dem Begriff der malignen Kopf-Hals-Tumore (KHT) wird eine Vielzahl unterschiedlicher Neoplasien zusammengefasst, die im Bereich von Mund, Rachen

oder Kehlkopf entstehen. Mit einer weltweiten Inzidenz von über 500.000 Fällen jährlich besitzen maligne KHT eine große epidemiologische Bedeutung und gehören zu den häufigsten Malignomen<sup>48</sup>. Bezogen auf die deutsche Bevölkerung rechnet man basierend auf den Daten der jeweiligen, landeseigenen Krebsregister mit einer Inzidenz von ca. 13.000 Fällen jährlich. Hierbei sind Männer, abhängig von der Tumorlokalisation, insgesamt drei- bis fünfmal häufiger betroffen als Frauen. Dieser Unterschied spiegelt sich auch in der altersbereinigten Mortalitätsrate der 20 häufigsten Krebstodesursachen wider: während sich im Jahr 2003 maligne KHT an sechster Stelle der häufigsten Krebstodesursachen der männlichen Bevölkerung finden, stehen sie in der weiblichen Bevölkerung an 17. Stelle (GEKID, 2006). Unterstrichen wird die Bedeutung dieser Zahlen durch die Tatsache, dass Lebensjahr Neoplasien bis zum 85. die häufigste Todesursache im Erwachsenenalter darstellen<sup>49</sup>. Über 60% der Malignome des Kopf-Hals Bereichs befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnose in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, in über 50% der Fälle weisen die Patienten bei Erstdiagnose bereits Lymphknotenmetastasen auf<sup>50</sup>. Entscheidend für die Überlebensrate und die Prognose von Tumorpatienten sind vor allem das Tumorstadium und die Metastasierung<sup>2,15,51</sup>. Obwohl durch Einschluss modernster Operationstechniken in Kombination mit Chemotherapie- und Bestrahlungsprotokollen Fortschritte in der lokoregionären Kontrolle erzielt wurden, hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate seit zwei Dekaden nicht wesentlich verbessert<sup>52</sup>.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei histologische Subtypen der Kopf-Hals Tumoren gewählt, die sich durch ihr nahezu reziprokes Metastasierungsverhalten (Tab.4) als Experimentalmodell besonders anbieten, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Chemokinrezeptorexpression und organspezifischer Metastasierung der malignen KHT zu erforschen: das Plattenepithelkarzinom (PEK) und das adenoid-zystische Karzinom (AZK).

	Metastasierungsmuster		
	Lymphogen	Hämatogen	
AZK	spät, selten	früh, häufig	
PEK	früh, häufig	spät, selten	

#### Tabelle 4. Metastasierungsmuster von AZK und PEK.

#### 1.3.1 Plattenepithelkarzinome

Das Plattenepithelkarzinom (PEK) ist mit über 90% der häufigste histologische Subtyp der Kopf-Hals-Tumore und entsteht aus mukosalen Keratinozyten der oberen Schluck-Atemstraße<sup>48,53</sup>. Die wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten eines PEK sind Nikotin- und Alkoholabusus<sup>51</sup>. Jeder dieser Faktoren erhöht für sich genommen das Erkrankungsrisiko um das drei- bis neunfache, während beide gemeinsam das Risiko an einem Plattenepithelkarzinom zu erkranken, um den Faktor Hundert steigern<sup>51</sup>. Auch das Auftreten von Zweitneoplasien, die bei PEK im Kopf-Halsbereich in 20 bis 33% der Fälle auftreten und zu einer deutlichen Einschränkung werden durch fortbestehende der Lebenserwartung führen, Rauchund Alkoholgewohnheiten stark begünstigt<sup>54</sup>. Histopathologisch können verschiedene Differenzierungsgrade des PEK unterschieden werden: entdifferenziert/anaplastisch, gering differenziert, mäßig und hoch differenziert. Das PEK zeichnet sich durch eine frühe lymphogene Metastasierung aus, zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bestehen bereits in über 50% der Fälle bereits Lymphknotenmetastasen, eine hämatogene selten und wenn überhaupt im verzögerten Intervall<sup>50</sup>.

Die Therapie der PEK des Kopf-Hals-Bereiches erfolgt stadienabhängig. In den Stadien I und II (Tumorgröße unter 4cm ohne Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen) sind die und/oder Operation Bestrahlung mit guten Heilungserfolgen Therapie der Wahl<sup>47,50</sup>. Im häufigeren Fall der fortgeschrittenen PEK der Stadien III und IV (Tumorgröße größer als 4cm mit Lymphknotenbefall oder Fernmetastasen) erfolgt die Behandlung chirurgisch in Kombination mit Radiatio und Chemotherapie oder durch eine primäre Radiochemotherapie. PEK der Stadien III und IV besitzen jedoch trotz extensiver, multimodaler Therapiekonzepte eine schlechte Prognose<sup>50</sup>. Deshalb wurde in zahlreichen Studien nach prognostisch relevanten Faktoren geforscht. Es konnte gezeigt werden, dass neben dem Tumorstadium vor allem die Ausprägung der lymphogenen Metastasierung gemessen an der Anzahl der Lymphknotenmetastasen, einer veränderten der befallenen Lymphknoten ein Überschreiten Morphologie und der Lymphknotenkapsel Prognose-limitierend sind<sup>15,44,55</sup>

Trotz großer Anstrengungen, bestehende Therapiekonzepte zu optimieren und dem erreichten Teilerfolg der höheren lokoregionären Kontrolle, konnte bisher keine durchgreifende Verbesserung der Prognose von Patienten mit KHT im metastasierten Stadium erzielt werden<sup>48,50</sup>.

#### 1.3.2 Adenoid-zystische Karzinome

Das adenoid-zystische Karzinom (AZK) ist ein maligner epithelialer Tumor, der seinen Ursprung von den Speicheldrüsen nimmt und mit 3-5% aller Kopf-Hals Karzinome im Vergleich zum PEK (bis zu 90%) eine seltene Tumorentität darstellt<sup>56</sup>. Bezüglich der Lokalisation und der Häufigkeit sind die großen und kleinen Speicheldrüsen zu je 50% betroffen. Im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches gibt es keine bekannten Risikofaktoren für das AZK. Daher ist diese Tumorentität keinen präventiven Maßnahmen zugänglich<sup>56</sup>. Histologisch lässt sich das AZK anhand seines Wachstums in drei Formen einteilen: glandulärkribriform, tubulär und solide. Ein besonders typisches Merkmal der AZK sind ein schwer beurteilbares, häufig unterschätztes, infiltratives Wachstum sowie die Tendenz, sich entlang von Nervenstrukturen auszubreiten. Die Krankheitsprogression zeichnet sich durch zahlreiche Rezidive und einen protrahierten Verlauf aus. Im Gegensatz zum PEK ist das AZK durch eine frühe, hämatogene Metastasierung in distinkte Organe wie Lunge, Gehirn, Knochen und Leber charakterisiert<sup>57</sup>. Fernmetastasen können aber auch nach Jahren aggressiver Therapie und lokoregionärer Kontrolle des Primärtumors auftreten<sup>58,59</sup>. Perineurale Invasion und eine ausgedehnte Tumorgröße sind wichtige Hinweise auf mögliche Fernmetastasen<sup>60</sup>. Lymphogene Metastasen sind im Gegensatz zum PEK selten<sup>60</sup>. Sowohl Fernmetastasen als auch Lymphknotenmetastasen werden als ungünstige Marker gewertet<sup>61</sup>. Die Standardtherapie besteht in einer prognostische chirurgischen Intervention, dabei wird das Ausmaß des Eingriffs durch die Lokalisation sowie die Größe des Primärtumors bestimmt. Bei ausgedehnten Befunden empfehlen neuere Studien zur besseren lokoregionären Kontrolle eine postoperative Radiatio<sup>61</sup>. Für den häufig vorzufindenden Fall des metastasierten AZK (40-60%) wurde der Einsatz einer Vielzahl antineoplastisch wirksamer Substanzen beschrieben, ohne daß sich bislang hieraus ein etabliertes Standardprotokoll entwickelt hätte. Das bei malignen KHT am häufigsten verwendete Chemotherapeutikum stellt Cisplatin dar<sup>50</sup>.

*Wirkmechanismus von Cisplatin.* Cisplatin (Cis-Diammindichloroplatinum (II)) ist ein planarer Schwermetallkomplex, um dessen Platin–Zentralatom sich zwei Aminogruppen und zwei Chloratome gruppieren<sup>62</sup> Die zytotoxische Wirkung resultiert aus einer Ereigniskette, an deren Ende der programmierte Zelltod, die Apoptose, steht<sup>62,63</sup>. Dabei beruht der zytotoxische Effekt auf der Vernetzung der DNS mit Bildung sogenannter "crosslinks" durch Cisplatin<sup>62,64</sup>. Die Alteration der DNS wird durch verschiedene Typen regulatorischer Proteine entdeckt und führt zu pro- sowie antiapoptotischen Signalen. Zum einen werden Reperaturmechanismen initiert, zum Beispiel durch Proteine der Xeroderma Pigmentosum Gruppe<sup>65</sup>. Zum anderen werden proapoptotische Proteine, wie zum Beispiel p53, aktiviert<sup>63</sup>. Wichtig für die Signaltransduktion bis zur Apoptose sind die Mitogen aktivierten Proteinkinasen MAPK und ihre Effektoren ERK1/2, sowie die Kinase Akt<sup>63</sup>.

*Cisplatin-Resistenzmechanismen.* Es gibt verschiedene Ursachen, die zur Resistenz maligner Zellen gegen Cisplatin führen können<sup>63</sup>. Neben einer gesteigerten Aktivität der DNS-Reperaturproteine können auch Veränderungen in der Signaltransduktion zwischen DNS und effektiver Apoptose zu einer Cisplatinresistenz führen<sup>63,66</sup>. Hierbei sind ebenfalls die vorher beschriebenen Moleküle Akt und ERK1/2 von großer Bedeutung<sup>63,67</sup>.

Da neue therapeutische Substanzen häufig mit konventionellen Standardverfahren kombiniert werden, ist es wichtig, die Wege ihrer Interaktion und Regulation zu verstehen. Darüber hinaus entwickeln Tumorzellen, die eine Behandlung mit ionisierenden Strahlen oder Chemotherapeutika überlebt haben, nicht selten einen anderen Phänotyp im Vergleich zur Zellpopulation vor Therapie, bis hin zu einem erhöhten metastastischen Potential<sup>68</sup>.

# 1.4 Fragestellung

Aufgrund der Tatsache, daß die lymphogene und hämatogene Metastasierung eine der Hauptursachen für die tumorspezifische Letalität maligner Erkrankungen darstellt, ist es von zentraler Bedeutung, die dem Metastasierunsprozess zugrunde liegenden molekularen Mechanismen besser zu verstehen, um neue tumorspezifische Behandlungsstrategien entwickeln zu können. Tumorzellmigration und Metastasierung zeigen deutliche Gemeinsamkeiten mit dem Wanderungsverhalten von Leukozyten, das wesentlich von Chemokinen beeinflusst wird<sup>14</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden das PEK und das AZK aufgrund ihres nahezu reziproken Metastasierungsverhaltens als Modell gewählt, um folgende zentrale Fragen zu untersuchen:

a) Ist das generelle Konzept, daß Chemokine von funktioneller Relevanz für den Metastasierungsprozess sind, übertragbar auf maligne KHT, und unterscheiden sich PEK und AZK in ihrem Chemokinrezeptorprofil? Hierfür wurde die Expression aller Chemokinrezeptoren *in vitro* und *in vivo* in verschiedenen Erkrankungsstadien von PEK und AZK untersucht.

b) Welche Funktionen werden durch Chemokinrezeptoren in Tumorzellen vermittelt? Um dieser Frage nachzugehen, wurden Chemokin/Rezeptor-Interaktionen an etablierten Zellinien von PEK und AZK durch funktionelle *in vitro*-Assays untersucht, sowie nach intrazellulären Mechanismen der Signaltransduktion geforscht.

c) Wie werden tumorassozierte Chemokinrezeptoren reguliert? Hierfür wurde der Effekt verschiedener, für das "tumor microenvironment" relevanter Faktoren einschließlich Chemokine, Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine auf die Chemokinrezeptorexpression untersucht. Ein weiterer Aspekt war die Untersuchung der Interaktion zwischen Chemokinrezeptorexpression und Chemotherapie.

# 2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Chemokinen und ihren Rezeptoren im Metastasierungsprozess von Tumoren der Kopf-Hals-Region untersucht. Dabei wurden zwei histologische Entitäten einander gegenüber gestellt, die sich klinisch durch ihr distinktes Metastasierungsmuster unterscheiden: das Plattenepithelkarzinom (PEK) mit überwiegend lymphogener Metastasierung und das adenoid-zystische Karzinom (AZK) mit vorwiegend hämatogener Disseminierung. Methodische Schwerpunkte finden sich in folgenden molekularbiologischen und zellbiologischen Bereichen:

- Zellkultur primärer Tumorzellen
- quantitative real-time PCR
- Durchflußzytometrie
- Immunhistochemie
- Chemotaxis-Assays
- Western-Blotting
- Apoptose-Nachweis

# 2.1 Charakterisierung der Chemokinrezeptorexpression in AZK

# und PEK der Kopf-Hals-Region

Zur Charakterisierung der Chemokinrezeptorexpression in humanen AZK und PEK wurden zunächst umfassende Analysen aller Chemokinrezeptoren mittels quantitativer real-time PCR, Durchflußzytometrie und Immunhistochemie durchgeführt.

# 2.1.1 Zelllinien und Zellkultur

Zur Charakterisierung des Chemokinrezeptorprofils von AZK und PEK der Kopf-Hals-Region *in vitro* wurden primäre Zellkulturen untersucht.

**Zelllinien.** Zelllinien von AZK sind im Gegensatz zu PEK schwierig zu etablieren. Aus diesem Grund sind in der Weltliteratur nur wenige etablierte AZK-Linien bekannt. Eine der am besten charakterisierten AZK-Zellinien stellt die ACC-3-Linie (ACC-3/ACC T#3, Prof. Saku, Niigata, Japan) dar. Diese sowie die Zellinie ACC-2 (ACC-2/ACC T#2, Prof. Qiu Wie-liu, Shanghai Second Medical University, P.R. of China), welche aus AZK generiert wurden (He RG, 1986), wurden der Arbeitsgruppe freundlicherweise durch Dr. W.L. Qiu (Shanghai, China) zur Verfügung gestellt.

Die primären Zelllinien der PEK wurden von Primärtumoren im Kopf-Hals Bereich (UD-SCC 1 – 4/SCC T#1 – 4, UD–SCC 6/SCC T#6, UD–SCC 7A/SCC T#7, UD–SCC8/SCC T#8, UM-SCC 10A/SCC T#10, UM-SCC 17A/SCC T#17, UM-SCC 24A/SCC T#24) sowie deren zugehörigen Lymphknotenmetastasen (UD-SCC 7B/SCC M#7, UM-SCC 10B/SCC M#10, UM-SCC 17B/ SCC M#17, UM-SCC 24B/SCC M#24) etabliert. Eine detaillierte Ausführung zur Etablierung dieser Zelllinien und deren Charakterisierung wurden von Ballò und Masters verfasst<sup>69</sup>.

Zelllinie	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter <sup>2</sup>	TNM	Ursprung
SCC T#1	m³	64	pT3pN2b	Tonsilla palatina
SCC T#2	m	58	pT1pN3	Hypopharynx
SCC T#3	m	45	pN+	Larynx
SCC T#4	m	45	pT3pN1	Zungengrund
SCC T#6	m	62	pT2N0M0	Zunge
SCC T#7	m	71	T2N2b	Valleculae
SCC T#8	m	43	unbekannt	Larynx
SCC T#10	m	57	T3N0M0	Stimmband
SCC M#10	m	58	T3N1M0	Lymphknotenmetastase
SCC T#17	W <sup>4</sup>	47	T1N0M0	Supraglottis
SCC M#17	W	47	T1N0M0	Halsweichteile
SCC T#24	m	41	T2N0M0	Zunge
SCC M#24	m	41	T2N0M0	Hals, persistierende Metastase

<sup>1</sup>Geschlecht des Patienten, <sup>2</sup>Alter bei Erstdiagnose, <sup>3</sup>männlich, <sup>4</sup>weiblich

*Kultivierung.* Die Tumorzellen wurden in 75cm<sup>2</sup> Falcon-Kulturflaschen Cellstar® (Greiner bio-one, Essen, Deutschland) als Monolayer kultiviert. Die routinemäßige Propagation der Zellen erfolgte in DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium von Gibco, Eggenstein, Deutschland) und dem Zusatz von 10%, hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum FCS (Gibco, Eggenstein, Deutschland) und 2mM L-Glutamin (Gibco, Eggenstein, Deutschland) sowie einer antibiotisch-antimykotischen Lösung (Gibco, Eggenstein, Deutschland). Als einzige Ausnahme ist die Zelllinie ACC T#2 (ACC-2) zu nennen, die RPMI (Gibco, Eggenstein, Deutschland) mit identischen Zusätzen, also 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS), 2mM L-Glutamin

und 1% antibiotisch-antimykotischer Lösung als Nährmedium erhielt. Für Kontrollversuche wurden, nach regelrechter Einverständniserklärung der Spender, primäre Keratinozyten aus gesunder Schleimhaut gewonnen und kultiviert. Hierzu wurden Gewebeproben in schmale Streifen geschnitten und mit Dispase-I Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die mukosalen Keratinozyten vorsichtig von der Lamina propria gelöst und mit Trypsin-EDTA Lösung (Boehringer, Mannheim, Deutschland) bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde eine homogene Zellsuspension der primären mukosalen Keratinozyten in serumfreiem Keratinozyten-Medium (Keratinocyte-SFM von Gibco, Eggenstein, Deutschland) mit dem Zusatz von antibiotisch-antimykotischer Lösung (ebenfalls von Gibco) vorbereitet und in 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät.

#### 2.1.2 Analyse der Chemokinrezeptorexpression auf RNS-Ebene mittels

#### quantitativer real-time PCR (Taq-Man®)

Zur Charakterisierung des Chemokinrezeptorprofils von AZK und PEK auf RNS-Ebene dienten Analysen mittels quantitativer real-time PCR.

Hierzu musste zunächst wie nachfolgend beschrieben die RNS aus den Zellen extrahiert, die Proben mit DNAse inkubiert und in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben werden.

**RNS-Extraktion**. Zur Extraktion der Gesamt-RNS wurden die Zellen nach Entfernen des Kulturüberstandes in 5ml TRIZOL<sup>®</sup> aufgenommen. Nach Zugabe von 1ml Chloroform wurden die Proben 20 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert, um die RNS von der DNS- und Proteinphase zu trennen. Die wässrige, RNS-haltige Phase wurde in ein sauberes Gefäß übernommen und das gleiche Volumen an –20°C vorgekühltem Isopropanol zugegeben. Nun wurde die RNS über Nacht gefällt und anschließend zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet und in 50µl DEPC-Wasser (Roth, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Die beschriebenen Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte durch Messung der Absorption im Bereich von 260 nm, 280 nm und 320 nm mit einem Pharmacia Biotech Ultrospec 3000 Spektralphotometer. Die Konzentration und Reinheit wurde nach Sambrook *et al.*<sup>70</sup> berechnet. Für RNS entspricht eine Absorption A260 von 1 der Konzentration von genau 40 µg RNS/ml.

Generierung der cDNS mittels Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR). Zur reversen Transkription der Gesamt-RNS zu cDNS (RT-PCR) wurden 4µg RNS in 10µI DEPC-H2O (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 1µI DNAse I (Roche, Mannheim, Deutschland), 1,5µl 5-fach RT-Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 1µl RNAse-Inhibitor (RNAsin, Roche, Mannheim, Deutschland) und 2,5µl DEPC-H2O für 20 min bei 37°C gefolgt von 10 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die Proben nach Zugabe von 3,6µl Oligo dT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland und 0.4µl Random Hexamer (Promega, Madison, USA) für 10min bei 70°C im Thermocycler belassen, anschließend erfolgte das Annealing auf Eis. Nach Zugabe von 4,5µl 5-fach Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 1,5µl dNTP (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), 1µl DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) und 1µl RNAsin (RNAsin, Roche, Mannheim, Deutschland) wurden die Proben für 2min wieder im Thermocycler bei 42°C inkubiert. Die eigentliche reverse Transkription erfolgte nach Zugabe von 2µl Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für 50 min bei 42°C und 10 min bei 70°C im Thermocycler. Im letzten Schritt wurde eine cDNS Konzentration von 10 mg/µl eingestellt, basierend auf der RNS-Konzentrationsmessung vor der RT-PCR.

*Quantitative real-time PCR.* Als spezifische Primerpaare für die folgenden Chemokine und Chemokinrezeptoren wurden verwendet<sup>4,71</sup>:

CCL1-CCL5 CCL7-CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL16-22, CCL24-CCL28 CXCL1-CXCL6, CXCL8-CXCL16

CCR1-10, CXCR1-6, XCL1, XCR1, CX<sub>3</sub>CL1, CX<sub>3</sub>CR1.

Primer und Probes wurden auf Kreuzreaktivität getestet und sind kommerziell erhältlich (Applied Biosciences, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR-Reaktionen verwendeten SYBR-Green als Reporter für Reaktionen mit Chemokin/Rezeptor-spezifischen Primerkombinationen und FAM als Reporter für Reaktionen mit Chemokin/Rezeptor-spezifischen Primer/Probe-Kombinationen. Probes für die interne Positivkontrolle (ribosomale 18S-RNS oder Ubiquitin) waren mit dem VIC-Reporter assoziiert. Die Proben unterliefen folgende Stadien: Stadium 1, 50°C für 2 Minuten, Stadium 2, 95°C für 10 Minuten und Stadium 3, 95°C für 15 Sekunden, gefolgt von 60°C für 1 Minute. Stadium 3 wurde 40 Mal wiederholt. Genspezifische PCR Produkte wurden mittels eines ABI PRISMÆ 7000 Sequence Detection System (Perkin Elmer, Foster City, CA) kontinuierlich während 40 Zyklen gemessen. Die Target-Genexpression zwischen verschiedenen Proben wurde

normalisiert basierend auf den Werten der internen Positivkontrolle. Plasmid-cDNS in fünf definierten Konzentrationen wurde verwendet, um die genspezifische mRNS-Expression zu quantifizieren.

# 2.1.3 Analyse der Chemokinrezeptorexpression auf Proteinebene in

#### vitro mittels Durchflußzytometrie

Die Untersuchung der Chemokinrezeptorexpression auf Proteinebene erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Die Versuche wurden wie vorbeschrieben durchgeführt<sup>5,72</sup>. Der immunologische Nachweis erfolgte dabei entweder mit Antikörpern, an die der Fluoreszenzfarbstoff direkt gebunden ist, oder indirekt über Primär- und Sekundärantikörper. Für den Nachweis der folgenden Chemokinrezeptoren wurden direkt an Phycoerythrin (PE)-konjugierte, humane Antikörper verwendet: CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR7, CCR9 (alle von R&D Systems Inc., Minneapolis, MO, USA) sowie CCR4, CCR6, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6 (alle von BD PharMingen, San Diego, CA, USA). Indirekte Färbungen erfolgten für die Rezeptoren CCR8 und CCR10. Zur Detektion von CCR8 wurden zunächst ungelabelte anti – CCR8 Antikörper (210-762-R100, goat IgG, Alexis Biochemicals, Lausanne, Schweiz) und im nächsten Schritt PE-konjugierte Antikörper verwendet (Caltag, Burlingame, CA, USA).

CCR10 wurde mit biotingebundenen anti-CCR10 Antikörpern (clone 1908; DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA) und anschließend mit PE-konjugiertem Streptavidin gefärbt.

Für die intrazelluläre Färbung von CCR7 und CXCR5 wurde vor der oben beschriebenen Färbung das IntraStain Kit (DAKO, Glostrup, Dänemark) angewandt.

## 2.1.4 Analyse der Chemokinrezeptorexpression auf Proteinebene in

#### vivo mittels Immunhistochemie

Die Untersuchung der Chemokinrezeptorexpression auf Proteinebene in vivo erfolgte mittels Immunhistochemie in Proben aus Operationsresektaten der entsprechenden Malignome.

*Gewebeproben.* Nach ausführlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis wurden je eine Probe pro Patient aus chirurgischen Exzidaten von PEK und AZK verschiedener Erkrankungsstadien gewonnen, sowie, abhängig von der Verfügbarkeit, Proben von Lymphknotenmetastasen. Die Grösse der entnommenen Probe orientierte sich dabei an der Grösse des jeweiligen chirurgischen Exzidates, sodaß keine Beeinträchtigung der diagnostischen Beurteilbarkeit auftrat. Da es sich beim AZK um eine maligne Erkrankung mit geringer Inzidenz handelt, waren zwei operative Zentren in die Patientenrekrutierung eingebunden. Als klinischer Kooperationspartner diente die HNO-Universitätsklinik in Pittsburgh, USA. Mit Einverständnis des IRB (Institutional Review Board), Pittsburgh, USA, und der hiesigen Ethikkommission (Studien Nr.: 1945) standen 57 Proben von AZK in Form von Paraffinschnitten zur Verfügung. Für die Entität des PEK konnten 29 verschiedene Primärtumorpräparate sowie 12 "*matched pairs*" (d.h. Primärtumor und zugehörige Lymphknotenmetase) verwendet werden. Vorraussetzung für weitere Untersuchungen war die Bestätigung der histopathologischen Diagnose. Als Kontrollen dienten Gewebeproben aus gesundem Speicheldrüsengewebe und oropharyngealer Mukosa.

*Immunhistochemie.* Die Präparate wurden routinemäßig in Formalin fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet, um daraus 3 – 5µm dünne Schnitte anzufertigen, die dann mit anti–humanen Antikörpern gegen CXCR4, beziehungsweise CCR7, wie vormals von Müller *et al.* beschrieben<sup>6</sup>, gefärbt wurden.

**CXCR4-Färbung.** Hierzu wurden die Schnitte bei 70°C fixiert und ausgehend von Xylol in einer absteigenden Alkoholreihe je zwei Minuten pro Lösung bis zu Aqua dest. entparaffiniert. Nach Antigen-Demaskierung (VECTOR Antigen Unmasking Solution, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) wurden die Proben mit 0,6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Es folgten der Avidin- und Biotin-Blockierungsschritt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen CXCR4, beziehungsweise dem Isotyp, wurde in einer Konzentration von 3µg/ml durchgeführt und anschließend der biotinylierte Sekundärantikörper zugegeben. Nach der Färbereaktion mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Vectastain ABC Peroxidase Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) wurde die Färbereaktion mit dem AEC-Reagenz (VECTOR Peroxidase Substrate Kit AEC, #SK-4200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durchgeführt und mit Hämatoxyllin Gill No. 1 (Sigma, #GHS 1 -32, Sigma Aldrich, St.-Louis, MO, USA) gegengefärbt.

**CCR7-Färbung.** Hierfür wurden die Tumorschnitte in Aceton fixiert und mit  $H_2O_2$  vorbehandelt. Darauf folgten der Avidin- und Biotin-Blockierungsschritt (VECTOR Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Die Färbung wurde mit

einem monoklonalen anti-humanen Antikörper gegen CCR7 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MO, USA) beziehungsweise dem entsprechenden Isotyp (BD PharMingen, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Nach Behandlung mit dem AEC-Reagenz (DAKO AEC Kit) wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin angeschlossen.

Die histopathologische Beurteilung führten zwei unabhängige Untersucher durch, die die Immunreaktion der jeweiligen Schnitte in eine Skala von negativ bis zweifach positiv einteilten (0 = keine, + = schwache, ++ = starke immunhistochemische Reaktion).

# 2.2 *In vitro* Funktion und Regulation tumorassoziierter Chemokinrezeptoren

Nach der Charakterisierung der Chemokinrezeptorprofile von AZK und PEK wurden mögliche biologischen Funktion *in vitro* mittels Chemotaxis-Assays, Western-Blotting und Apoptose-Assays analysiert sowie Untersuchungen zur Regulation tumorassoziierter Chemokinrezeptoren durchgeführt.

#### 2.2.1 Analyse von Migration und Invasion von Tumorzellen auf

#### Chemokingradienten mittels Chemotaxis Assays

Chemokine induzieren die spezifische Rekrutierung inflammatorischer Zellen in distinkte anatomische Regionen<sup>4</sup>. Die molekulare Basis von Tumorzellmigration und Invasion hingegen ist bis heute nicht vollständig geklärt, wobei jedoch schon seit Längerem angenommen wird, daß externe Stimuli den Prozess der Zellmotilität beeinflussen<sup>73</sup>. Alterationen der Zell-Zell-Adhäsion sowie die Sekretion und Aktivierung proteolytischer Enzyme sind essentiell für die Tumorzellinvasion<sup>73</sup> und die Interaktion mit chemotaktischen Faktoren könnte einen kritischen Schritt in diesem Prozess repräsentieren. Während sicher ist, daß Chemokine das "homing" periphere Gewebe mediieren<sup>4</sup>, ist das von Leukozyten in biologische Wirkungsspektrum dieser Moleküle auf Tumorzellen bisher nicht vollständig definiert. 2001 konnten Müller et al. zeigen, dass CXCR4 und CXCL12 Chemotaxis und Invasion von Mammakarzinomzellen induzieren<sup>6</sup>, eine Beobachtung, die die potentielle Rolle von Chemokinen im Metastasierungsprozess unterstreicht.

Anknüpfend daran sollte in der vorliegenden Arbeit die chemotaktische Antwort von AZK- und PEK-Zellen des Kopf-Hals-Bereiches auf verschiedene Chemokine in Transwell-Chemotaxis-Assays untersucht werden. Dabei wurden Transwell-Inserts 60min bei Raumtemperatur mit Fibronectin (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA) 5µq/ml vorbehandelt<sup>6</sup>. Als Negativkontrolle wurde DMEM ohne jeglichen Zusatz, als Positivkontrolle DMEM mit 5% FCS in die Multiwell-Platten vorgelegt. Die übrigen Wells wurden mit DMEM und dem Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen an CXCL12 (humanes rekombinantes CXCL12, R&D Systems Inc., Minneapolis, MO, USA) vorbereitet. Anschließend wurden die mit Fibronectin vorbehandelten Transwell-Inserts in die Multiwell-Platten eingesetzt und mit der entsprechenden Tumorzellsuspension (0,5-1x10<sup>5</sup> Zellen) befüllt. Die Inkubation erfolgte über 9h (AZK) beziehungsweise 15h (PEK) im Brutschrank unter Standardbedingungen. Anschließend konnten solche Zellen, die an der Unterseite des Inserts adhärierten, angefärbt und lichtmikroskopisch guantifiziert werden. Die unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden basierend auf Beobachtungen in Vorversuchen gewählt. Alle Chemotaxisassays wurden drei Mal in Tripletts durchgeführt.

#### 2.2.2 Modulation von Chemokinrezeptoren durch Chemotherapie

Radiotherapie und Chemotherapie repräsentieren effektive und etablierte Behandlungsmethoden bei PEK des Kopf-Hals-Bereiches, die meist im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte angewandt werden<sup>74,75</sup>. Hierbei ist Cisplatin das am häufigsten verwendete Chemotherapeutikum in KHT<sup>76</sup>. Während kürzlich gezeigt wurde, daß eine erhöhte Expression von Chemokinen in Tumorzellen mit einem metastatischen Phänotyp assoziiert und durch chemotherapeutische Substanzen induzierbar ist<sup>68</sup>, ist bisher nicht bekannt, ob dieser Zusammenhang auch für die Expression von Chemokinrezeptoren auf Tumorzellen gilt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die in vitro-Behandlung mit Chemotherapeutika mit einer Veränderung des Chemokinrezeptorprofils einhergeht. Hierfür wurden die Zellen zunächst 72 Stunden einer Standardkultivierung zugeführt. Für die anschließende Inkubation wurde frisches Nährmedium - entsprechend der Zelllinie – und dem Zusatz von Cisplatin (Bristol Myers Squibb, München, Deutschland) in den Konzentrationen 1, 3 oder 9µg/ml beziehungsweise 5µg/ml des Transkriptions- und RNS-Polymerase-Inhibitors α-Amanitin (Sigma Aldrich, St.-Louis,

MO, USA) beziehungsweise einer Kombination von Cisplatin und  $\alpha$ -Amanitin verwendet.

In den anschließenden, wie oben vorbeschriebenen, durchflußzytometrischen Analysen wurde die Chemokinrezeptorexpression untersucht.

Der Antitumor-Effekt wurde mit dem 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)–2, 5– diphenyltetrazolium Bromid Test (MTT, Sigma Aldrich, St.-Louis, MO, USA) überprüft. Dabei wurde die mitochondrielle Aktivität in Zellen als Maß für die zytotoxische Wirkung verwendet. Metabolisch aktive Zellen können MTT mittels des mitochondrialen Enzyms Succinatdehydrogenase zum farbigen Formazan-Salz umsetzen. Im nächsten Schritt wurde das wasserunlösliche Formazansalz mit Isopropanol extrahiert, um die Absorbtion der Isopropanollösung bei 570nm zu quantifizieren.

#### 2.2.3 Analyse intrazellulärer Signaltransduktionswege mittels Western-

#### Blotting zum Nachweis aktivierter Signalmoleküle

Chemokine vermitteln ihre Signale über die Bindung an spezifische Chemokinrezeptoren, welche zur intrazellulären Signaltransduktion heterotrimere G-Proteine benötigen, man spricht daher von den sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR)<sup>23</sup>. Wichtige Signaltransduktionsmoleküle in der weiteren Signalkaskade sind die Proteinkinase B (PKB), auch Akt genannt, und die durch Mitogene aktivierten Proteinkinasen (MAPK), vor allem die extrazellulär Signalregulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2). Um die intrazelluläre Signaltransduktion in malignen KHT nach Chemokin-Rezeptor-Interaktion zu überprüfen, wurde mittels Western Blotting die Phosphorylierung der Proteinkinase B (AKT) und der extrazellulär-regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) untersucht. Dazu wurden AZK-Zellen mit humanem, rekombinantem CXCL12 (500ng/ml, R&D Systems Inc., Minneapolis, MO, USA) behandelt, wobei verschiedene Inkubationszeiten (5min, 15min, 30min, 60min) gewählt wurden. Nach einem kurzem Waschgang folgte die Zelllyse mit doppelt konzentriertem SDS-Page Ladepuffer [125mM Tris; 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 100mM DTT; 0,2% (w/v) Bromophenolblau (pH 6,8)]. Die gewonnenen Proteine und die visköse DNS wurden durch eine 2sec-Sonifizierung und Erhitzen (3-5min bei 95°C) denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen (15 -20µl/Geltasche) der SDS-Polyacrylamidgele eingebracht und stromkontrolliert (60mA) elektrophoretisch aufgeteilt.

Die verwendeten Puffer und SDS-Polyacrylamid Gele setzen sich im Einzelnen wie folgt zusammen:

Lösungen:

Lösung 1: 30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid

Lösung 2: 0,4% (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8mM EDTA); pH 8,8

Lösung 3: 0,4% (w/v) SDS; 1,5 M Tris (8mM EDTA); pH 6,8

Polyacrylamidgel (10% bzw. 8% Acrylamid):

Trenngel 1 (10% Acrylamid): 33,3% (v/v) Lösung 1; 25% (v/v) Lösung 2; 41,7% (v/v)

H2O; 7 x 10-3% (v/v) APS; 7 x 10-4% (v/v) N,N,N',N' Tetramethylendiamin (TEMED)

Trenngel 2 (8% Acrylamid): 26,6% (v/v) Lösung 1; 25% (v/v) Lösung 2; 48,4% (v/v) H2O; 7 x 10-3% (v/v) APS; 7 x 10-4% (v/v) TEMED

Sammelgel (4% Acrylamid): 13,4% (v/v) Lösung 1; 30% (v/v) Lösung 3; 56,6% (v/v) H2O; 7,5 x 10-3% (v/v) APS; 7 x 10-4% (v/v) TEMED

Elektrodenpuffer: 0,2 M Glycin; 0,1 M Tris; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,8

APS: 10 - 12% (w/v) Ammoniumperoxidsulfat

Die 1mm dicken Gele wurden in zwei Arbeitsschritten hergestellt: Im ersten Schritt wurde das Trenngel gegossen und während des Polymerisierens mit Isopropanol überschichtet. Nach Entfernen des Isopropanols wurde im zweiten Schritt das Sammelgel gegossen. Die Gelläufe wurden in Novex-Minigel Kammern (Novex, Frankfurt) durchgeführt, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet.

Für den spezifischen Proteinnachweis wurden polyklonale Antikörper – in der vom Hersteller vorgegebenen Verdünnung - eingesetzt. Die Antikörper (Anti-phospho-ERK1/2, Anti-total ERK1/2, anti-phospho-Akt (Ser473) und anti-total-Akt stammen von Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA).

# 2.2.4 Analyse chemokinvermittelter antiapoptotischer Signale

Neben der gezielten Rekrutierung spezifischer Zellpopulationen vermögen Chemokine auch die Apoptose zu beeinflussen<sup>77</sup>. Um die Bedeutung der Chemokin-Rezeptor Interaktion von CXCR4-CXCL12 bezogen auf die Apoptoserate von Tumorzellen zu untersuchen, wurden AZK-Zellen für 24 Stunden mit Cisplatin, bzw. einer Kombination aus Cisplatin und humanem CXCL12 behandelt und mit 5µg/ml Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, St.-Louis, MO, USA) gefärbt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die apoptotischen Zellen anhand der typischen Morphologie mit Chromatinkondensation und –fragmentierung mittels Fluoreszenz identifiziert und quantifiziert.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Tumorzelllinien von adenoid-zystischen Karzinomen und

Plattenepithelkarzinomen exprimieren distinkte

# Chemokinrezeptorprofile in vitro

Zunächst wurde untersucht, ob adenoidzystische Karzinome (AZK) und Plattenepithelkarzinome (PEK) charakteristische Chemokinrezeptorprofile aufweisen, welche mit den nahezu reziproken klinischen Metastasierungsmustern dieser beiden Tumorentitäten korrelieren.

Hierzu wurde eine umfassende quantitative real-time PCR Analyse aller bekannten Chemokinrezeptoren (CCR1-10, CXCR1-6, CX3CR1 und XCR1) an humanen Zelllinien von AZK und PEK durchgeführt (Abb.4).

## 3.1.1 Chemokinrezeptorexpression von AZK und PEK auf RNS-Ebene

Abbildung 4 zeigt die Chemokinrezeptorexpression auf mRNS Ebene in Zellinien von adenoidzystischen Karzinomen (n=2), primären Zelllinien von Primärtumoren von Plattenepithelkarzinomen (n=10) und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen (n=3) im Vergleich zu primären mukosalen Keratinozyten.

Während mukosale Keratinozyten ein äußerst begrenztes Rezeptorrepertoir exprimierten mit Hochregulation eines einzigen Chemokinrezeptors, CXCR1 (Abb.4*m*), wiesen AZK und PEK-Zellen eine Überexpression unterschiedlicher Chemokinrezeptoren auf (Abb.4).

AZK-Zellen zeigten im Gegensatz zu Zelllinien von PEK eine besonders hohe Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 (Abb.4*p*) während mRNS von verschiedenen anderen Rezeptoren nur in geringen Mengen detektiert werden konnte (Abb.4).

PEK-Zellen hingegen exprimierten ein breiteres Spektrum an Chemokinrezeptoren (Abb.4). So fand sich eine Überexpression von CXCR1 und CXCR2 (Abb.4*m*,*n*), Chemokinrezeptoren, die im Zusammenhang mit Interleukin-8 vermittelter Proliferation und Invasion von Tumorzellen beschrieben wurden<sup>78</sup>. CXCR1 und CXCR2-mRNS wurde von der Mehrzahl der PEK -Zellen ausgeprägt, während diese

Rezeptoren in AZK-Zellen nicht nachweisbar waren (Abb.4*m*,*n*). Darüber hinaus fand sich in PEK-Zellen eine konstante Hochregulierung auf mRNS-Ebene für CCR3, CCR7, CXCR3, CXCR5 und CXCR6 (Abb.4*c*, 4*g*, 4*o*, 4*q*, 4*r*). Vor allem CCR7 (Abb.4*g*) und CXCR5 (Abb.4*q*) wurden konstant von den verschiedenen PEK-Zelllinien exprimiert, während sich keine oder nur eine äußerst geringe Expression in AZK-Zelllinien fand (Abb.4*g*, 4*q*). Interessanterweise wurde für CCR3, CCR7 und CXCR5 eine Assoziation mit Metastasierung in lokoregionale Lymphknoten für andere Tumorentitäten bereits beschrieben<sup>79-82</sup>.

Eine Überexpression der Chemokinrezeptors CXCR4 ließ sich in PEK-Zelllinien im Gegensatz zu AZK-Zellen nicht nachweisen (Abb.4*p*).



Abbildung 4. PEK und AZK exprimieren spezifische Chemokinrezeptorprofile auf mRNS Ebene in vitro. Umfassende quantitative real-time RT-PCR Analyse aller bekannten Chemokinrezeptoren (CCR1-10 (a-j), CXCR1-6 (m-r) CX3CR1 (k) und XCR1 (I)) in AZK (n=2) und PEK Zelllinien, welche von verschiedenen Primärtumoren (T; n=10) oder den zugehörigen Lymphknotenmetastasen (M; n=3; 3 matched pairs) generiert wurden, im Vergleich zu primären mukosalen Keratinozyten (MK; n=1). Menge der Genexpression in fg/ 25ng Gesamt-cDNS.

# 3.1.2 Chemokinrezeptorexpression von AZK und PEK auf Protein-Ebene

Durchflußzytometrische Analysen für CXCR4 bestätigten eine hohe Oberflächenexpression dieses Chemokinrezeptors auf AZK-Zellen (25–95%) (Abb.5*a* und Tab.6), während PEK-Zellen und primäre mukosale Keratinozyten keine oder nur eine geringe (<4%) CXCR4-Proteinexpression zeigten (Abb.5*b* und Tab.6).

Für CCR7 konnte trotz der hohen Expression auf RNS-Ebene (Abb.4*g*) keine signifikante Oberflächenexpression auf PEK-Zellen detektiert werden (Abb.5*c* und Tab.6). Um zu klären, ob dieser Rezeptor in intrazellulären Pools im Zytoplasma von PEK-Zellen gespeichert wird, wurden intrazelluläre Färbungen für CCR7 durchgeführt. Hierfür wurden drei repräsentative PEK-Zelllinien ausgewählt (SCC T#1, SCC T#6 und SCC T#24), welche eine deutliche CCR7-Expression auf RNS–Ebene aufwiesen, und einer AZK-Zelllinie (ACC T#3) gegenüberstellt. Wie in Abbildung 5*d* dargestellt, fand sich für PEK-Zellen eine hohe intrazelluläre Konzentrationen an CCR7-Protein, während AZK-Zellen diesen Rezeptor nicht exprimierten (Daten nicht gezeigt). Diese intrazelluläre Expression von CCR7 konnte zusätzlich in immunzytochemischen Analysen für die Gewebeschnitte bestätigt werden (Abb.5*e*, 5*f*).

Um zu determinieren, welchen Regulationsmechanismen die Proteinexpression von CCR7 in PEK-Zellen *in vitro* unterliegen könnte, wurde der Einfluß des Mikromilieus auf die CCR7-Oberflächenexpression näher untersucht. Hierfür wurden PEK-Zellen mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren einschliesslich TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und EGF *in vitro* inkubiert und die Oberflächen-expression von CCR7 durchflußzytometrisch analysiert. Zusammenfassend führte keiner der genannten Stimuli zu einer signifikanten Hochregulierung der CCR7-Oberflächenexpression auf PEK-Zellen (Daten nicht gezeigt).

Ähnlich wie CCR7 war auch CXCR5 trotz signifikanter Expression auf RNS-Ebene (Abb.4*q*) nicht als Oberflächenprotein auf PEK-Zellen nachweisbar (Abb.5*g* und Tab.6). Allerdings zeigten intrazelluläre Färbungen dieses Rezeptors eine signifikante CXCR5-Proteinexpression im Zytoplasma von PEK-Zellen (Abb.5*h*). Darüber hinaus führte ein 24-stündiger Serumentzug zu einer Induktion der Oberflächenexpression von CXCR5 auf PEK-Zellen (15% CXCR5-positive Zellen) (Abb.5*i*).

Weitere Chemokinrezeptoren, welche auf der Oberfläche von PEK-Zellen detektiert werden konnten, waren CCR3 und CCR6, allerdings zeigte sich hier nur eine schwache Oberflächenexpression (Tab.6). Andere Rezeptoren wurden nicht konstant an der Oberfläche von PEK-Zellen, AZK-Zellen oder primären mukosalen Keratinozyten exprimiert (Tab.6). Darüber hinaus fand sich kein signifikanter Unterschied im Chemokinrezeptorprofil in PEK-Zelllinien generiert von Primärtumoren im Vergleich zu Lymphknotenmetastasen (Abb.4 und Tab.6).

	CCR1	CCR2	CCR3	CCR4	CCR5	CCR6	CCR7	CCR8	CCR9	CCR10	CXCR1	CXCR2	CXCR3	CXCR4	CXCR5	CXCR6
MK <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	2 <sup>2</sup>	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
SCC T <sup>3</sup> #1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCC T#2	-	-	2	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCC T#3	-	-	2	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCC T#4	-	-	2	-	-	4	-	-	-	-	-	3	-	2	-	-
SCC T#6	-	-	-	-	-	4	5	-	-	-	-	2	-	4	-	-
SCC T#7	-	-	2	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCC T#8	-	-	2	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-
SCC T#10	-	2	4	2	-	-	2	-	5	-	6	-	-	2	3	-
SCC M <sup>4</sup> #10	-	-	4	-	-	4	-	-	2	12	7	-	-	2	6	-
SCC T#17	-	-	2	-	-	6	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
SCC M#17	-	-	2	-	-	4	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-
SCC T#24	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCC M#24	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACC T#2	-	-	-	-	-	6	-	-	4	-	-	-	-	25	-	-
ACC T#3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	-	-

Tabelle 6. Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren in AZK und PEK

<sup>1</sup> MK, mukosale Keratinozyten - <sup>2</sup> Prozentsatz positiverZellen – <sup>3</sup>T, Zelllinie mit Primärtumor als Ursprung - <sup>4</sup>M, Zelllinie mit Lympknotenmetastase als Ursprung



Abbildung 5. Spezifische Chemokinrezeptorexpression in AZK- und PEK-Zelllinien auf Proteinebene. Durchflußzytometrische Analysen der CXCR4-Expression von AZK (T#3) (a) und PEK-Zellen (T#1) (b). Durchflußzytometrische Analysen der Oberflächen-(c) und intrazellulären (d) CCR7-Expression in PEK-Zellen (T#1). Immunzytochemische Analysen von PEK-Zellen (T#1) mit einem spezifischen CCR7-Antikörper (f), bzw. dem entsprechenden Isotyp (e). 200x Vergrößerung. Durchflußzytometrische Analysen der Oberflächen-(g) und intrazellulären CXCR5Expression (*h*) in PEK-Zellen (T#6) sowie CXCR5-Oberflächenexpression nach 24h Serumentzug (*i*). Die grau gefüllten Histogramme entsprechen der Isotypfärbung, die schwarz umrandeten Histogramme CXCR4, CCR7, bzw. CXCR5.

#### 3.2 AZK und PEK exprimieren distinkte Chemokinrezeptoren in

#### vivo

Um die *in vivo* Relevanz der Expression von CXCR4 und CCR7 zu untersuchen, erfolgten immunhistochemische Analysen an Gewebeproben von Primärtumoren AZK (n=57) sowie an primären PEK (n=29) mit den korrespondierenden Lymmphknotenmetastasen in 12 Fällen.

Während sich CXCR4 in Gewebeproben normaler Speicheldrüsen nicht nachweisen ließ (Abb.6*a*), zeigten 56 von 57 der AZK (98%) eine starke CXCR4-Expression (2-fach positiv) (Abb.6*a*) und lediglich eine AZK-Probe eine schwache Expression (1-fach positiv) (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz hierzu stellten sich 19 von 29 der primären PEK (66%) negativ für CXCR4 dar (Abb.6*b*), während interessanterweise 23 von 26 Fälle (88%) eine hoch positive Färbereaktion für CCR7 aufwiesen (Abb.6*g*, 6*h*).

Im Detail stellte sich die Verteilung von CXCR4 in PEK wie folgt dar: 9 von 29 der Tumore (31%) waren schwach positiv (Abb.6*c*) und nur eine PEK-Probe (3%) war stark positiv, die überwiegende Mehrzahl (66%) jedoch zeigte keine CXCR4-Expression (Abb.6*b*). Darüber hinaus ließ sich in zwei der CXCR4-positiven Proben eine Betonung der CXCR4-Expression im Bereich der invasiven Front des Primärtumors nachweisen (Abb.6*d*), was die Vermutung nahe legt, daß CXCR4 für die Tumorinvasion eine bedeutende Rolle spielen könnte.

Um festzustellen, ob Primärtumore ein anderes Rezeptorexpressionsmuster aufweisen als die zugehörigen Lymphknotenmetastasen wurden 12 sogenannte "matched pairs" immunhistochemisch untersucht (Abb.6e-h). CXCR4 ließ sich in 5 von 12 Primärtumoren sowie in 7 von 12 Lymphknotenmetastasen nicht nachweisen (Abb.6e-f, Tab.7). 6 von 12 Primärtumoren und 5 von 12 Lymphknotenmetastasen zeigten eine schwach positive Reaktion für CXCR4 (Daten nicht gezeigt) während sich in nur einem Primärtumor eine stark positive Färbereaktion für CXCR4 fand nicht gezeigt). Chemokinrezeptorexpression (Daten Zwischen der von Primärtumoren und zugehöriger Lymphknotenmetastase zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von CXCR4.

Im Gegensatz hierzu wurde CCR7 in allen 12 Primärtumoren und in 10 von 12 korrespondierenden Lymphknotenmetastasen exprimiert (Abb.6*g-h*, Tab.7). Dabei fand sich in 8 von 12 Primärtumoren und in 5 von 12 Lymphknotenmetastasen eine stark positive Färbereaktion für diesen Rezeptor (Abb.6*g-h*, Tab.7). In Analogie zum Expressionsmuster von CXCR4 fand sich auch für CCR7 kein Unterschied in der Expression zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen.

Zusammenfassend weist die distinkte Expression von CXCR4 in AZK und CCR7 in PEK darauf hin, daß diese Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der hämatogenen (CXCR4) bzw. lymphogenen (CCR7) Metastasierung dieser beiden Tumorentitäten spielen könnten.



Abbildung 6. CXCR4- und CCR7-Expression in Operationsresektaten von AZK und primären PEK mit zugehörigen Lymphknotenmetastasen. Repräsentative Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen für CXCR4 (*a-f*) und CCR7 (*g*, *h*). Primärtumore von AZK zeigen eine deutliche und homogene CXCR4 Expression (*a; rechte Seite*) während das gesunde Speicheldrüsengewebe keine CXCR4-Expression aufweist (*a; linke Seite*). (*b*)Variable CXCR4-Expression in Primärtumoren von PEK. Fehlende CXCR4 Proteinexpression in einem primären PEK; CXCR4 exprimierende Endothelzellen (Pfeil). (*c*) Schwache CXCR4 Expression in einem anderen primären PEK (Pfeile) und fehlende CXCR4-Expression in gesunder Mukosa (*c, links*). (*d*) Betonung der CXCR4-Expression im Bereich der invasiven Front (Pfeile) eines primären PEK (repräsentativ für 2/29 PEK). Fehlen von CXCR4 (*e, f*) bei gleichzeitig deutlicher CCR7-Expression (*g, h*) im Sinne einer Membranfärbung (*g, inset*) in einem PEK Primärtumor (*e,g*) und der zugehörigen Lymphknotenmetastase (*f,h*). Vergrößerungen: 250x (*a, b*) und 100x (*c-h*).

		Chemokinrezeptorexpression					
		0	1+	2+			
	T <sup>1</sup> (n=12)	5	6	1			
UXUR4	M <sup>2</sup> (n=12)	7	5	0			
0007	T (n=12)	0	8	4			
CCR7	M (n=12)	2	7	3			

Tabelle 7. CXCR4- und CCR7-Expression in Primärtumoren von PEK und zugehörigen Lymphknotenmetastasen

<sup>1</sup>T, Primärtumor – <sup>2</sup>M, Lymphknotenmetastase

# 3.3 CXCR4 mediiert die gerichtete Migration von Tumorzellen in

#### vitro

CXCL12, der korrespondierende Ligand von CXCR4, wird konstitutiv in hohem Maße in Lunge und Leber exprimiert, Organe welche die häufigsten Metastasenlokalisationen bei AZK repräsentieren<sup>6,12</sup> und mediiert die gerichtete Migration von Zellen *in vitro* und *in vivo*<sup>4</sup>.

Nach Identifizierung distinkter Chemokinrezeptorprofile in PEK und AZK-Zellen und dem Feststellen einer hohen CXCR4-Expression in AZK, wurde untersucht, ob CXCR4 in Tumorzellen funktionell aktiv ist.

In durchflußzytometrischen Analysen führte eine Inkubation der CXCR4-positiven AZK-Zellinie ACC T#2 mit CXCL12-Protein zu einer zeitabhängigen Internalisierung des Rezeptors mit Abnahme der Oberflächenexpression von CXCR4 (Abb.7)



Abbildung 7. Zeitabhängige Internalisierung von CXCR4 in das Zytoplasma. Durchflußzytometrische Analysen der CXCR4-Oberflächenexpression von AZK Zellen nach CXCL12 Exposition (500ng/ml) zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten.

Darüber hinaus zeigten AZK-Zellen in Chemotaxis Assays eine gerichtete Migration auf CXCL12-Gradienten in einer dosisabhängigen Art und Weise (Abb.8, p<0,05).

PEK-Zellen, welche CXCR4-negativ waren, zeigten keine chemotaktische Antwort nach CXCL12-Exposition (Abb.8).



Abbildung 8. Chemotaktische Antwort von AZK Zellen auf CXCL12. AZK-Zellen zeigen im Gegensatz zu PEK-Zellen eine chemotaktische Antwort auf einen CXCL12-Gradienten (1, 10, 100, 1000, 1500ng/ml) in dosisabhängiger Weise. Transwell-Migrationsassay von AZK-Zellen (ACC T#3, schwarze Histogramme) und PEK-Zellen (SCC T#1, gestreifte Piktogramme). Die Ergebnisse sind als durchschnittliche Anzahl der migrierten Zellen pro 5 Gesichtsfelder mit Standardabweichung dargestellt (\*p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle nach dem Student's T-Test).

## 3.4 Das antineoplastische Agens Cisplatin induziert CXCR4-

## **Expression auf Tumorzellen**

Cisplatin wirkungsvolles häufig eingesetztes stellt ein sehr und chemotherapeutisches Agens in der Behandlung von malignen KHT dar<sup>76,77,83,84</sup>. Um festzustellen, ob Cisplatin zu einer Veränderung der Chemokinrezeptorexpression auf Tumorzellen führt, wurden hoch CXCR4-exprimierende AZK-Zellen mit ansteigenden, sublethalen Dosen von Cisplatin (1, 3, und 9 µg/ml) in vitro inkubiert. Dabei entsprachen die gewählten Konzentrationen den therapeutischen Wirkkonzentrationen, die im Serum von Patienten mit malignen KHT während einer Cisplatintherapie gemessen werden können<sup>85,86</sup>. In vitro wurde der Antitumor-Effekt mittels eines MTT-Assays determiniert, welcher die mitochondriale Aktivität als Maß für die zytotoxische Wirkung eines Agens verwendet. In MTT-Assays zeigte sich bei den oben genannten Konzentrationen von Cisplatin eine Hemmung der Zellvermehrung von 24-78% (Daten nicht gezeigt).

Interessanterweise führte die Cisplatin-Exposition zu einer dosisabhängigen Induktion der CXCR4-Proteinexpression auf AZK-Zellen (Abb.9*a-b*). Nach

24stündiger Inkubationszeit mit Cisplatin vervielfachte sich die mittlere Fluoreszenz für CXCR4 um den Faktor 1,5 bis 2 (Abb.9*b*). Um die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Hochregulierung näher zu beleuchten, wurden AZK-Zellen mit einer Kombination aus Cisplatin und  $\alpha$ -Amanitin, einem Inhibitor der RNS-Polymerase-II vermittelten Transkription, behandelt. Im Falle der Koinkubation mit  $\alpha$ -Amanitin konnte die Cisplatin-vermittelte Induktion von CXCR4 um bis zu 85% reduziert werden (Abb.9*c*). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Induktion von CXCR4 durch Cisplatin eine erhöhte Gentranskription voraussetzt.



Abbildung 9. AZK-Zellen zeigen eine erhöhte CXCR4-Expression nach Behandlung mit Cisplatin (a-c) und weisen eine gesteigerte Überlebensrate bei CXCL12-Exposition auf (d, e). (a) Oberflächenexpression von CXCR4 auf unbehandelten AZK-Zellen (schwarze Linie), bzw. Cisplatin-behandelten AZK-Zellen (1µg/ml Cisplatin - gepunktete Linie, 3µg/ml - gestrichelte Linie, 9µg/ml - graue Linie). Das grau gefüllte Histogramm zeigt die Isotyp-Kontrolle. (*b*) Relative mittlere Fluoreszenz der CXCR4-Oberflächenexpression auf AZK-Zellen nach Cisplatin-Inkubation. Die Fluoreszenz ist als relative mittlere Fluoreszenz im Vergleich zu unbehandelten Zellen angegeben mit der Standardabweichung für drei unabhängige Experimente. (*c*) Durchflußzytometrische Analysen von CXCR4 bei unbehandelten AZK-Zellen (schwarze Linie), Cisplatin-behandelten Zellen (3µg/ml Cisplatin - gestrichelte Linie) oder Cisplatin (3µg/ml) und  $\alpha$ -Amanitin-behandelten (5µg/ml) AZK-Zellen (graue Linie). (*d*) CXCL12 induziert die Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 in AZK-Zellen. AZK- Zellen wurden mit CXCL12 (500ng/ml) inkubiert und Zelllysate zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Western-Blot untersucht. Als Positivkontrolle diente humanes EGF (10ng/ml) ein bekannter Aktivator von Akt und ERK1/2. Die Ergebnisse stellen repräsentative Daten aus drei unabhängigen Experimenten dar. (*e*) Prozentsatz apoptotischer AZK-Zellen, nachgewiesen mit dem Farbstoff Hoechst 33342, welche entweder unbehandelt waren oder mit Cisplatin (9µg/ml) allein bzw. einer Kombination aus Cisplatin (9µg/ml) und CXCL12 (500ng/ml) inkubiert wurden. Bei den Ergebnissen handelt es sich um die Durchschnittwerte von vier unabhängigen Experimenten unter Angabe der jeweiligen Standardabweichung (\*\*\* p < 0,001; Student's *t*-Test).

#### 3.5 CXCL12/CXCR4-Interaktion führt zur Aktivierung von "survival

## pathways" in Tumorzellen

Um zu determinieren, ob CXCL12/CXCR4-Interaktionen zu einer Aktivierung von Signaltransduktionswegen führen, welche Zellüberleben und Proliferation vermitteln, untersuchten wir die Aktivierung der Akt/Proteinkinase B (Akt/PKB) und der über extrazelluläre Signale regulierten Kinasen ERK1 und ERK2. Akt/PKB ist ein *"downstream"*-Effektor der Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K), welche antiapoptotische Signale in Zellen aktiviert<sup>87</sup>. Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) ERK1 und 2 spielen ein Rolle für die Zellproliferation, Differenzierung und das Überleben<sup>29</sup>.

Zunächst wurden AZK-Zellen in serum-freiem Medium zusammen mit 500ng/ml CXCL12-Protein inkubiert und Zelllysate zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen. Mittels Western Blot-Analyse wurde dann der Gehalt an phosphoryliertem und damit aktiviertem Akt/PKB und aktiviertem ERK1/2 bestimmt (Abb.9*d*). Wie Abbildung 9*d* verdeutlicht, werden Akt/PKB und ERK1/2 durch CXCL12-Stimulation in signifikantem Maße aktiviert. Diese Aktivierung zeigte sich für beide Kinasen nach fünf Minuten und erreichte nach 15 Minuten ein Maximum (Abb.9*d*). Während die Phosphorylierung von Akt/PKB auch nach 60 Minuten auf konstantem Niveau nachweisbar blieb, sank die Aktivierung von ERK1/2 nach 60 Minuten wieder auf das Kontrollniveau (Abb.9*d*).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass CXCL12/CXCR4-Interaktionen in AZK-Zellen zu einer Aktivierung von intrazellulleren Signalttransduktionswegen führen, welche Zellüberleben und Proliferation unterstützen und damit Tumorprogression fördern.

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von Akt/PKB und ERK1/2 durch CXCL12 tatsächlich das Überleben von Tumorzellen begünstigt, wurden AZK-Zellen mit

Cisplatin alleine oder mit einer Kombination aus Cisplatin und CXCL12 inkubiert, anschließend mit HOECHST 33342 gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen ermittelt. Dabei lag die basale Apoptose-Rate in unbehandelten AZK-Zellen durchschnittlich bei 2,5%. Cisplatin alleine induzierte bei einer Konzentration von 9µg/ml nach 24h eine signifikanten Erhöhung der Apoptose in AZK-Zellen auf 44%, während durch Koinkubation mit CXCL12 diese Steigerung der Apoptose wiederum signifikant gesenkt werden konnte(Abb.9e, p<0,001).

Diese Ergebnisse legen nahe, daß CXCL12 tatsächlich die Cisplatin-induzierte Apoptose zu hemmen vermag und damit das Überleben von AZK-Zellen begünstigen kann.

# 4 Diskussion

Die Fähigkeit zur Metastasierung stellt ein zentrales Charakteristikum des malignen Phänotyps dar<sup>39</sup>. Klinisch repräsentiert sie den wichtigsten prognostischen Faktor, welcher entscheidend die tumorbedingte Morbidität und Lethalität bei den meisten Tumorentitäten beeinflusst<sup>50</sup>. Molekularbiologisch betrachtet, ist Metastasierung das Resultat multipler, aufeinander folgender Ereignisse und stellt einen nicht-zufälligen und organspezifischen Prozess dar, welcher durch eine Vielzahl von Molekülen beeinflusst wird<sup>14</sup>. Welche molekularen Mechanismen der gerichteten Wanderung von Tumorzellen in spezifische Organe zugrunde liegen, ist bislang nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zellspezifische Merkmale untersucht, die für die Organotropie der Metastasierung von malignen KHT von Bedeutung sein könnten. Dabei wurden zwei histologische Entitäten der malignen KHT ausgewählt, welche sich aufgrund ihres nahezu reziproken Metastasierungsmusters deutlich unterscheiden: PEK und AZK<sup>50,60</sup>. Während PEK überwiegend lymphogen metastasieren<sup>50</sup>, erfolgt die Disseminierung bei AZK vor allem hämatogen<sup>60</sup>. Daher eignen sich die beiden Tumorentitäten besonders als Modell, um das Phänomen der organspezifischen Metastasierung näher zu untersuchen.

Der Metastasierungsprozess zeigt wesentliche Gemeinsamkeiten mit dem Wanderungsverhalten von Leukozyten, welches maßgeblich durch Chemokine und ihre Rezeptoren reguliert wird<sup>88</sup>. Im Jahr 2001 konnte erstmals in Studien im Mammakarzinom belegt werden, daß Chemokin/Rezeptor-Interaktionen das *"homing"* von Tumorzellen in distinkte Organe mediieren<sup>6</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß PEK und AZK distinkte Chemokinrezeptorprofile aufweisen, welche ursächlich für das differente Metastasierungsmuster dieser beiden Tumorentitäten sein könnten.

So präsentierten PEK-Zellen eine grössere Bandbreite an Chemokinrezeptoren, während AZK-Zellen überwiegend den Chemokinrezeptor CXCR4 ausprägten. Die Mehrheit der PEK-Zelllinien zeigte eine signifikante Hochregulierung der Rezeptoren CXCR1 und CXCR2. Dabei ist der Ligand, CXCL8, unter anderem ein potenter angiogenetischer Faktor<sup>23,89</sup>. Durch Interaktion mit CXCR1 und CXCR2 auf Endothelzellen reguliert CXCL8 die Proliferation und Migration von Endothelzellen und vermittelt anti-apoptotische Signale in diesen Zellen<sup>90</sup>. Darüber hinaus führt

CXCL8 zur Einwanderung immunkompetenter Zellen in inflammatorische Gewebe und beeinflusst die Leukozytenaktivierung<sup>89</sup>. In aktuellen Studien in malignen Erkrankungen wie dem malignen Melanom<sup>91</sup>, dem hepatozellulären Karzinom<sup>92</sup>, dem Bronchialkarzinom<sup>93</sup> und dem Pankreaskarzinom<sup>94</sup> konnte gezeigt werden, daß CXCL8 die Proliferation, das Überleben und die Invasion von Tumorzellen fördern sowie Angiogenese induzieren kann<sup>90,93</sup>. Für das Prostatakarzinom wurde eine positive Korrelation zwischen einer CXCR1- bzw. CXCR2-Überexpression und einem fortgeschrittenen Tumorstadium festgestellt<sup>95</sup>. Es ist anzunehmen, daß diese Chemokinrezeptoren auch beim PEK der Kopf-Hals-Region eine wichtige Rolle für die Proliferation und Invasion von Tumorzellen spielen und somit Tumorprogression fördern können. Einen autokrinen, pro-proliferativen Mechanismus für CXCL8-CXCR1/CXCR2-Interaktionen vermuteten erstmals Watanabe et al., die nachwiesen, daß PEK-Zellen CXCL8 exprimieren<sup>96</sup>. Darüber hinaus wurde in PEK-Zellen eine Überexpression des Chemokins CXCL5 gefunden, welches über Bindung an CXCR1 bzw. CXCR2 eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Invasion und Metastasierung spielen soll<sup>97</sup>.

In der vorliegenden Arbeit zeigten PEK-Zellen neben einer Überexpression von CXCR1 und CXCR2 eine Hochregulation der Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5. Im Gegensatz dazu wurden diese Rezeptoren in normalen, mukosalen Keratinozyten sowie in AZK–Zellen nicht oder nur auf geringem Niveau exprimiert. Die korrespondierenden Liganden CCL19 und CCL 21 für CCR7 bzw. CXCL13 für CXCR5 werden unter homöostatischen Bedingungen im Lymphknoten gebildet<sup>98,99</sup>. Aufgrund dieser Tatsache stellen CCR7 und CXCR5 vielversprechende Kandidaten dar, welche die Metastasierung von PEK in Lymphknoten vermitteln könnten.

Unter physiologischen Bedingungen vermitteln die Chemokine CCL19 und CCL21 bzw. CXCL13 die Wanderung von T- und B-Lymphozyten, dendritischen und weiteren immunkompetenten Zellen in lymphatische Organe<sup>99-101</sup>. Sekundäre lymphatische Organe besitzen einen komplexen Aufbau und eine charakteristische Kompartimentierung<sup>100</sup>. Bemerkenswerterweise werden diese Chemokine in unterschiedlichen Bereichen lymphatischer Gewebe exprimiert<sup>99,100</sup>. Durch diese spezifischen Chemokingradienten können unterschiedliche Zellpopulationen in distinkte Kompartimente lymphatischer Organe dirigiert werden. Dies ermöglicht die Ontogenese und die Aufrechterhaltung der Kompartimentierung der sekundären lymphatischen Organe<sup>98-100</sup>. Das komplexe Zusammenspiel zwischen der

koordinierten CXCR5- bzw. CCR7-Expression verschiedener Zellen einerseits und der distinkten Chemokinexpression in lymphatischem Gewebe andererseits bilden somit die Basis für ein funktionierendes Immunsystem.

Betrachtet man CCR7 und CXCR5 jeweils für sich, so spielt CCR7 eine wichtige Rolle für die Migration naiver Lymphozyten und reifer dendritischer Zellen in die drainierenden Lymphknoten<sup>88</sup>. So gelangen CCR7-positive T-Zellen deutlich schneller und in größerer Anzahl in afferente Lymphbahnen und zu den drainierenden Lymphknoten als CCR7-negative T-Zellen<sup>102</sup>. Auch in malignen vermittelt CCR7 wichtige Signale. In verschiedenen Prozessen soliden dem Kolonkarzinom<sup>103</sup>, dem Magenkarzinom<sup>104</sup>, wie Tumorentitäten dem Ösophaguskarzinom<sup>80</sup>, dem Melanom<sup>105</sup> und dem Mammakarzinom<sup>106</sup> konnte eine CCR7-Expression auf Tumorzellen nachgeweisen werden. Dabei fand sich interessanterweise in einigen dieser Studien eine Korrelation zwischen der CCR7-Expression und dem Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung<sup>80,103-106</sup>. Darüber hinaus korrelierte in hämatologischen Neoplasien eine CCR7-Überexpression klinisch mit einer ausgeprägten Lymphadenopathie der betroffenen Patienten<sup>81</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte CCR7-Protein in vitro lediglich intrazellulär detektiert werden. Im Gegensatz hierzu ließ sich in den immunhistochemischen Färbungen CCR7 membranständig nachweisen. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß der Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche von Faktoren abhängt, die sich eher unter in vivo-Bedingungen finden. Bei den PEK-Zellen konnte durch Serum-Entzug oder eine Behandlung mit pro-inflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren keine CCR7-Oberflächenexpression in vitro induziert werden. Demzufolge scheint die Kombination mehrerer der genannten Faktoren oder ein bislang unbekanntes Agens für die Präsentation von CCR7 an der Zelloberfläche notwendige Voraussetzung zu sein. Insgesamt zeigte die Mehrzahl der humanen PEK-Gewebeproben eine deutliche CCR7-Expression in den Primärtumoren sowie den korrespondierenden Lymphknotenmetastasen. Daher könnte CCR7 eine zentrale Rolle bei der Absiedlung von PEK-Zellen in den drainierenden Lymphknoten spielen. Eine ähnliche Schlußfolgerung zogen Tsuzuki et al., die in aktuellen Untersuchungen an oralen PEK zeigten, daß eine erhöhte CCR7-Expression mit verschiedenen klinischen Parametern der Tumorerkrankung korrelierte<sup>107</sup>. In diesem Zusammenhang die Größe Lymphknotenmetastasen, wurden der ein fortgeschrittenes Tumorstadium, eine erhöhte Rezidivhäufigkeit und Karzinom-

47

assoziierte Mortalität sowie eine insgesamt ungünstige Prognose genannt<sup>107</sup>. Wang und Mitarbeiter postulierten in einer weiteren Studie, dass PEK-Zellen während der Differenzierungs- und lymphatischen Metastasierung das Migrationsmuster dendritischer Zellen nachahmen<sup>108</sup>. Bei dendritschen Zellen findet sich der CCR6+CCR7-Phänotyp in der Haut während der CCR6-CCR7+ Phänotyp zu den lokal drainierenden Lymphknoten wandert<sup>109</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine Unterschiede in der CCR7-Expression von Primärtumoren und zugehörigen Lymphknotenmetastasen auf mRNS-Ebene oder Proteinebene detektiert werden. Zu einem ähnlichen Resultat kommen Ding et al.<sup>80</sup>, die eine vergleichbar hohe Expression von CCR7 in PEK des Ösophagus und den zugehörigen Lymphknotenmetastasen nachweisen konnten. Mittlerweile belegen zahlreiche Studien, daß die Chemokinrezeptorexpression in Primärtumoren und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen nicht signifikant unterschiedlich ist<sup>110,111</sup>. Somit scheint die Regulierung der Chemokinrezeptorexpression einen frühen Schritt in der Tumorgenese darzustellen.

CXCR5 trägt wesentlich zur gerichteten Migration von T- und B-Lymphozyten in sekundäre lymphatische Organe bei<sup>98,99</sup>. In Malignomen wurde bislang vor allem in hämatologischen Neoplasien eine erhöhte CXCR5-Expression beobachtet<sup>112-116</sup>. In diesen Zellen induziert der CXCR5-Ligand CXCL13 eine gerichtete Migration<sup>114</sup> und vermag Apoptose zu hemmen<sup>116</sup>. Darüber hinaus korrelierte die CXCR5-Expression signifikant mit der Akkumulation maligner Zellen innerhalb lymphatischer Organe<sup>115</sup>. Klinisch bestand ein deutlicher Zusammenhang zwischen der CXCR5-Expression und einer verstärkten Lymphadenopathie<sup>117</sup>.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die untersuchten PEK-Zelllinien eine hohe CXCR5-Expression sowohl auf der mRNS- als auch Proteinebene. Diese Beobachtungen untermauern das postulierte Konzept, daß Metastasierung und Leukozytenwanderung grundlegende molekulare Mechanismen teilen, und daß CXCL13/CXCR5-Interaktionen neben CCR7 eine wesentliche Rolle bei der lymphogenen Ausbreitung diese Tumorentität spielen könnten.

Der einzige Chemokinrezeptor, der auf hohem Level von AZK-Zellen, nicht jedoch von PEK-Zellen exprimiert wurde, war CXCR4. Dieser Rezeptor bindet in monogamer Weise das Chemokin CXCL12<sup>4,6</sup>. CXCL12/CXCR4-Interaktionen haben,

basierend auf ihre Fähigkeit die gerichtete Migration unterschiedlichster Zellentypen zu induzieren, elementare Bedeutung für die Embryogenese/Organogenese, die Hämatopoese und Leukozytenwanderung sowie Angiogenese<sup>23</sup>. So halten CXCL12/CXCR4 während der Organogenese eine Schlüsselposition inne, indem sie die gezielte Wanderung embryonaler Vorläuferzellen in definierte Kompartimente vermitteln<sup>41</sup>. Diese zentrale Rolle von CXCR4 in der embryonalen Entwicklung wird durch die Beobachtung unterstrichen, daß ein Gen-"knock-out" in murinen Embryonen bereits früh zu embryonaler Lethalität führt<sup>41</sup>. Auch die Entwicklung des ZNS und seine Plastizität werden durch CXCR4 und CXCL12 beeinflusst<sup>118</sup>. Darüber hinaus trägt dieses Ligand-Rezeptor-Paar entscheidend zum Aufbau und der Kompartimentierung lymphatischer Organe bei<sup>30</sup>. So dirigieren CXCL12/CXCR4-Interaktionen die gerichtete Migration von Lymphozyten und koordinieren die Reifung immunkompetenter Zellen<sup>119,120</sup>. Zusätzlich mediieren sie das "homing" unterschiedlicher Vorläuferzellen in Leber und Knochenmark<sup>4,30,119</sup>.

In der vorliegenden Arbeit führte die Aktivierung von CXCR4 auf AZK-Zellen zur gerichteten Migration, eine Beobachtung, die eine mögliche Rolle von CXCR4 im Metastasierungsprozess unterstreicht. Interessanterweise stellt CXCR4 den am häufigsten beschriebenen Chemokinrezeptor in malignen Erkrankungen dar<sup>39,121</sup>. Wie funktionelle Untersuchungen zeigen, induziert CXCR4 die gezielte Migration von Tumorzellen *in vitro*<sup>122</sup> und fördert die Entstehung von Fernmetastasen in verschiedenen murinen Modellen<sup>6,123</sup>.

Klinisch findet sich beim AZK ein überwiegend hämatogenes Metastasierungsmuster in Lunge und Leber<sup>12,124</sup>. Dabei wird der korrespondierende Ligand, CXCL12, gerade in diesen Organen auf hohem Niveau exprimiert<sup>6</sup>. Die Überexpression von CXCR4 im vorwiegend hämatogen metastasierenden AZK legt den Schluß nahe, daß CXCR4 eine Steuerungsfunktion für AZK-Zellen während der hämatogenen Disseminierung übernimmt.

Im Gegensatz zur häufigen hämatogenen Metastasierung finden sich bei dieser Tumorentität selten Lymphknotenmetastasen<sup>12,125</sup>, obwohl CXCL12 auch in lymphatischen Geweben eine hohe Expression zeigt. Trotz der Tatsache, daß einige Studien CXCR4 eine gewisse Bedeutung für den Prozess der lymphogenen Metastasierung einräumen<sup>126,127</sup>, kommt die überwiegende Zahl an Veröffentlichungen zu der Schlussfolgerung, daß CXCR4 nicht maßgeblich an der lymphogenen Streuung von Tumoren beteiligt ist<sup>128</sup>. In Lymphknoten wird CXCL12 in der Umgebung hochendothelialer Venolen exprimiert<sup>120</sup> und ist an der Rekrutierung von Memory T-Zellen über den Blutstrom nicht aber über das Lymphgefäßsystem beteiligt<sup>119</sup>. Aus diesem Grund könnte die mikroanatomische Verteilung der Expression von CXCL12 ursächlich für die seltene lymphogene Metastasierung des AZK sein.

Neben der hohen Expression von CXCR4 in AZK fand sich in der vorliegenden Arbeit auch in einigen wenigen Plattenepithelkarzinomen eine Überexpression dieses Rezeptors *in vivo*. Bemerkenswerterweise zeigte sich hier histologisch eine deutlich randbetonte Expression von CXCR4 im Bereich der invasiven Front des Primärtumors, eine Beobachtung, welche eine Rolle für CXCR4 bei der Invasion des Primärtumors für das PEK vermuten lässt. Studien beim Prostatakarzinom<sup>129</sup> und das Ovarialkarzinom<sup>130</sup> unterstützen dieses Konzept.

Die Induktion von Apoptose in Tumorzellen stellt das Hauptziel einer systemischen Chemotherapie dar. Das in malignen KHT am häufigsten verwendete Chemotherapeutikum Cisplatin<sup>76</sup> entfaltet seine zytotoxische Wirkung über eine Interkalierung der DNS<sup>62</sup>, welche wiederum über komplexe Signalwege in der Induktion von Apoptose mündet<sup>63</sup>. Es werden aber auch Signalwege aktiviert, die das Überleben von Tumorzellen begünstigen können<sup>63,131</sup>. Dabei wird das endgültige Schicksal der Zellen durch das Gleichgewicht zwischen "pro-apoptotischen" und "*pro-survival*"-Signalen bestimmt.

Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, führte eine Behandlung von AZK-Zellen mit Cisplatin in subletaler Dosierung zu einer Induktion der CXCR4-Expression auf der Zelloberfläche. Da die Hochregulierung von CXCR4 in Anwesenheit des Transskriptionsinhibitors  $\alpha$ -Amanitin deutlich gehemmt werden konnte, scheint eine veränderte Gentranskription Voraussetzung für die Induktion von CXCR4 zu sein.

Darüber hinaus ließ sich in der vorliegenden Studie durch CXCL12 eine Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege via Akt und ERK1/2 nachweisen, Proteine, welche den Zellzyklus regulieren sowie die Proliferation und das Überleben von Zellen beeinflussen<sup>28,132,133</sup>. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Ergebnissen

verschiedener anderer Studien, die zeigen konnten, dass über CXCL12/CXCR4 "pro-Proliferationssignale an unterschiedliche survival" sowie Zelltypen, wie beispielsweise CD4+T-Zellen<sup>87</sup>, embryonale neurale Zellen<sup>134</sup> und interessanterweise Mammakarzinomzellen<sup>135,136</sup>. Karzinomzellen, wie auch an Prostatakarzinomzellen<sup>77,137</sup>, Pankreaskarzinomzellen<sup>44</sup> und Glioblastomzellen<sup>77,110,138</sup> vermittelt. Neben der Tatsache, dass CXCL12/CXCR4-Interaktionen zu einer Aktivierung von Überlebenssignalen in Tumorzellen führen<sup>29,139</sup>, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß CXCL12 die durch Cisplatin induzierte Apoptoserate in AZK-Zellen senkt. Es scheint daher wahrscheinlich, daß die Suppression von Apoptose via CXCL12/CXCR4 zu einer erhöhten Tumorzellvitalität während einer Chemotherapie führt und damit zu einer erhöhten Cisplatin-Resistenz beiträgt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß die Unterschiede im Metastasierungsverhalten zweier histologisch unterschiedlicher maligner KHT, dem AZK und dem PEK, mit distinkten Chemokinrezeptorprofilen assoziiert sind. Das spezifische Rezeptorprofil des AZK ist darüber hinaus mit intrazellulären Signaltransduktionwegen verknüpft, welche das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen begünstigen.

Aktuell wird intensiv nach Chemokinrezeptorantagonisten bzw. Antikörpern gesucht, welche zur Behandlung des disseminierten Tumorstadiums eingesetzt werden können. Dabei scheint es, dass die Effektivität konventioneller Therapien einschließlich der Chemotherapie durch die Kombination mit Chemokinrezeptorneutralisierenden Therapeutika gesteigert werden kann, da hierdurch *"survival pathways"* unterdrückt und die Apoptoserate gesteigert werden kann. Diese und weitere Strategien stellen, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, vielversprechende neue Ansätze in der Behandlung metastasierter Karzinome dar.

# 5 Literaturverzeichnis

- 1. Nicolson, G. L. Cancer progression and growth: relationship of paracrine and autocrine growth mechanisms to organ preference of metastasis. *Exp Cell Res* **204**, 171-80 (1993).
- 2. Wang, J. M., Deng, X., Gong, W. & Su, S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods* **220**, 1-17 (1998).
- Yeatman, T. J. & Nicolson, G. L. Molecular basis of tumor progression: mechanisms of organ-specific tumor metastasis. *Semin Surg Oncol* 9, 256-63 (1993).
- 4. Žlotnik, A. & Yoshie, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* **12**, 121-7 (2000).
- 5. Homey, B. et al. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* **8**, 157-65 (2002).
- 6. Muller, A. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50-6 (2001).
- 7. Liotta, L. A. An attractive force in metastasis. *Nature* **410**, 24-5 (2001).
- 8. Murphy, P. M. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N Engl J Med* **345**, 833-5 (2001).
- 9. Strieter, R. M. Chemokines: not just leukocyte chemoattractants in the promotion of cancer. *Nat Immunol* **2**, 285-6 (2001).
- 10. Lim, Y. C., Koo, B. S., Lee, J. S., Lim, J. Y. & Choi, E. C. Distributions of cervical lymph node metastases in oropharyngeal carcinoma: therapeutic implications for the N0 neck. *Laryngoscope* **116**, 1148-52 (2006).
- 11. Mukherji, S. K., Armao, D. & Joshi, V. M. Cervical nodal metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck: what to expect. *Head Neck* **23**, 995-1005 (2001).
- 12. Hoffmann, T. in *Metastasis in Head and Neck Cancer* (ed. Lippert B, W. J.) 405-12 (Tectum, Marburg, 2001).
- 13. Howell, G. M. & Grandis, J. R. Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **27**, 710-7 (2005).
- 14. Bogenrieder, T. & Herlyn, M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* **22**, 6524-36 (2003).
- 15. Wong, S. Y. & Hynes, R. O. Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? *Cell Cycle* **5**, 812-7 (2006).
- 16. Chambers, A. F. et al. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am* **10**, 243-55, vii (2001).
- 17. Hsu, M. Y., Meier, F. & Herlyn, M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* **70**, 522-36 (2002).
- 18. Boccaccio, C. & Comoglio, P. M. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer* **6**, 637-45 (2006).
- 19. Egeblad, M. & Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 161-74 (2002).
- 20. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**, 453-8 (2003).
- 21. Qian, F., Hanahan, D. & Weissman, I. L. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3976-81 (2001).
- 22. Homey, B., Muller, A. & Zlotnik, A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol* **2**, 175-84 (2002).

- 23. Rossi, D. & Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-42 (2000).
- 24. Homey, B. & Zlotnik, A. Chemokines in allergy. *Curr Opin Immunol* **11**, 626-34 (1999).
- 25. Roland, J. et al. Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1mediated signaling. *Blood* **101**, 399-406 (2003).
- 26. Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**, 59-71 (2005).
- 27. Martelli, A. M. et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 911-28 (2006).
- 28. Yoon, S. & Seger, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**, 21-44 (2006).
- 29. Roux, P. P. & Blenis, J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 320-44 (2004).
- 30. Stein, J. V. & Nombela-Arrieta, C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* **116**, 1-12 (2005).
- 31. Tachibana, K. et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **393**, 591-4 (1998).
- 32. Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P. & Wang, J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol* **1**, 95-104 (2004).
- 33. Ubogu, E. E., Cossoy, M. B. & Ransohoff, R. M. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 48-55 (2006).
- 34. Middel, P., Raddatz, D., Gunawan, B., Haller, F. & Radzun, H. J. Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut* **55**, 220-7 (2006).
- 35. Koch, A. E. Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: future targets? *Arthritis Rheum* **52**, 710-21 (2005).
- 36. Homey, B. Chemokines and inflammatory skin diseases. *Adv Dermatol* **21**, 251-77 (2005).
- 37. Gombert, M. et al. CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating the recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *J Immunol* **174**, 5082-91 (2005).
- 38. Lukacs, N. W. Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* **1**, 108-16 (2001).
- 39. Zlotnik, A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol* **14**, 181-5 (2004).
- 40. Mohle, R. et al. Functional response of leukaemic blasts to stromal cellderived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* **110**, 563-72 (2000).
- 41. Burger, J. A. & Kipps, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* **107**, 1761-7 (2006).
- 42. Arai, J., Yasukawa, M., Yakushijin, Y., Miyazaki, T. & Fujita, S. Stromal cells in lymph nodes attract B-lymphoma cells via production of stromal cell-derived factor-1. *Eur J Haematol* **64**, 323-32 (2000).

- 43. Scotton, C., Milliken, D., Wilson, J., Raju, S. & Balkwill, F. Analysis of CC chemokine and chemokine receptor expression in solid ovarian tumours. *Br J Cancer* **85**, 891-7 (2001).
- 44. Koshiba, T. et al. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* **6**, 3530-5 (2000).
- 45. Koizumi, K. et al. CCL21 promotes the migration and adhesion of highly lymph node metastatic human non-small cell lung cancer Lu-99 in vitro. *Oncol Rep* **17**, 1511-6 (2007).
- 46. Shields, J. D. et al. Chemokine-mediated migration of melanoma cells towards lymphatics--a mechanism contributing to metastasis. *Oncogene* **26**, 2997-3005 (2007).
- 47. Zhao, D. et al. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human endometrial carcinoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt. *Gynecol Oncol* **103**, 932-7 (2006).
- 48. Mao, L., Hong, W. K. & Papadimitrakopoulou, V. A. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell* **5**, 311-6 (2004).
- 49. Jemal, A. et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* **55**, 10-30 (2005).
- 50. Seiwert, T. Y. & Cohen, E. E. State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer* **92**, 1341-8 (2005).
- 51. Fietkau R, L. M. in *klinische Onkologie* 13-17 (2004/2005).
- 52. Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A. & Sidransky, D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* **345**, 1890-900 (2001).
- 53. Bier, H. et al. Clinical trial with escalating doses of the antiepidermal growth factor receptor humanized monoclonal antibody EMD 72 000 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Cancer Chemother Pharmacol* **47**, 519-24 (2001).
- 54. Leon, X. et al. Metachronous second primary tumours in the aerodigestive tract in patients with early stage head and neck squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **262**, 905-9 (2005).
- 55. Liao, C. T. et al. Surgical outcome of T4a and resected T4b oral cavity cancer. *Cancer* **12**, 12 (2006).
- 56. Seifert, G. in *Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis* (ed. .Nauman, H. H., Helms, J., Herberhold, C., Kastenbauer, E) 750-766 (Thieme Verlag, Stuttgart, 1992).
- 57. Hoffmann TK, W. T., Watkins S, Snyderman C, Bier H. in *Metastasis in Head and Neck Cancer. Proceedings of the 2nd International Symposium* (ed. Lippert BM, W. J.) (Tectum, Marburg, 2001).
- 58. Simpson, J. R., Thawley, S. E. & Matsuba, H. M. Adenoid cystic salivary gland carcinoma: treatment with irradiation and surgery. *Radiology* **151**, 509-12 (1984).
- 59. Matsuba, H. M. et al. Adenoid cystic salivary gland carcinoma. A histopathologic review of treatment failure patterns. *Cancer* **57**, 519-24 (1986).
- 60. Kokemueller, H., Eckardt, A., Brachvogel, P. & Hausamen, J. E. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--a 20 years experience. *Int J Oral Maxillofac Surg* **33**, 25-31 (2004).
- 61. Mendenhall, W. M. et al. Radiotherapy alone or combined with surgery for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck* **26**, 154-62 (2004).
- 62. Goodsell, D. S. The molecular perspective: cisplatin. *Oncologist* **11**, 316-7 (2006).

- 63. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-79 (2003).
- 64. Dreilich, M. et al. Telomerase activity is not a key determinant of sensitivity to standard cytotoxic drugs in human esophageal carcinoma cell lines. *Anticancer Drugs* **17**, 503-9 (2006).
- 65. Zlatanova, J., Yaneva, J. & Leuba, S. H. Proteins that specifically recognize cisplatin-damaged DNA: a clue to anticancer activity of cisplatin. *Faseb J* **12**, 791-9 (1998).
- 66. Fung, M. K. et al. Role of MEK/ERK pathway in the MAD2-mediated cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumour cells. *Br J Cancer* **95**, 475-84 (2006).
- 67. Yang, X., Fraser, M., Moll, U. M., Basak, A. & Tsang, B. K. Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway. *Cancer Res* **66**, 3126-36 (2006).
- 68. De Larco, J. E., Wuertz, B. R., Manivel, J. C. & Furcht, L. T. Progression and enhancement of metastatic potential after exposure of tumor cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Res* **61**, 2857-61 (2001).
- 69. Ballo, H. et al. Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model. *Anticancer Res* **19**, 3827-36 (1999).
- 70. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.,. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press New York, USA* (1989).
- 71. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* **21**, 48-9 (2003).
- 72. Homey, B. et al. Cutting edge: the orphan chemokine receptor G proteincoupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol* **164**, 3465-70 (2000).
- 73. Helman, L. J. & Thiele, C. J. New insights into the causes of cancer. *Pediatr Clin North Am* **38**, 201-21 (1991).
- 74. Vokes, E. E., Weichselbaum, R. R., Lippman, S. M. & Hong, W. K. Head and neck cancer. *N Engl J Med* **328**, 184-94 (1993).
- 75. Trock, B. J., Leonessa, F. & Clarke, R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* **89**, 917-31 (1997).
- 76. Hennemann, B. [Palliative chemotherapy of head and neck cancer: present status and future development]. *Laryngorhinootologie* **85**, 172-8 (2006).
- 77. Zhou, Y., Larsen, P. H., Hao, C. & Yong, V. W. CXCR4 is a major chemokine receptor on glioma cells and mediates their survival. *J Biol Chem* **277**, 49481-7 (2002).
- Varney, M. L. et al. Expression of CXCR1 and CXCR2 receptors in malignant melanoma with different metastatic potential and their role in interleukin-8 (CXCL-8)-mediated modulation of metastatic phenotype. *Clin Exp Metastasis* 20, 723-31 (2003).
- 79. Wiley, H. E., Gonzalez, E. B., Maki, W., Wu, M. T. & Hwang, S. T. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1638-43 (2001).
- Ding, Y. et al. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 9, 3406-12 (2003).
- 81. Till, K. J., Lin, K., Zuzel, M. & 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).

- 82. Mashino, K. et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer Res* **62**, 2937-41 (2002).
- 83. de Haan, L. D. et al. Cisplatin-based chemotherapy in advanced adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck* **14**, 273-7 (1992).
- 84. Browman, G. P., Hodson, D. I., Mackenzie, R. J., Bestic, N. & Zuraw, L. Choosing a concomitant chemotherapy and radiotherapy regimen for squamous cell head and neck cancer: A systematic review of the published literature with subgroup analysis. *Head Neck* **23**, 579-89 (2001).
- 85. Alberts, D. S. & Chen, H. S. Tabular summary of pharmacokinetic parameters relevant to in vitro drug assay. *Prog Clin Biol Res* **48**, 351-9 (1980).
- 86. Schroyens, W. et al. Validation of clinical predictive value of in vitro colorimetric chemosensitivity assay in head and neck cancer. *Eur J Cancer* **26**, 834-8 (1990).
- 87. Suzuki, Y., Rahman, M. & Mitsuya, H. Diverse transcriptional response of CD4(+) T cells to stromal cell-derived factor (SDF)-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4(+) T cells. *J Immunol* **167**, 3064-73 (2001).
- 88. Kunkel, E. J. & Butcher, E. C. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* **16**, 1-4 (2002).
- 89. Remick, D. G. Interleukin-8. Crit Care Med 33, S466-7 (2005).
- 90. Li, A. et al. Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. *Angiogenesis* **8**, 63-71 (2005).
- 91. Varney, M. L., Johansson, S. L. & Singh, R. K. Distinct expression of CXCL8 and its receptors CXCR1 and CXCR2 and their association with vessel density and aggressiveness in malignant melanoma. *Am J Clin Pathol* **125**, 209-16 (2006).
- 92. Kubo, F. et al. Interleukin 8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis. *Ann Surg Oncol* **12**, 800-7 (2005).
- 93. Zhu, Y. M., Webster, S. J., Flower, D. & Woll, P. J. Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. *Br J Cancer* **91**, 1970-6 (2004).
- 94. Matsuo, Y. et al. Enhanced angiogenesis due to inflammatory cytokines from pancreatic cancer cell lines and relation to metastatic potential. *Pancreas* **28**, 344-52 (2004).
- 95. Murphy, C. et al. Nonapical and cytoplasmic expression of interleukin-8, CXCR1, and CXCR2 correlates with cell proliferation and microvessel density in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 4117-27 (2005).
- 96. Watanabe, H., Iwase, M., Ohashi, M. & Nagumo, M. Role of interleukin-8 secreted from human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* **38**, 670-9 (2002).
- 97. Miyazaki, H. et al. Down-regulation of CXCL5 inhibits squamous carcinogenesis. *Cancer Res* **66**, 4279-84 (2006).
- 98. Muller, G., Hopken, U. E. & Lipp, M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol Rev* **195**, 117-35 (2003).
- 99. Ohl, L. et al. Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of secondary lymphoid organs. *J Exp Med* **197**, 1199-204 (2003).
- 100. Drayton, D. L., Liao, S., Mounzer, R. H. & Ruddle, N. H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol* **7**, 344-53 (2006).

- 101. Hardtke, S., Ohl, L. & Forster, R. Balanced expression of CXCR5 and CCR7 on follicular T helper cells determines their transient positioning to lymph node follicles and is essential for efficient B-cell help. *Blood* **106**, 1924-31 (2005).
- 102. Bromley, S. K., Thomas, S. Y. & Luster, A. D. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol* **6**, 895-901 (2005).
- 103. Gunther, K. et al. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression f chemokine receptor CCR7. *Int J Cancer* **116**, 726-33 (2005).
- 104. Yan, C. et al. Expression of vascular endothelial growth factor C and chemokine receptor CCR7 in gastric carcinoma and their values in predicting lymph node metastasis. *World J Gastroenterol* **10**, 783-90 (2004).
- 105. Takeuchi, H. et al. CCL21 chemokine regulates chemokine receptor CCR7 bearing malignant melanoma cells. *Clin Cancer Res* **10**, 2351-8 (2004).
- 106. Cabioglu, N. et al. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 5686-93 (2005).
- 107. Tsuzuki, H. et al. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas expressing CCR7 have poor prognoses. *Auris Nasus Larynx* **33**, 37-42 (2006).
- 108. Wang, J. et al. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head and neck identifies a novel metastatic phenotype. *Cancer Res* **64**, 1861-6 (2004).
- 109. Matloubian, M., David, A., Engel, S., Ryan, J. E. & Cyster, J. G. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* **1**, 298-304 (2000).
- 110. Wang, J. et al. Diverse signaling pathways through the SDF-1/CXCR4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. *Cell Signal* **17**, 1578-92 (2005).
- 111. Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. & Golub, T. R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* **33**, 49-54 (2003).
- 112. Durig, J., Schmucker, U. & Duhrsen, U. Differential expression of chemokine receptors in B cell malignancies. *Leukemia* **15**, 752-6 (2001).
- 113. Jahnke, K. et al. Expression of the chemokine receptors CXCR4, CXCR5, and CCR7 in primary central nervous system lymphoma. *Blood* **106**, 384-5 (2005).
- 114. Trentin, L. et al. Homeostatic chemokines drive migration of malignant B cells in patients with non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **104**, 502-8 (2004).
- 115. Husson, H. et al. CXCL13 (BCA-1) is produced by follicular lymphoma cells: role in the accumulation of malignant B cells. *Br J Haematol* **119**, 492-5 (2002).
- Qiuping, Z. et al. Selectively frequent expression of CXCR5 enhances resistance to apoptosis in CD8(+)CD34(+) T cells from patients with T-celllineage acute lymphocytic leukemia. *Oncogene* 24, 573-84 (2005).
- 117. Lopez-Giral, S. et al. 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).
- 118. Klein, R. S. & Rubin, J. B. Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol* **25**, 306-14 (2004).
- Scimone, M. L. et al. CXCL12 mediates CCR7-independent homing of central memory cells, but not naive T cells, in peripheral lymph nodes. *J Exp Med* **199**, 1113-20 (2004).

- 120. Okada, T. et al. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* **196**, 65-75 (2002).
- 121. Zlotnik, A. Chemokines and cancer. Int J Cancer 2, 2 (2006).
- 122. Bajetto, A. et al. Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: Role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int* **49**, 423-32 (2006).
- 123. Kakinuma, T. & Hwang, S. T. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* **79**, 639-51 (2006).
- 124. Fordice, J., Kershaw, C., El-Naggar, A. & Goepfert, H. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: predictors of morbidity and mortality. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **125**, 149-52 (1999).
- 125. van der Wal, J. E., Becking, A. G., Snow, G. B. & van der Waal, I. Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up. *Head Neck* **24**, 779-83 (2002).
- 126. Hu, C. et al. PEG10 activation by co-stimulation of CXCR5 and CCR7 essentially contributes to resistance to apoptosis in CD19+CD34+ B cells from patients with B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia. *Cell Mol Immunol* 1, 280-94 (2004).
- 127. Su, Y. C. et al. Expression of CXCR4 is associated with axillary lymph node status in patients with early breast cancer. *Breast* **15**, 533-9 (2006).
- O'Donnell, R. K. et al. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene* 24, 1244-51 (2005).
- 129. Taichman, R. S. et al. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* **62**, 1832-7 (2002).
- 130. Scotton, C. J. et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer Res* **62**, 5930-8 (2002).
- Aoki, K., Ogawa, T., Ito, Y. & Nakashima, S. Cisplatin activates survival signals in UM-SCC-23 squamous cell carcinoma and these signal pathways are amplified in cisplatin-resistant squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 11, 375-9 (2004).
- 132. Luo, J., Manning, B. D. & Cantley, L. C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* **4**, 257-62 (2003).
- 133. Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A. & Sugimoto, C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* **22**, 8983-98 (2003).
- 134. Chalasani, S. H. et al. The chemokine stromal cell-derived factor-1 promotes the survival of embryonic retinal ganglion cells. *J Neurosci* **23**, 4601-12 (2003).
- 135. Smith, M. C. et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* **64**, 8604-12 (2004).
- 136. Luker, K. E. & Luker, G. D. Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer. *Cancer Lett* **238**, 30-41 (2006).
- 137. Chinni, S. R. et al. CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12. *Prostate* **66**, 32-48 (2006).
- 138. Barbero, S. et al. Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt. *Cancer Res* **63**, 1969-74 (2003).
- 139. Chan, T. O., Rittenhouse, S. E. & Tsichlis, P. N. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem* **68**, 965-1014 (1999).

# 6 Zusammenfassung

#### Funktionelle Relevanz von Chemokinen im Metastasierungsprozess von Kopf-Hals-Karzinomen

Maligne Kopf-Hals-Tumore sind histopathologisch und klinisch heterogen. Während sich die häufigste Entität der Plattenepithelkarzinome (PEK) durch eine lymphogene Metatstasierung auszeichnet, erfolgt die Metatstasierung adenoid-zystischer Karzinome (AZK) vornehmlich auf hämatogenem Weg. Obwohl eine Anzahl von bekannten, physiologischen Molekülen für die Stimulation von Tumorzellmotilität und -invasion von Bedeutung sind, sind die genauen molekularen Mechanismen, die die gerichtete Wanderung/Metastasierung von Tumorzellen in spezifische Organe vermitteln, weitestgehend unbekannt. Tumorzellmigration und Metastasierung zeigen deutliche Gemeinsamkeiten mit dem Wanderungsverhalten von Leukozyten. Schlüsselprozesse stellen die Adhäsion an Endothelzellen, transendotheliale Migration sowie die gerichtete Wanderung durch extrazelluläre Matrix dar. In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß Chemokine und deren Rezeptoren für die Wanderung und das organspezifische "Homing" von Leukozyten von zentraler Bedeutung sind. Chemokine sind Vertreter einer Superfamilie von kleinen, zytokinähnlichen Proteinen, die aufgrund ihrer Interaktion mit "G-protein coupled" Rezeptoren (GPCRs), die Polymerisation des Zytoskeletts, die feste Adhäsion an das Endothel sowie die gerichtete Wanderung von Leukozyten vermitteln. Diese sezernierten Proteine interagieren in einer koordinierten Art und Weise mit Zelloberflächenproteinen wie beispielsweise Intergrinen, um das spezifische "Homing" von unterschiedlichen Subtypen hämatopoietischer Zellen in definierte anatomische Kompartimente zu steuern. Um die zellulären und molekularen Mechanismen der organspezifischen Metastasierung zu untersuchen, wurden PEK- / AZK-Zelllinien und Gewebeproben verwendet, die von Patienten mit Primärtumor bzw. mit metastasiertem Tumorleiden stammten. Umfassende Analysen menschlicher Chemokinrezeptoren auf mRNA und Proteinebene zeigten, dass PEK- und AZK-Zellen ein spezifisches, nicht-zufälliges Chemokinrezeptormuster exprimieren. PEK exprimierten hauptsächlich Chemokinrezeptoren, die physiologischerweise zum Erhalt der Homöostase in Lymphknoten exprimiert werden, als wichtigste Vertreter seien hier der CC-Chemokinrezeptor (CCR) 7 und der CXC-Chemokinrezeptor (CXCR) 5 genannt. Ein Unterschied bezüglich der Chemokinrezeptorexpression ließ sich zwischen Primärtumor und entsprechender Metastase bei PEK nicht nachweisen. Im Gegensatz zu PEK exprimierten AZK den Rezeptor CXCR4, der gleichzeitig als zentraler Vermittler der hämatogenen Metastasierung gilt. In Chemotaxisassays zeigten AZK eine gradientenabhängige chemotaktische Reaktion auf CXCL12, den Liganden von CXCR4. Die Behandlung von AZK-Zellen mit Cisplatin zeigte eine Hochregulierung der CXCR4- Expression an der Zelloberfläche, diese Hochregulation wiederum konnte durch die zusätzliche Gabe von dem Transkriptionshemmstoff a-Amanitin gehemmt werden. Die Behandlung von AZK-Zellen mit CXCL12 führte zur Aktivierung von Akt und ERK1/2 Signaltransduktionswegen. Darüber hinaus supprimierte die CXCL12-Behandlung die Cisplatin-induzierte Apoptoserate in AZK-Zellen und legt nahe, dass die CXCR4 induzierte Signalkaskasde Teil eines Tumorzell-Überlebensprogramms darstellt.

Die Charakterisierung der distinkten Chemokinrezeptorprofile von PEK und AZK *in vitro* und in Tumorgewebeproben (*in vivo*) und der Nachweis ihrer funktionellen Relevanz für Migration und Überleben der malignen Zellen bilden die Grundlage, für das Verständnis des spezifischen Metastasierungsverhalten von PEK und AZK sowie für die Entwicklung neuer therapeutische Ansätze gerade in der klinisch problematischen Metastasierungssituation.

# Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. J. Schipper und Herrn Prof. Dr. med. U. Ganzer für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. med. Anja Müller-Homey, PD Dr. med. Thomas K. Hoffmann und Prof. Dr. med. B. Homey für die gemeinschaftliche Bereitstellung des Themas, ihre stets vorhandene Diskussionsbereitschaft sowie ihre engagierte Unterstützung bei der Niederschrift der Arbeit.

Besonders herzlich möchte ich den Mitarbeitern des dermatologischen Labors und der Arbeitsgruppe von Bernhard Homey für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, die wertvollen Ratschläge und das freundschaftliche Arbeitsklima danken.

Von Herzen danke ich meiner Familie, die mich begleitet und unterstützt hat.

# **CURRICULUM VITAE**

#### PERSÖNLICHE DATEN

Name	Christine Suzanne Käthe Eulert
	* am 25.10.1979 in Tübingen

Anschrift Judenbühlweg 10 97082 Würzburg

#### SCHULBILDUNG

1986 – 1990	Grundschule St. Burkard, Würzburg
1990 – 1996	St. Ursula Gymnasium, Würzburg
1996 – 1999	Matthias-Grünewald Gymnasium, Würzburg
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

#### STUDIUM

- 1999 2001 Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians Universität Würzburg Abschluss: Ärztliche Vorprüfung
   2001 2006 Studium der Humanmedizin Heinrich Heine Universität
- **2001 2006** Studium der Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Abschluss: Staatsexamen der Humanmedizin

#### **PRAKTISCHES JAHR**

- **1. Tertial** Otorhinolaryngologie, Universitätsklinik Düsseldorf
- **2. Tertial** Chirurgie, New Royal Infirmary, University of Edinburgh, Schottland
- **3. Tertial** Innere Medizin, Universitätsklinik Düsseldorf Rotation: internistische Notaufnahme und Kardiologie

## **AKTUELLE TÄTIGKEIT**

seit Januar 2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin der Medizinischen Klinik I der Universität Würzburg