

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fakultät für Medizin

**Rolle und Regulation des CX₃CL1 Chemokins in humanen
und
murinen Mamma- und Ovarialkarzinomzellen**

Jil Anne Jelsma

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Wolfgang Weber

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Holger Bronger
2. Priv-Doz. Dr. Kristina Schwamborn

Die Dissertation wurde am 12.10.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.06.2021 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet. In ewiger Dankbarkeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	<i>Maligne gynäkologische Tumore.....</i>	<i>1</i>
1.1.1	Das Mammakarzinom	1
1.1.2	Das Ovarialkarzinom.....	2
1.1.3	Aktuelle Therapieansätze	3
1.1.4	Immunologische Therapieansätze	4
1.2	<i>Die Chemokin-Familie.....</i>	<i>15</i>
1.2.1	Klassifikation und Funktion	15
1.2.2	Chemokine im Mamma- und Ovarialkarzinom.....	17
1.3	<i>Das CX₃CL1-Chemokin.....</i>	<i>19</i>
1.3.1	Struktur.....	19
1.3.2	Vorkommen und Funktion	20
1.3.3	Cleavage von CX ₃ CL1 durch ADAM-Proteasen	22
1.3.4	CX ₃ CL1 im Mamma- und Ovarialkarzinom	24
1.4	<i>Zielsetzung der Arbeit.....</i>	<i>26</i>
2	Material und Methoden.....	27
2.1	<i>Materialien</i>	<i>27</i>
2.1.1	Medien.....	27
2.1.3	Puffer und Gele	28
2.1.4	Antikörper und ELISA-Kits	31
2.1.5	Stimulantien und Enzyme	32
2.1.6	Deglykosylierungsassay	32
2.1.7	Weitere Chemikalien	32
2.1.8	Geräte	34
2.1.9	Verbrauchsmaterial	34
2.2	<i>Zelllinien und Kultivierung.....</i>	<i>36</i>
2.2.1	Verwendete Zelllinien	36
2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	36
2.2.3	Stimulationsexperimente	36
2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden.....</i>	<i>38</i>
2.3.1	Proteinbestimmung nach Lowry.....	38
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.3.3	Immunblot-Analyse.....	39
2.3.4	Deglykosylierung von Proteinen	40

2.4	<i>Immunologische Methoden</i>	41
2.4.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	41
2.4.2	Europium-Assay	41
3	Ergebnisse	45
3.1	<i>Expression von hCX₃CL1 in SKBR3-Zellen</i>	45
3.1.1	Induktion von sezerniertem hCX ₃ CL1 durch hIFN- γ und hTNF- α	45
3.1.2	Einfluss von ADAM-Inhibitoren auf die lösliche hCX ₃ CL1-Sekretion.....	46
3.1.3	Einfluss von ADAM-Inhibitoren auf die lösliche hCXCL10-Sekretion	48
3.1.4	Einfluss von ADAM-Inhibitoren auf das gesamtzelluläre hCX ₃ CL1 in SKBR3-Zellen .	50
3.1.5	Molekulargewicht von hCX ₃ CL1 und Deglykosylierungsassay	52
3.2	<i>Expression von mCX₃CL1 in 4T1-Zellen</i>	54
3.2.1	Induktion von sezerniertem mCX ₃ CL1 durch mTNF- α und mIFN- γ	54
3.2.2	Einfluss von ADAM-Inhibitoren auf die lösliche mCX ₃ CL1-Sekretion.....	55
3.2.3	Einfluss von ADAM- Inhibitoren auf die lösliche mCXCL10-Sekretion.....	57
3.3	<i>EU-Assay</i>	60
4	Diskussion	65
4.1	<i>Einfluss von TNF-α und IFN-γ auf die CX₃CL1-Expression</i>	65
4.2	<i>Wirkung der ADAM-Inhibition auf die CX₃CL1- und CXCL10-Produktion</i>	70
4.3	<i>Interpretation des Deglykosylierungsassays</i>	76
4.4	<i>Interpretation des Europium-Assays</i>	77
5	Ausblick	80
6	Zusammenfassung	81
7	Literaturverzeichnis	82
8	Abkürzungen	103
9	Danksagung	105

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Maligne gynäkologische Tumore

1.1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. 2018 verstarben rund 18.000 Frauen in Deutschland an Brustkrebs (statistisches Bundesamt). Jedes Jahr werden rund 70.000 Neuerkrankungen verzeichnet, und eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Dabei tritt die Erkrankung häufig bereits in einem Alter auf, in dem andere Neoplasien noch eine eher untergeordnete Rolle spielen: 30% der Brustkrebspatientinnen sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre (Robert Koch Institut).

Während die Inzidenz in Ländern mit hohem Bruttoinlandsprodukt (BIP) immer noch steigend ist, sinken gleichzeitig die Mortalitätsraten. In Entwicklungsländern dagegen zeigen sowohl Mortalität als auch Inzidenz eine steigende Tendenz. Eine hohe Diskrepanz zwischen den Brustkrebsraten in den unterschiedlichen Ländern veranschaulicht die Tatsache, dass die Risikofaktoren, die frühzeitige Diagnostik und die adäquaten Therapiemöglichkeiten für das Mammakarzinom unterschiedlich verteilt sind (DeSantis et al. 2015). Verschiedene Risikofaktoren wie Alter, Genetik und eine positive Familienanamnese, sowie frühe Menarche und späte Menopause sind dabei wenig beeinflussbar. Strahlenbelastung, Kinderlosigkeit, Hormonersatztherapie, der Body Mass Index-Wert, wenig Bewegung und verstärkter Alkoholkonsum dagegen können vermieden oder reduziert werden, und sind somit Risikofaktoren, die beeinflusst werden können (McTiernan et al. 2008).

Die häufigste Lokalisation des Mammakarzinoms ist der obere äußere Quadrant. Morphologisch werden mehrere histologische Typen unterschieden: das duktales Mammakarzinom ist mit 85-90% der häufigste Typ. Ursprungsort sind hier die Epithelien der Milchgänge und histologisch sind vor allem Nekrosen mit Mikrokalk charakteristisch. Der zweite Typ, das lobuläre Mammakarzinom, ist mit 10-15% deutlich seltener und geht von den Epithelien der Azini aus. Es wächst vor allem multizentrisch. Histologisch sind hier das Gänsemarsch- und das Schießscheibenmuster spezifisch. Weitere Subtypen sind das tubuläre, papilläre, muzinöse und medulläre intraduktale Karzinom (Genzwürker et al. 2014; Kiechle 2007).

Wichtig für das Staging, die Prognose und die weitere Therapie ist der immunhistochemisch bestimmte Rezeptorstatus. Darin werden die wachstumsregulierenden Hormonrezeptoren für Östrogen (ER) und Progesteron (PR) sowie der HER2/neu-Rezeptor, der zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (epidermal growth factor receptor, EGFR) gehört, zusammengefasst (Kiechle 2007). Dabei haben Karzinome mit dem sogenannten triple-negativen Status die schlechteste Prognose, sie machen 15% der Brustkrebserkrankungen aus (Dawson et al. 2009).

Klinisch manifestieren sich Mammakarzinome vor allem durch plötzlich neu aufgetretene palpable Knoten in der Brust, durch Austreten von blutiger Sekretion aus der Mamille oder durch ekzematöse Hautveränderungen. Auch geschwollene axilläre Lymphknoten können ein erster Hinweis auf ein Mammakarzinom sein.

Neben der klinischen Untersuchung spielt vor allem die Mammographie und die Sonographie eine wichtige Rolle in der Diagnostik des Mammakarzinoms, wobei die Mammographie auch als Früherkennungsmethode einen großen Stellenwert besitzt. Zeigen sich in den beiden Untersuchungen Kriterien für einen malignen Befund, muss dieser mit einer Stanzbiopsie weiter abgeklärt werden. Wird die Verdachtsdiagnose Brustkrebs histologisch bestätigt, folgen ein Röntgen-Thorax, eine Skelettszintigraphie sowie eine abdominale Sonographie, um die häufigsten Metastasierungsorte des Mammakarzinoms abzudecken: Lunge, Skelett und Leber. Je nach Befund wird das Mammakarzinom dann einem UICC-Stadium zugeteilt (Kiechle 2007).

Das Tumorstadium bestimmt anschließend, welche Therapie eingeleitet wird.

1.1.2 Das Ovarialkarzinom

Neben dem Mammakarzinom ist das Ovarialkarzinom die zweithäufigste Todesursache unter den gynäkologischen Tumoren. In Deutschland verstarben im Jahr 2018 rund 5.300 Frauen daran (statistisches Bundesamt 2018). Das Lebenszeitrisko liegt zwischen 1% und 2%, wobei die meisten Karzinome zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr diagnostiziert werden (Kiechle 2007).

Obwohl die genaue Entstehungsursache des Ovarialkarzinoms noch nicht ganz geklärt ist, wird ein Zusammenhang mit erhöhten Östrogenspiegeln vermutet (Lukanova et al. 2005). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine hohe Anzahl an Ovulationen mit einem erhöhten Risiko für Eierstockkrebs einhergeht. Demnach stellen eine frühe Menarche, eine späte Menopause, sowie eine Hormontherapie mit Östrogenen Risikofaktoren dar (Collaborative Group On Epidemiological Studies Of Ovarian, Beral et al. 2015; Trabert et al. 2012). Orale Kontrazeptiva dagegen gelten als Schutzfaktor, vermutlich weil durch sie die Anzahl der Ovulationen reduziert, und niedrige Östrogenspiegel herbeigeführt werden (Pike und Spicer 2000).

Neben dem sporadisch auftretenden Ovarialkarzinom gibt es in 10% der Fälle einen genetischen Hintergrund. Hier spielen, wie beim Mammakarzinom auch, vor allem die Risikogene BRCA1 und BRCA2 eine wichtige Rolle (Kiechle 2007).

Das Ovarialkarzinom hat eine sehr ungünstige Prognose. Nur etwa 40% leben mehr als 5 Jahre nach der Diagnose (relatives 5-Jahres-Überleben). Grund hierfür ist, dass 75% der Ovarialkarzinome erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt werden, weil sich die Tumore anfangs klinisch stumm verhalten (Robert Koch Institut). Vor allem Unterbauchschmerzen, Stuhlunregelmäßigkeiten wie Obstipation, Zunahme des Bauchumfangs durch Aszites und Tumorkachexie sind Symptome eines eher fortgeschrittenen Stadiums.

1.1.3 Aktuelle Therapieansätze

1.1.3.1 Mammakarzinom

Die heutige Therapie des Mammakarzinoms beinhaltet als lokale Primärtherapie die Entfernung des Tumors, entweder im Rahmen einer brusterhaltenden Therapie (BET) mit anschließender Bestrahlung oder einer Mastektomie, also einer Entfernung der gesamten Brust bzw. des gesamten Brustdrüsengewebes. Weiterhin ist die sogenannte Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (SLNB) heutzutage Standard. Hier wird während der Operation der Wächterlymphknoten radioaktiv markiert und entfernt, und anschließend auf Tumormetastasen untersucht. Ergibt sich ein positiver Befund, ist eine anschließende axilläre Lymphknotendisektion indiziert (Bass et al. 1999; Krag et al. 2010).

Anschließend können sich eine systemische Chemotherapie, sowie endokrine und/oder zielgerichtete Therapieansätze anschließen. Wichtig bei der Entscheidungsfindung des adäquaten Therapievorgehens sind prognostische und prädiktive Faktoren, wie beispielsweise die TNM-Klassifikation und Histopathologie mit HER2-Rezeptor und Hormonrezeptorstatus des Tumors, sowie Alter und Komorbidität der Patientin. Aber auch die Wünsche der Patientin müssen in die Entscheidungsfindung mit einbezogen werden (Gradishar et al. 2016).

Von einer adjuvanten systemischen Chemotherapie profitieren vor allem Patientinnen mit einem Triple-negativen Mammakarzinom, da hier andere Optionen wie die bereits etablierten endokrinologischen oder biologischen Therapieansätze nicht wirksam sind.

Bei hormonrezeptorpositiven Tumoren ist eine fünfjährige endokrine Therapie mit selektiven Östrogenrezeptormodulatoren wie Tamoxifen unerlässlich, da es das Risiko, in den nächsten 10 Jahren ein Rezidiv zu erleiden sowie das Risiko, in den nächsten 15 Jahren am Mammakarzinom zu versterben, um ein Drittel reduziert (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, Davies et al. 2011). Bei postmenopausalen Patientinnen ist eine Therapie mit Aromatase-Inhibitoren (AI) sinnvoll. Diese reduzieren die Konzentration von Östrogenen und verhindern somit die Stimulation von ER-positiven Brustkrebszellen (Smith et al. 2003; Dowsett et al. 2010).

HER2/neu-Rezeptorpositive Mammakarzinome zeigen eine Amplifikation oder eine Überexpression ihres Rezeptors (Slamon et al. 1989). Hier kann die Gabe des monoklonalen anti-HER2-Antikörpers Trastuzumab, zusätzlich zur systemischen Chemotherapie das Gesamtüberleben (overall survival, OS) verbessern (Perez et al. 2014).

Es gibt immer mehr Evidenz für die Heterogenität auch unter den verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms. Die Identifikation dieser molekulargenetischen Diversität erklärt unterschiedliches Therapieansprechen und fordert daher immer mehr individualisierte Therapieansätze (Perou et al. 2000). Für die Wissenschaft ist es eine Herausforderung, diesem Anspruch in den nächsten Jahren gerecht zu werden.

1.1.3.2 Ovarialkarzinom

Aktuell besteht die Therapie des Ovarialkarzinoms aus der chirurgischen Tumorentfernung und einer adjuvanten Chemotherapie. Ziel des operativen Eingriffs ist die makroskopische Tumorfreiheit, d.h. die komplette Entfernung allen sichtbaren Tumorgewebes (Verleye et al. 2009). Wimberger et al. haben gezeigt, dass die Entfernung aller makroskopisch erkennbaren Tumorherde mit einem signifikant besseren Überleben der Patientinnen einhergeht (Wimberger et al. 2007).

Die meisten Patientinnen benötigen im Anschluss der Laparotomie eine kombinierte adjuvante Chemotherapie mit platin- und taxanhaltigen Substanzen. Die Standardtherapeutika sind Carboplatin und Paclitaxel, ergänzt durch den monoklonalen anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab.

Bei Patientinnen mit einer BRCA1- oder BRCA2-Mutation konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Einsatz von Olaparib, einem oral verabreichten Inhibitor der Poly(ADP-ribose)-Polymerase-1 (PARP), als Erhaltungstherapie nach adjuvanter Chemotherapie das progressionsfreie Überleben dramatisch verbessern konnte (Moore et al. 2018). In der Rezidivtherapie haben PARP-Inhibitoren auch bei BRCA-nicht mutierten Tumoren bereits einen festen Stellenwert in der Erhaltungstherapie (Franzese et al., Cancer Treat Rev 2019). Davon abgesehen erfolgt die Rezidivtherapie üblicherweise durch weitere Chemotherapielinien.

Trotz dieser Fortschritte bleibt die Prognose beim epithelialen Ovarialkarzinom weiterhin ernüchternd. Somit stellen die Optimierung der Therapie und die Entwicklung neuer Therapiekonzepte immer noch anspruchsvolle Forderungen dar.

1.1.4 Immunologische Therapieansätze

1.1.4.1 Die Interaktion von Tumor und Immunsystem

Bereits 1863 hat Rudolf Virchow die Infiltration von Immunzellen ins Tumorgewebe beobachtet und proklamiert, dass Tumore eine Antwort des Immunsystems hervorrufen (Zou 2005). In den darauffolgenden Jahrzehnten haben die beiden Wissenschaftler Thomas und Burnet die Entwicklung von Tumoren weiter erforscht, und früh erkannt, welche maßgebende Rolle das Immunsystem bei der Unterdrückung und Bekämpfung von Tumoren spielt, und als erster den Begriff der Immunosurveillance geprägt. Das Immunsystem unterdrückt durch spezifische Mechanismen die Entwicklung von Tumoren und wacht somit über das immunologische Gleichgewicht zwischen fremd und eigen. Burnet's Theorie war, dass Tumore durch spezifische Tumorantigene eine Immunantwort hervorrufen, welche zur Elimination der Tumorzellen führt (Burnet 1957; Burnet 1967; Burnet 1970). In den weiteren Jahrzehnten wurde das Konzept der Immunosurveillance weiter etabliert. So haben Dunn et al. gezeigt, dass das Konzept der Immunosurveillance nur einen Teil der komplexen Interaktion zwischen Immunsystem und Tumorentwicklung ausmacht. Es handelt sich vielmehr um einen langwierigen Prozess bestehend aus drei Phasen: „elimination-equilibrium-escape“ (Elimination-Gleichgewicht-Entkommen) (Dunn et al. 2004) (siehe Abbildung 1).

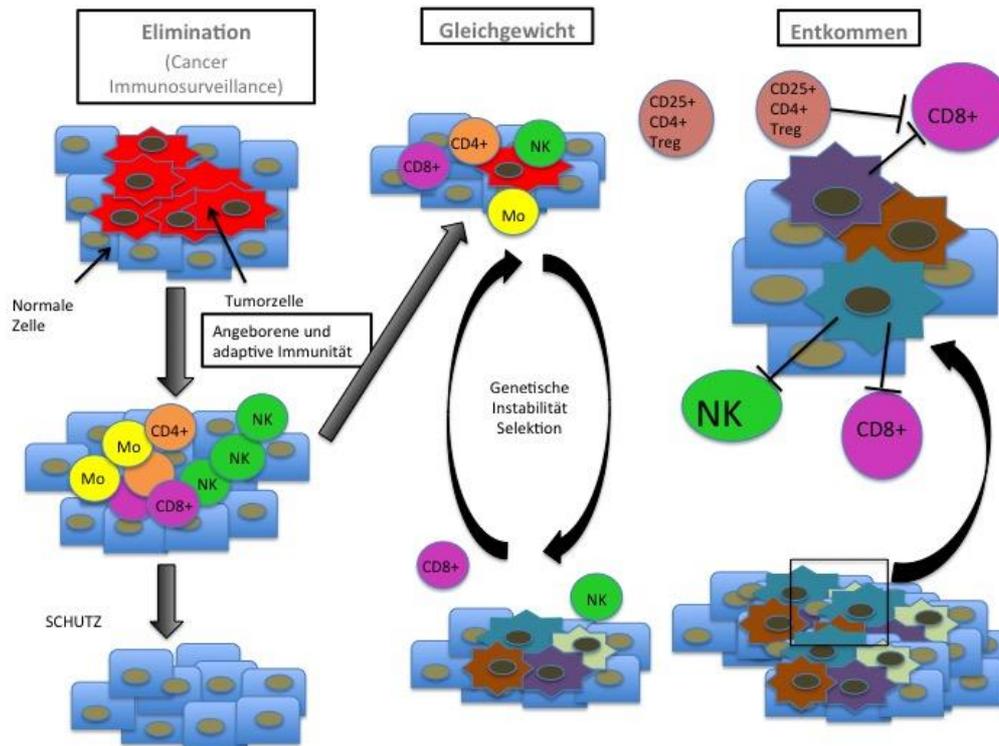


Abbildung 1: Die drei Phasen der Karzinogenese:

Während der ersten Phase (Elimination) versucht das Immunsystem die Tumorzellen zu eliminieren. Aktiviert wird es dabei durch den Zellzerfall und die dadurch freigesetzten Tumorantigene. In der zweiten Phase (Equilibrium) bildet sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Tumorzelltod und darwinistischer Selektion von immunresistenten Tumorzellen durch Mutationsmechanismen. Dies erlaubt es dem Tumor schließlich während der letzten Phase (Escape) der Immunantwort zu entgehen und klinisch apparent zu werden (modifiziert nach Dunn et al. 2004). (Abkürzungen: Mo: Monozyten, NK: natürliche Killerzellen, CD8⁺: zytotoxische T-Lymphozyten, CD4⁺: T-Helferzellen, T_{reg}: regulatorische T-Zellen)

Die erste Phase, die Elimination, entspricht der Immunosurveillance: Das Immunsystem versucht, die Tumorzellen zu eliminieren. Tumorstoffwechsel benötigt die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen (Hanahan et al. 1996). Da dies zu Anfang nicht ausreichend gewährleistet werden kann, kommt es zum Zelltod von einigen Tumorzellen. Dies führt zu einer Entzündungsreaktion und zur Aktivierung und Migration von unterschiedlichen Immunzellen, unter anderem von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen, ins Tumorgewebe (Smyth et al. 2001). Diese Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem und stellen somit die erste Kontaktstelle zum Tumor dar. Sie produzieren nun weitere Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel das proinflammatorische Zytokin Interferon- γ , was zum einen durch antiproliferative (Bromberg et al. 1996) und apoptotische (Kumar et al. 1997) Mechanismen zum weiteren Zelltod von Tumorzellen, und zum anderen zur weiteren Sekretion von bestimmten Chemokinen führt (Ikeda et al. 2002). Dabei spielen vor allem die Chemokine CXCL9,

CXCL10 und CXCL11 eine große Rolle (s.a. 1.2.2.). Diese Chemokine besitzen angiostatische Eigenschaften und hemmen somit die Bildung von neuen Gefäßen, welche für das weitere Tumorstadium unentbehrlich wären (Luster et al. 1993; Sgadari et al. 1996). Viel wichtiger allerdings ist, dass sie weitere natürliche Killerzellen und Makrophagen ins Tumorgewebe locken, welche sich wiederum gegenseitig durch die Sekretion von Interleukin-12 und Interferon- γ stimulieren und durch unterschiedliche Mechanismen, wie zum Beispiel durch Perforine oder reaktive Sauerstoffspezies, weitere Tumorzellen eliminieren (Bancroft et al. 1991; Smyth et al. 2000). Zusätzlich wandern die dendritischen Zellen in Lymphknoten um dort Immunzellen des adaptiven Immunsystems tumorspezifische Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Hierbei kommt es zur Aktivierung und Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, welche die Immunantwort noch effektiver gestalten können. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen wandern ins Tumorgewebe und lysieren dann ebenfalls Tumorzellen, was optimalerweise in der kompletten Elimination des Tumors resultiert (Shankaran et al. 2001). Nichtsdestotrotz kann es aufgrund verschiedener Mutationsmechanismen zur darwinistischen Selektion von Tumorzellen kommen, welche gegen die Immunantwort resistent sind. Dies läutet die zweite Phase ein. Hierbei kommt es zur Ausbildung eines sogenannten dynamischen Gleichgewichts zwischen der Immunantwort und Tumorzellen, welche dieser entkommen sind. Es kommt zur Immunmodulation. Nicht eliminierte Karzinomzellen versuchen durch komplexe Mechanismen, das Tumormilieu und das Immunsystem so zu beeinflussen, dass die dritte Phase ermöglicht wird: „Escape“- die Flucht des Tumors vor dem Immunsystem, was die weitere Tumorstadium begünstigt und das klinische Erscheinen des Tumors erst möglich macht (Dunn et al. 2004). Zu diesen Mechanismen, um der Immunantwort zu entgehen, gehört zum Beispiel die Aktivierung und Expansion von regulatorischen T-Zellen (Treg) (Zou 2005). Im Normalfall haben Treg die Aufgabe, Gewebe vor einer zu starken Immunantwort zu schützen und Autoimmunprozessen entgegen zu wirken. Sie sind klassischerweise CD4⁺, CD25⁺ und FOXP3⁺. Durch die Expression spezifischer Rezeptoren, wie zum Beispiel CTLA-4, welche an Rezeptoren auf der Oberfläche von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen oder dendritischen Zellen binden, kommt es zu deren Inaktivierung, zur verminderten Präsentation von Antigenen und somit zu einer Abschwächung der Immunantwort (von Boehmer 2005). Tumore profitieren von dieser immunsuppressiven Eigenschaft der Treg, indem sie Treg durch verschiedene Entzündungsmediatoren ins Tumorgewebe locken und stimulieren (DeNardo et al. 2007). Des Weiteren machen sich Tumorzellen die Plastizität der chronischen Entzündungsreaktion im Tumorgewebe zu Nutzen (Balkwill et al. 2005). So spielen vor allem Makrophagen eine besondere Rolle in der chronischen Entzündungsreaktion. Dabei differenzieren sich naive Makrophagen entweder in sog. M1- oder in M2-Makrophagen. Während M1- Makrophagen durch mikrobiologische Produkte aktiviert werden und Mikroorganismen durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies töten, besitzen M2-Makrophagen eher eine immunmodulierende Funktion, indem sie die Zellproliferation durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren beeinflussen und die Angiogenese begünstigen. So kommt es nach der Migration der Monozyten ins Tumorgewebe je nach Stimulus zu einer unterschiedlichen Differenzierung der Makrophagen, welche dann eine Tumorstadium

entweder begünstigen oder hemmen (Mantovani et al. 2002). Das Zytokinprofil im Tumormikromilieu ist dabei maßgeblich verantwortlich für die Aktivität dieser tumorassoziierten Makrophagen (TAM) im Tumorgewebe. Verschiedene Zytokine wie $\text{IFN-}\gamma$ und Wachstumsfaktoren wie GM-CSF fördern ihre zytotoxische Aktivität und tragen zu einer effektiven Immunantwort gegen den Tumor bei (Pollard 2004). Tumorzellen dagegen versuchen durch die Sekretion verschiedener Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel dem Chemokin CCL2, Makrophagen anzulocken und die Differenzierung naiver Makrophagen in Richtung M2-Makrophagen zu lenken (Mantovani et al. 2004). Diese TAM tragen durch die Sekretion von bestimmten Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel $\text{TNF-}\alpha$, von Wachstumsfaktoren wie VEGF und extrazelluläre matrixdegradierenden Metalloproteasen wie MMP9, wesentlich zur Tumorprogression und-invasion, zur Angiogenese und zur Metastasierung bei (Coussens et al. 2002) (s. Abbildung 2).

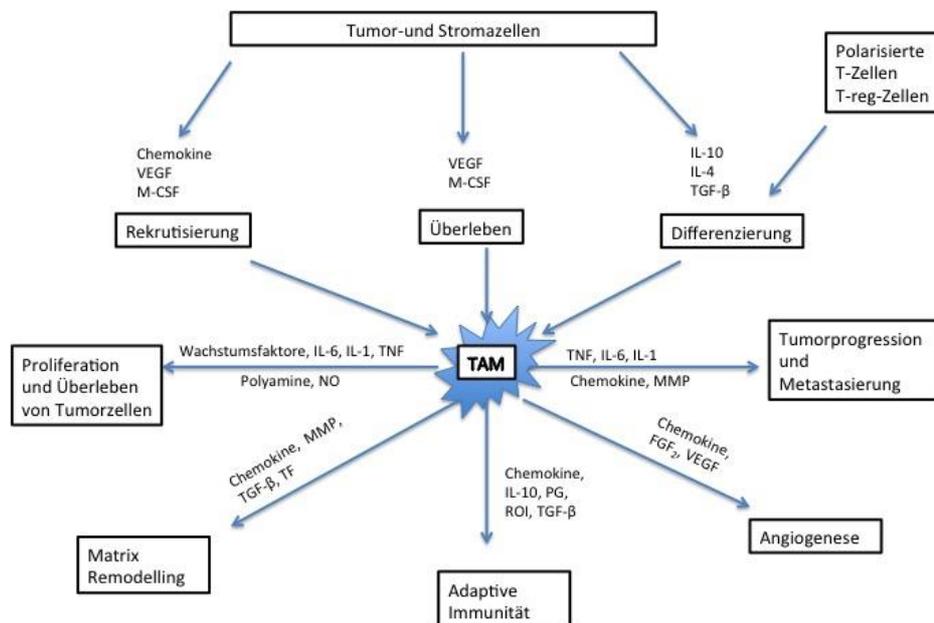


Abbildung 2: Rolle der TAM bei der Tumorprogression:

Tumor- und Stromazellen locken durch verschiedene Chemokine und Zytokine TAM ins Tumorgewebe und stimulieren deren Differenzierung zu M2-Makrophagen. Diese TAM begünstigen anschließend durch die Sekretion von weiteren Entzündungsmediatoren (unter anderem $\text{TNF-}\alpha$, verschiedene Interleukine, VEGF und MMP) die Tumorzellproliferation, -invasion, Metastasierung und Angiogenese (modifiziert nach Balkwill et al. 2005). (Abkürzungen: VEGF: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, MMP: Matrix Metalloprotease, IL: Interleukine, M-CSF: Monozytenkolonien-stimulierender Faktor, TGF- β : transformierender Wachstumsfaktor, NO: Stickstoffmonoxid, FGF: Fibroblasten-Wachstumsfaktor)

Des Weiteren besitzen, wie bereits oben kurz angedeutet, CD4⁺-T-Lymphozyten ebenfalls einen Stellenwert in der Gestaltung der Immunantwort während der Karzinogenese. Je nach Stimulation durch unterschiedliche Zytokine differenzieren sich CD4⁺ T-Zellen entweder in sog. Th1- oder Th2-Helferzellen (Moss et al. 2004). Th1-Helferzellen sekretieren nach ihrer Aktivierung vor allem Zytokine wie Interferon- γ , TNF- α und Interleukin-2, aktivieren dadurch CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und verstärken die zytotoxische Aktivität von M1-Makrophagen (Munk et al. 1995; Romagnani 1997). Dies resultiert in einer erhöhten antitumoralen Antwort und einer Hemmung der Tumorprogression. Eine Differenzierung in Th2-Helferzellen dagegen führt zur Sekretion von anderen Interleukinen wie zum Beispiel IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Diese Interleukine hemmen die T-Zell-Aktivierung, begünstigen die Differenzierung von M2-Makrophagen bei gleichzeitiger Hemmung von M1-Makrophagen, führen damit zu einer Runterregulierung des Immunsystems sowie zur Tumorprogression, und erlauben es somit dem Tumor, der Immunantwort zu entgehen (Parker 1993; Mantovani et al. 2002). Tumorzellen und tumorassoziierte Leukozyten sezernieren aus diesem Grund vor allem Chemokine, welche Th2-Helferzellen anlocken (Balkwill et al. 2001). Zusammenfassend kann man sagen, dass Th1-Helferzellen einer Tumorprogression entgegenwirken, während Th2-Helferzellen diese eher fördern (Lowes et al. 1997; Kobayashi et al. 1998).

1.1.4.2 Einfluss des Immunmilieus auf die Prognose im Mamma- und Ovarialkarzinom

In den letzten 15 Jahren sind zahlreiche Arbeiten erschienen, die durch prognostische Korrelationen Hinweise darauf gegeben haben, dass das Mamma- und Ovarialkarzinome immunogene Tumoren sind. So haben Zhang et al. 2003 herausgefunden, dass es eine Assoziation zwischen der intraepithelialen T-Zell Infiltration (tumorinfiltrierende Lymphozyten = TIL) ins Tumorgewebe beim Ovarialkarzinom und dem Überleben der Patientinnen gibt (Zhang et al. 2003). Clarke et al. sowie Adams et al. haben diese These 2009 bestätigt und gezeigt, dass diese vor allem beim serösen Ovarialkarzinom gültig ist und sich auf das krankheitsspezifische Überleben positiv auswirkt (Clarke et al. 2009; Adams et al. 2009).

Ähnlich wie beim Ovarialkarzinom haben Aaltomaa et al. bereits 1992 die tumorinfiltrierende T-Zell Population im Mammakarzinom analysiert und herausgefunden, dass eine hohe Anzahl an TIL in schnell proliferierenden Brusttumoren einen guten prognostischen Indikator darstellt, und mit negativem Lymphknotenstatus, geringer Tumorgröße und rezidivfreiem Überleben korreliert. Zahlreiche andere Arbeitsgruppen haben dies in den weiteren Jahren bestätigen können (Aaltomaa et al. 1992; Denkert et al. 2010; Denkert et al. 2015). Adams et al. konnten zeigen, dass eine hohe T-Zell-Population bei TNBC mit einer besseren Prognose einhergeht und zu einer Risikoreduktion für ein Tumorrezidiv führt (Adams et al. 2014). Des Weiteren scheint eine hohe Anzahl an TIL im Tumorgewebe in einem besseren Therapieansprechen zu resultieren. Zum Beispiel sprechen HER2⁺ Mammakarzinome mit einer hohen Anzahl an TIL besser auf eine adjuvante Trastuzumabtherapie an (Loi et al. 2014).

Auf der anderen Seite ist eine hohe Anzahl an regulatorischen T-Zellen (Treg) im Tumorgewebe sowohl beim Ovarial- als auch beim Mammakarzinom eher mit einem reduzierten Überleben assoziiert, da diese eine effektive Immunantwort gegen den Tumor unterbinden können, indem sie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, Natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen hemmen (Chen 2006; Trzonkowski et al. 2004). Angelockt werden Treg beispielsweise durch das Chemokin CCL22, was vor allem von tumorspezifischen Makrophagen produziert wird. Eine Blockade dieser Treg wäre somit ein möglicher Ansatz in der immunologischen Therapie des Mamma- und Ovarialkarzinoms (Curiel et al. 2004). Bates et al. haben gleichermaßen beim Mammakarzinom gezeigt, dass eine hohe Anzahl an FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen im Tumorgewebe mit einem erhöhten Rezidivrisiko und einem verminderten Gesamtüberleben korreliert (Bates et al. 2006).

Zusätzlich scheint ein hoher Prozentsatz an chronisch aktivierten B-Lymphozyten im Sentinel- und in axillären Lymphknoten beim Mammakarzinom mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium zu korrelieren (Wernicke 1975).

Während Orre et al. keine Korrelation zwischen Prognose und der Anzahl an TAM im Ovarialkarzinom gefunden haben (Orre et al. 1999), konnten zahlreiche andere Arbeitsgruppen zeigen, dass eine hohe Konzentration an TAM die Prognose vom Mammakarzinom wesentlich verschlechtert (Leek et al. 1996). Gründe hierfür wurden bereits weiter oben erläutert.

Zusammenfassend kann man sagen, dass dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen, M1-Makrophagen, Th1-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen das Tumorwachstum hemmen, während Th2-Helferzellen, chronisch aktivierte B-Lymphozyten, regulatorische T-Zellen und M2-Makrophagen die Tumorprogression eher fördern (Emens 2012). Somit sind sowohl das Mamma- als auch das Ovarialkarzinom immunogene Tumore, und die weitere Erforschung der genauen Abläufe der Immunantwort im Rahmen der Karzinogenese kann wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung neuer Therapieansätze hervorbringen (DeNardo et al. 2007).

1.1.4.3 Immunologische Therapieansätze beim Mamma- und Ovarialkarzinom

Unter 1.1.4.1 und 1.1.4.2 wurde die Rolle des Immunsystems in der Entwicklung des Mamma- und Ovarialkarzinoms erläutert. Die Entwicklung von immunologischen Therapieansätzen in der Onkologie hat in den letzten Jahren die Krebstherapie revolutioniert, wie beispielsweise beim malignen Melanom (Rosenberg et al. 2009; Schmid et al. 2018; Gerlach et al. 2013).

Obwohl das Mamma- und Ovarialkarzinom nur mäßig immunogene Tumoren zu sein scheinen, haben neue Studien gezeigt, dass auch in diesen Tumoren das Immunsystem ein Therapieansprechen beeinflussen und auf das Gesamtüberleben wirken kann (Savas et al. 2016).

Neue Impfstrategien

In der Tumorthherapie können Impfungen mit bestimmten Tumorantigenen dem Immunsystem helfen, Tumorzellen schneller zu detektieren und zu eliminieren. Durch eine Impfung kommt es zu einer Stimulierung der antigenpräsentierenden Zellen und somit zur vermehrten Präsentation von Tumorantigenen, was in der Aktivierung und Vermehrung von tumorspezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen resultiert. Zusätzlich könnte eine Impfung als Tumorthherapie weitaus effektiver als die herkömmliche Chemo- oder Radiotherapie sein, da sie zur Entstehung eines immunologischen Tumorgedächtnisses führt, welches wiederkehrende Tumorzellen erneut erkennen und eliminieren kann (Krishnan et al. 2017). Es gibt unterschiedliche Impfvariationen: mit Proteinen oder Peptiden, DNA-basiert, mit Hilfe von Bakterien oder Viren als Vektoren, oder zellbasiert, beispielsweise mit Tumorzelllysaten oder dendritischen Zellen (Emens 2012).

Mögliche Tumorantigene wären beispielsweise das Mucin MUC1, ein transmembranöses Glykoprotein, was während der Tumorprogression abnorm glykosyliert ist und in über 90% der Mamma- und Ovarialkarzinome vorkommt, oder das Carcinoembryonale Antigen (CEA), ein Immunglobulin, was normalerweise in der Schleimhaut des Kolons vorkommt, und in beiden Tumoren überexprimiert wird. Auch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) kann als potentielles Tumorantigen fungieren, da es in 20-30% der Mamma- und Ovarialkarzinome vorkommt (Antonilli et al. 2016). So haben Gulley et al. eine Immunantwort bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom nach einer Impfung mit MUC-1 und/oder CEA zusammen mit T-Zell-stimulierenden Molekülen hervorrufen können (Gulley et al. 2008). Auch beim Mammakarzinom führte eine Impfung bestehend aus MUC-1 Epitopen zur Bildung von MUC-1 spezifischen Antikörpern (Gilewski et al. 2000).

Ein anderer Ansatz in der Immuntherapie ist die Impfung mit sogenannten "Gesamtumorantigenen": hierbei wird versucht, eine Immunantwort nicht gegen ein spezifisches Tumorantigen auszulösen, sondern gegen den Tumor im Ganzen (Kandalaft et al. 2011). In der Tat ist die Impfung mit einzelnen Tumorantigenen limitiert, da der Tumor durch eine Mutation die Expression des geimpften Tumorantigens runterregulieren und dadurch der Immunantwort entgehen kann (Krishnan et al. 2017). Durch ihre Fusion mit Tumorzelllysaten kommen dendritische Zellen mit dem gesamten Antigenrepertoire der Tumorzellen in Kontakt und können diese Antigene nun CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf ihrer Oberfläche präsentieren und somit zu einer zytotoxischen T-Zell-Antwort gegen den Tumor führen (Gong et al. 2000). Chiang et al. konnten zeigen, dass eine Impfung mit dendritischen Zellen, welche vorher mit Tumorzelllysaten fusioniert wurden, zu einem verlängerten PFS bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom geführt hat (Chiang et al. 2013).

Eine weitere Möglichkeit, die Effizienz von „Gesamt-Tumor-Impfungen“ zu erhöhen, ist in die Gestaltung der Immunantwort einzugreifen, die sogenannte Immunmodulation. Durch verschiedene Methoden wird die Aktivität des Immunsystems in Richtung Tumorbekämpfung und Impferfolg gelenkt und protumorale Faktoren unterdrückt (Kandalaft et al. 2011). Eine Depletion der regulatorischen T-Zellen, welche eine Immunantwort gegen den Tumor abschwächen würde, ist ein Beispiel für eine

Immunmodulation und kann mit der oralen Gabe von Cyclophosphamid erreicht werden (Ghiringhelli et al. 2007).

Adoptiver T-Zelltransfer

Voraussetzung für den Erfolg der Immuntherapie ist eine hohe Anzahl aktivierter T-Lymphozyten, welche leicht zum Karzinom vordringen und dort ihre zytotoxische Funktion ausüben können. Dies kann durch einen sogenannten adoptiven Transfer von ex vivo expandierten T-Zellen herbeigeführt werden. Hierbei werden spezifische tumorinfiltrierende T-Lymphozyten aus dem Tumor isoliert, expandiert und schließlich zurückinfundiert (Kandalaft et al. 2011).

CAR-T-Zell-Therapie

Die CAR-T-Zelltherapie ist sozusagen die Weiterentwicklung des adoptiven T-Zelltransfers. CAR-T steht hierbei für „chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen“ und vereint die Merkmale aller drei innovativen Therapieformen – die der Immun-, Zell- und Gentherapie. Bei CARs handelt es sich um künstlich hergestellte, genetisch veränderte T-Zell-Rezeptoren, welche es den T-Zellen erlauben, tumorassoziierte Antigene zu erfassen und somit eine gezieltere und verbesserte Immunantwort zu ermöglichen. Sie verbinden dabei die Tumorantigenspezifität mit der zytotoxischen Lyse durch T-Zellen. Wichtig ist dabei ein tumorspezifisches Antigen für den jeweiligen Tumor zu identifizieren (Sadelain et al. 2003). Für das Ovarialkarzinom gibt es nun eine Phase I Studie, in der für die CAR-T-Zelltherapie die extrazelluläre Domäne MUC16 als tumorspezifisches Antigen identifiziert wurde, da sie in der Mehrheit der Ovarialkarzinome exprimiert wird (Koneru et al. 2015). In der Tat hat dies bereits im Mausmodell zu einer Verzögerung der Progression und teilweise sogar zu einer kompletten Regression des Tumors geführt (Chekmasova et al. 2010; Koneru et al. 2015).

Antikörpertherapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren

Die Entdeckung von sogenannten Immun-Checkpoints hat zusehends zum weiteren Verständnis der Rolle des Immunsystems bei der Tumorbekämpfung beigetragen. Bei diesen Immun-Checkpoints handelt es sich um Rezeptoren auf der Membran von T-Lymphozyten, die deren Aktivität und somit ihre Immunantwort beeinflussen. Die Bindung eines dazugehörigen Liganden an diese Rezeptoren führt zum Auslösen einer Kaskade von entweder kostimulatorischen oder aber inhibitorischen Signalen. Letztendlich wird damit die Aktivität der T-Zellen, und somit die Immunantwort an sich, entweder gehemmt oder stimuliert (Greenwald et al. 2005). Diese Immun-Checkpoints sind essentiell für ein immunologisches Gleichgewicht zwischen Selbsttoleranz- und Immunabwehr (Pardoll 2012). Beispiele von solchen Immun-Checkpoints sind der CTLA-4 Rezeptor und der PD-1-Rezeptor (s. Abbildung 3). CTLA-4 ist ein inhibitorischer Rezeptor, dessen Bildung auf der Oberfläche von T-Zellen nach deren Aktivierung induziert wird. Seine Aktivierung resultiert in einem Zellzyklusarrest und einem Beenden der T-Zell-Aktivierung (Thompson et al. 1997). Die Blockade dieses Rezeptors durch einen Antikörper führt also zu einer Aktivierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (Hurwitz et al. 1998). Die Gabe von Anti-CTLA-4 ist bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom noch sehr experimentell. Nichtsdestotrotz

haben Hodi et al. gezeigt, dass bei einigen ihrer Patientinnen nach mehreren Gaben von Anti-CTLA-4 die Krankheit über 4 Jahre kontrolliert werden konnte (Hodi et al. 2008).

In der Therapie des Mammakarzinoms haben einige klinische Studien mit dem CTLA-4-Antikörper Tremelimumab (Vonderheide et al. 2010) oder Ipilimumab (McArthur et al. 2016) erste Erfolge verzeichnet.

Ein anderes Beispiel ist die PD-1/PD-L1 Blockade: Mamma- und Ovarialkarzinomzellen besitzen an ihrer Oberfläche den sogenannten „programmed-death-ligand 1“ (PD-L1). PD-L1 ist ein Ligand für den immunsupprimierenden T-Zell Rezeptor programmed-death 1 (PD1), und durch eine Bindung dieses Liganden an den Rezeptor kann eine Immunantwort blockiert werden (Okazaki et al. 2006). Hamanishi et al. haben gezeigt, dass eine hohe Expression dieses PD-L1 in Ovarialkarzinomzellen mit einer geringen Anzahl an tumorinfiltrierender Lymphozyten einhergeht und in einem verminderten Gesamtüberleben resultiert (Hamanishi et al. 2007). Das Gleiche haben Muenst et al. für das Mammakarzinom herausgefunden (Muenst et al. 2014). PD-L1 könnte somit in Zukunft als Biomarker für die Immunität von Mamma- und Ovarialkarzinomen fungieren (Cimino-Mathews et al. 2016; Hirano et al. 2005). Seit 2019 ist in Europa ein PD-L1 Inhibitor für die Therapie des metastasierten triple-negativen Mammakarzinoms in Kombination mit einer Chemotherapie zugelassen: die Kombination aus dem PD-L1-Inhibitor Atezolizumab mit Nab-Paclitaxel erzielt ein signifikant verbessertes progressionsfreies Überleben und verbessertes Gesamtüberleben als die alleine Chemotherapie. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichende PD-L1-Expression auf tumorinfiltrierenden Immunzellen ≥ 1 % in der Immunhistochemie (Emens et al. 2019; Schmid et al. 2018).

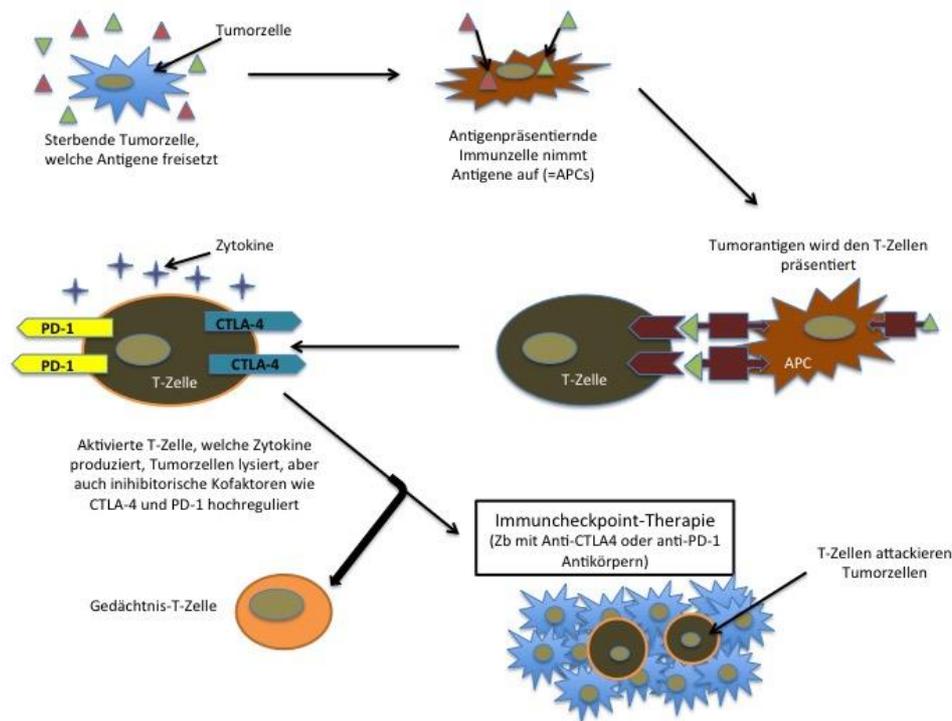


Abbildung 3: Immuncheckpoints als neuer Therapieansatz im Mamma- und Ovarialkarzinom:

Durch Zelltod werden Tumorantigene freigesetzt. Diese werden von antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und T-Zellen präsentiert. Dadurch werden diese aktiviert, es kommt zur Sekretion von Zytokinen und Interleukinen, gleichzeitig kann es zur Hochregulierung von bestimmten inhibitorischen Rezeptoren wie zum Beispiel PD-1 und CTLA-4 kommen. Durch die Bindung des dazugehörigen Liganden wird die Aktivität der T-Zellen runterreguliert. Eine Blockade dieser Immuncheckpoints mit einem spezifischen Antikörper kann daher zu einer verstärkten Immunantwort gegen Tumorzellen führen (modifiziert nach Sharma und Allison 2015).

In Zukunft wird die Kombination von unterschiedlichen Immuntherapien mit einer Chemotherapie die Tumorthherapie maßgeblich gestalten (Emens 2017). Im experimentellen Mausmodell wurde bereits gezeigt, dass die Verabreichung von Trastuzumab-ähnlichen Antikörpern zusammen mit PD-1 Antikörpern zu einer sichtlichen Regression von HER2⁺ Tumoren in Mäusen führt (Stagg et al. 2011). In ersten Studien konnte nun auch bei Patientinnen mit metastasiertem triple-negativen Mammakarzinom durch eine Kombinationstherapie aus PD-L1-Antikörper und Nab-Paclitaxel ein verlängertes PFS erzielt werden (Schmid et al. 2018).

Die neuesten Studien überprüfen nun eine Kombination aus beiden Immuncheckpoint-Inhibitoren und versprechen sich dadurch ein noch besseres Ansprechen. So haben Duraiswamy et al. im Mausmodell gezeigt, dass im Ovarialkarzinom die doppelte Blockade von PD-1/PD-L1 und CTLA-4 zu einer erhöhten Infiltration von TIL ins Tumorgewebe führt, die antigenspezifische Zytokinproduktion aktiviert, Treg-Zellen supprimiert und letzten Endes das Tumorwachstum hemmt (Duraiswamy et al. 2013). Und darüber hinaus hat beim Mammakarzinom die Kombination von Trastuzumab,

Chemotherapie und CTLA-4- und PD-1- Antikörpern, verglichen mit einer alleinigen Chemo- oder Immuntherapie, in Mäusen zu einem verlängerten Überleben geführt (Muller et al. 2015).

Sowohl für das Mamma- als auch das Ovarialkarzinom wird die personalisierte Immuntherapie, eventuell kombiniert mit Chemotherapie, mögliche neue Therapieoptionen der Zukunft darstellen. Spezifische Immun-Checkpoint-Inhibitoren, unterschiedliche Impfstrategien mit tumorspezifischen Antigenen oder sogenannten Gesamttumorantigenen, und der adoptive T-Zell-Transfer sind dabei nur einige Beispiele für die Gestaltung einer zukünftigen Immuntherapie (Kandalaft et al. 2011; Emens 2017).

1.2 Die Chemokin-Familie

1.2.1 Klassifikation und Funktion

Bei Chemokinen handelt es sich um eine heterogene Familie bestehend aus 50 chemotaktischen Zytokinen (Luster 1998). Zu ihrem Aufgabenbereich gehören unter anderem die Regulation der Embryogenese und Angiogenese, die Migration von Leukozyten und die Hämatopoese. Chemokine können anhand ihrer Funktion grob in zwei Gruppen unterteilt werden: die homöostatischen Chemokine kommen ubiquitär im Körper in allen Zelltypen und Geweben vor (Rossi et al. 2000). Ihre Funktion besteht vor allem in der Gewährleistung der Entwicklung und Homöostase der Hämatopoese und des Immunsystems. Die inflammatorischen Chemokine dagegen sind nicht ubiquitär im Körper vorhanden, sondern ihre Produktion wird im Rahmen einer Entzündung oder eines sonstigen immunologischen Geschehens induziert (Charo et al. 2006; Vandercappellen et al. 2008).

Die Superfamilie der Chemokine wird, abhängig von der Position der Aminosäure Cystein im aminoterminalen Teil des Proteins, in vier Subgruppen unterteilt: CXC, CC, CX₃C und C. Der Buchstabe X steht hierbei für eine beliebige andere Aminosäure (Zlotnik et al. 2000). Sowohl die CXC- als auch die CC-Gruppe spielen eine wichtige Rolle in der Chemotaxis von Leukozyten, wobei sich die beiden Gruppen darin unterscheiden, welche Subpopulationen sie anlocken (Strieter et al. 1995; Luster 1998). Die CC-Gruppe stellt die größte Subgruppe dar. Die C-Gruppe wird nur von einem einzigen Chemokin repräsentiert, welches als XCL1 oder auch als Lymphotactin bezeichnet wird. Seine Rolle besteht vor allem, wie sein Name es bereits erahnen lässt, in der Chemotaxis von Lymphozyten (Hedrick et al. 1997). Ebenso wird die Gruppe von CX₃C nur von einem Chemokin vertreten, das CX₃CL1, oder auch noch Fraktalkin genannt (Bazan et al. 1997). Auf dieses Chemokin, das Forschungsobjekt der vorliegenden Arbeit war, wird weiter unten noch gesondert eingegangen.

Chemokine agieren nach ihrer Sekretion im Gewebe über heptahelikale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf ihren Zielzellen. Über die dadurch induzierte Hochregulierung von Integrinen und Selektinen kommt es letztendlich zur transendothelialen Migration der Leukozyten (Weber 2003). Bis heute wurden 20 verschiedene Chemokin-Rezeptoren entdeckt, und werden mit der Abkürzung CXCR oder CCR bezeichnet (Murphy 1994; Premack et al. 1996). Während einige Chemokine nur an einen spezifischen Rezeptor binden, bzw. einige Rezeptoren nur mit einem einzigen Chemokin interagieren, herrscht zwischen anderen Chemokinen und ihren Rezeptoren eine relativ große Promiskuität (Cascieri et al. 2000). So interagiert der Rezeptor CXCR3 sowohl mit CXCL9 und CXCL10, als auch mit den Chemokinen CCL11 und CCL13, welche selbst wiederum auch an CCR3 binden (Weng et al. 1998). Andersrum bindet das Chemokin CCL5 nicht nur an den Rezeptor CCR1, sondern auch an CCR3 und CCR5 (Gao et al. 1993).

Chemokine können während einer Entzündung in fast jedem Gewebe sowie in unterschiedlichen Zelltypen gefunden werden (Luster 1998). Dies suggeriert, dass fast alle Zellen in der Lage sind, Chemokine zu sezernieren, sofern sie den richtigen Stimulus erhalten. Solche Stimuli sind

beispielsweise proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), sowie Interferon- γ (INF- γ), was von Th1-Helferzellen produziert wird und zusammen mit TNF- α und IL-1 interagiert, um die Chemokinproduktion zu aktivieren (Baggiolini et al. 1994). Überdies scheint die Zusammensetzung des Leukozyteninfiltrats im Entzündungsgeschehen abhängig vom sezernierten Chemokin zu sein.

Chemokine spielen jedoch nicht nur eine Rolle bei akuten und chronischen Entzündungsgeschehen, sondern scheinen auch in die Kanzerogenese verwickelt zu sein. Produziert werden die Chemokine von den Tumorzellen selbst, aber auch von Stromazellen und tumorassoziierten Leukozyten. Durch die lokale Sekretion von Chemokinen im Tumorgewebe und die damit verbundene Migration und Aktivierung von weiteren Immunzellen wird das Tumormilieu maßgeblich beeinflusst. Dabei scheinen einige Chemokine Tumorentstehung, -wachstum und Metastasierung zu fördern, während andere Chemokine diesen Mechanismen entgegenwirken (Balkwill 2004). In der Tat hemmen beispielsweise die Chemokine CXCL4/Plättchenfaktor-4 und CXCL10/IP-10 Neovaskularisation, Metastasierung und die Tumorprogression (Sharpe et al. 1990; Luster et al. 1993). CXCL8/Interleukin-8 dagegen begünstigt die Angiogenese und Metastasierung (Strieter et al. 1995).

Chemokine üben somit nicht nur direkten Einfluss, beispielsweise durch die Sekretion von matrixdegradierenden Enzymen und Wachstumsfaktoren, auf das Tumorwachstum aus, sondern auch indirekt über die Hemmung oder Begünstigung der Angiogenese (Mantovani et al. 2004).

Des Weiteren produzieren Tumorzellen nicht nur Chemokine, sondern besitzen selbst auch Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Hierdurch werden ebenfalls Tumorzellproliferation und dadurch Tumorprogression und Metastasierung begünstigt. Ein Beispiel hierfür ist das Chemokin CXCL12, das beispielsweise in Metastasierungsorten von Mamma- und Ovarialkarzinomen angereichert ist und somit wesentlich zu deren Metastasierung beiträgt. So konnten Muller et al. zeigen, dass Ovarial- und Mammakarzinomzellen den zugehörigen Rezeptor CXCR4 für das CXCL12-Chemokin vermehrt exprimieren, und dass die Blockierung dieses Rezeptors mit einem Antikörper zu einer reduzierten Metastasierungstendenz beim Mammakarzinom führt (Muller et al. 2001; Scotton et al. 2001).

Chemokine sind somit eine sehr komplexe und heterogene Familie von Zytokinen, deren Hauptaufgabe die Migration von Leukozyten ist. Dadurch beeinflussen sie die Immunantwort und den Verlauf von Entzündungsprozessen grundlegend.

1.2.2 Chemokine im Mamma- und Ovarialkarzinom

Zahlreiche Arbeiten belegen, dass Chemokine auch im Mamma- und Ovarialkarzinom wesentlich zur Komposition des Immunmilieus und damit zum Verhalten des Tumors als Ganzes beitragen.

Die Chemokine CCL2 und CCL5 spielen eine wesentliche Rolle für die Tumorzellproliferation und das Tumorwachstum sowohl beim Mamma- als auch beim Ovarialkarzinom. Saji et al. haben herausgefunden, dass CCL2 in hohen Mengen nicht nur von Mammakarzinomzellen, sondern auch von Stromazellen sezerniert wird, darunter auch von sogenannten tumorassoziierten Makrophagen (TAM), und dass die CCL2-Konzentration mit der TAM-Konzentration korreliert (Saji et al. 2001). Des Weiteren scheint eine hohe Expression von CCL2 mit einer schlechteren Prognose und einem höheren Rezidivrisiko verbunden zu sein (Ueno et al. 2000). Goede et al. haben außerdem eine Korrelation zwischen einer erhöhten Konzentration von CCL2, TAM und potentiellen angiogenen Faktoren, unter anderem VEGF, gefunden. Da tumorassoziierte Makrophagen möglicherweise die Quelle von diesen angiogenen Faktoren sind, suggeriert dies, dass CCL2 indirekt über die Stimulation und Aktivierung von tumorassoziierten Makrophagen zur Tumorangio-genese beiträgt (Goede et al. 1999).

Das Chemokin CCL5 kommt im Brustgewebe von gesunden Patientinnen nicht vor, während es im Mammakarzinom in hohen Mengen exprimiert wird (Luboshits et al. 1999). Niwa et al. und Mira et al. konnten auch für das CCL5 eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten CCL5- Konzentration und fortgeschrittenen Stadien und einer erhöhten Invasivität hervorheben, und suggerieren, dass das CCL5 möglicherweise als prognostischer Faktor für Brusttumore fungieren kann (Niwa et al. 2001; Mira et al. 2001). Man geht davon aus, dass die Sekretion dieser Chemokine im Tumorgewebe in einer Rekrutierung, Migration und Stimulation von bestimmten Leukozyten resultiert, welche vermehrt inflammatorische Zytokine wie TNF- α und protumorale Faktoren, unter anderem matrixdegradierende Enzyme und Wachstumsfaktoren, bilden und somit einen Tumorprogress fördern (s.a. 1.1.4.1) (Ben-Baruch 2003). CCL5 zum Beispiel stimuliert Makrophagen zur vermehrten Sekretion der matrixdegradierenden Metalloprotease MMP9 im Mammakarzinom (Azenshtein et al. 2002).

Auch das Chemokin CXCL8 konnte in hohen Mengen im Mammakarzinom nachgewiesen werden und scheint eine Rolle in der Metastasierung von Mammakarzinomzellen zu spielen (De Larco et al. 2001). Im Ovarialkarzinom haben Negus et al. bereits 1995 die Relation zwischen der Zusammensetzung des Leukozyteninfiltrats und der Chemokinkonzentration untersucht. So konnten sie zeigen, dass vor allem eine hohe Konzentration der Chemokine CCL2 und CCL5 mit einer hohen Anzahl an CD8⁺ Lymphozyten und Makrophagen assoziiert ist (Negus et al. 1995; Negus et al. 1997). Wie beim Mammakarzinom auch, führt CCL5 zu einer Hochregulierung von MMP9 und verhilft somit zu einer verbesserten Tumorinvasion im Ovarialkarzinom (Long et al. 2012). Darüber hinaus konnten Zhou et al. nachweisen, dass Patientinnen mit Cisplatin-resistenten Tumoren eine höhere Konzentration an CCL5 besitzen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass höhere Mengen an CCL5 mit einem schlechteren Therapieansprechen einhergehen können (Zhou et al. 2016).

Auf der anderen Seite scheinen die angiostatischen Chemokine CXCL9 und CXCL10 mit einem verminderten Tumorwachstum assoziiert zu sein (Dorsey et al. 2002). So locken sie Natürliche Killerzellen, CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen ins Tumorgewebe und können dadurch ihre inhibitorische Aktivität auf das Tumorwachstum ausüben (Wendel et al. 2008; Yang et al. 2006). In der Tat besitzen diese Immunzellen den zugehörigen Rezeptor CXCR3 an ihrer Oberfläche (Chen et al. 2013). Untermauert wird diese These mit einigen Arbeiten: So haben Mulligan et al. ebenfalls eine positive Korrelation zwischen CXCL10 und der Anzahl an CD4⁺ und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen im Mammakarzinom gefunden (Mulligan et al. 2013). Denkert et al. haben nachgewiesen, dass eine erhöhte intratumorale Konzentration von CXCR3 Liganden mit einer erhöhten Anzahl an TIL im Mammakarzinom einhergeht und zu einem verbesserten Überleben führt (Denkert et al. 2015). Außerdem haben Specht et al. gezeigt, dass eine starke CXCL9-mRNA-Expression mit einem verlängerten krankheitsfreien Überleben (Disease free survival, DFS) assoziiert ist (Specht et al. 2009). Darüber hinaus zeigten Dorsey et al., dass eine verstärkte Expression von Interleukin-10 in Mammakarzinomzellen die Sekretion von INF- γ induziert, wodurch die Bildung der Chemokine CXCL9 und CXCL10 aktiviert wird (Dorsey et al. 2002).

Auch im Ovarialkarzinom haben Bronger et al. zeigen können, dass CXCL9 und CXCL10 als prognostische Faktoren fungieren können und mit einem verbesserten OS einhergehen. Die Arbeitsgruppe unterstützt ebenfalls die Theorie, dass CXCL9 und CXCL10 zur einer erhöhten Anzahl an TIL im Tumorgewebe führen und dadurch ihre tumorsuppressive Funktion ausüben (Bronger et al. 2016). Allerdings scheinen CXCL9 und CXCL10 auch Tumorwachstum begünstigende Eigenschaften zu besitzen: Redjimi et al. zeigten zum Beispiel, dass die Chemokine mittels Chemotaxis zur Migration von regulatorischen T-Zellen führen (Redjimi et al. 2012). Regulatorische T-Zellen sezernieren VEGF, was wiederum die angiostatische Funktion von CXCL9 und CXCL10 behindert und dem Tumor zur Angiogenese verhilft (Gasparri et al. 2013). Da insgesamt jedoch die CXCL9 und CXCL10 Konzentration im Ovarialkarzinom mit einer verbesserten Prognose korreliert, scheint ihre tumorsuppressive Funktion zu überwiegen (Bronger et al. 2016).

Demnach gestalten Chemokine das Tumormilieu im Mamma- und Ovarialkarzinom wesentlich mit. Hierbei scheinen vor allem die Chemokine CCL2, CCL5, CXCL9 und CXCL10 eine wichtige Rolle zu spielen. Während CCL2 und CCL5 eher die Tumorprogression fördern und somit zu einem schlechteren Outcome beitragen, hemmen CXCL9 und CXCL10 das Tumorwachstum, indem sie beispielsweise die Anzahl an TIL im Tumorgewebe erhöhen und somit das Outcome der Tumorpatientinnen verbessern.

1.3 Das CX₃CL1-Chemokin

1.3.1 Struktur

In der heterogenen Familie der Chemokine nimmt das CX₃CL1-Chemokin eine besondere Stellung ein: so gehört es als einziges Chemokin zu Gruppe der CX₃C-Chemokine. Des Weiteren wird es nicht gleich als lösliches Chemokin sezerniert, sondern erst als membranständiges Protein in die Membran der Zellen eingebaut. Es kann dann durch Cleavage in die lösliche Form überführt werden (s. 1.3.3). Das CX₃CL1 besteht aus insgesamt 373 Aminosäuren, unterteilt in vier unterschiedliche Domänen: die N-terminale extrazelluläre Domäne mit 76 Aminosäuren, welche die typische Chemokin-Domäne mit dem Muster CXXXC (2 Zysteine, welche durch drei unterschiedliche Aminosäuren getrennt werden) bildet, bindet an einen glykolysierten, muzin-reichen Abschnitt, anschließend folgen eine transmembranöse und schließlich eine C-terminale zytoplasmatische Domäne, die aus 37 Aminosäuren besteht (siehe Abbildung 4) (Bazan et al. 1997). Die vier unterschiedlichen Domänen haben auch unterschiedliche Aufgaben: die Chemokindomäne ist der einzige Teil von CX₃CL1, welcher an den spezifischen heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptor CX₃CR1 bindet und mit diesem interagiert (Fong et al. 1998). CX₃CR1-präsentierende Zellen sind vor allem Natürliche Killerzellen, aber auch Monozyten, dendritische Zellen, Endothelzellen und T-Zellen (Imai et al. 1997). Der muzin-reiche Abschnitt hat als Hauptaufgabe, diese Chemokindomäne den peripheren Leukozyten zu präsentieren und eine starke Rezeptor-Ligand-Bindung zu ermöglichen (Fong et al. 2000). Ostuni et al. konnten zeigen, dass vor allem die starke Glykosylierung des muzin-reichen Abschnitts für die Adhäsion der Chemokindomäne an seinen Rezeptor zuständig ist (Ostuni et al. 2014). Die transmembranöse Domäne spielt eine wesentliche Rolle in der Aggregation von Molekülen nach der Bindung von CX₃CL1 an seinen Rezeptor (Hermant et al. 2008). Schließlich ist die zytoplasmatische Domäne in den intrazellulären Transport von CX₃CL1 zur Zelloberfläche involviert und ermöglicht die Endozytose und somit ein Recycling dieses Moleküls (Andrzejewski et al. 2010; Liu et al. 2005). CX₃CL1 wird als 50-75 kDa großes Precursorprotein intrazellulär synthetisiert und unterläuft anschließend unterschiedliche Reifeprozesse, wozu auch die Glykosylierung gehört. Als fertiges 100 kDa großes Protein wird es letztendlich an die Zelloberfläche transportiert und dort als Transmembranprotein eingebaut. Durch bestimmte Enzyme kann die lösliche Form abgespalten werden, die ein Molekulargewicht von 85 kDa besitzt und aus der Chemokindomäne sowie dem Großteil des glykosylierten Abschnitts besteht. Die restlichen 20 kDa verbleiben auf der Zellmembran und setzen sich aus der transmembranösen und zytoplasmatischen Domäne zusammen (Garton et al. 2001).

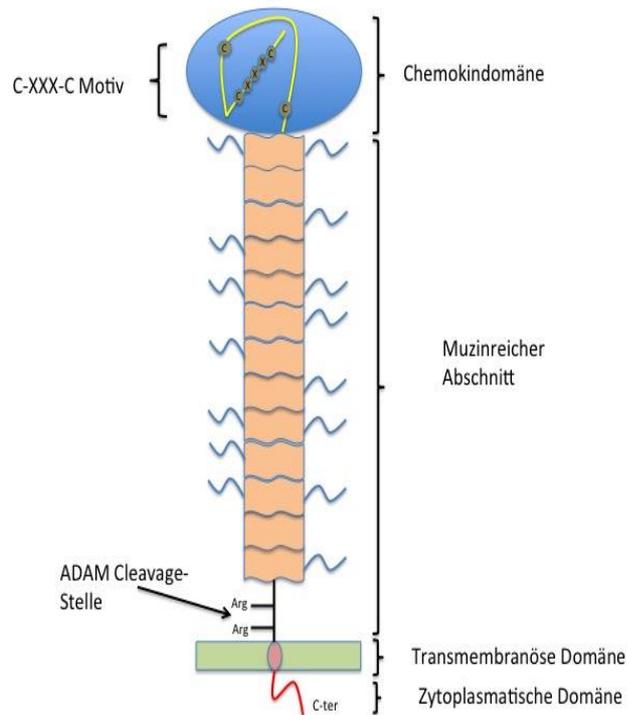


Abbildung 4: Struktur von CX₃CL1:

CX₃CL1 besteht aus 4 verschiedenen Teilen: die extrazelluläre Chemokindomäne mit dem CXXXC-Motiv, welche an einen muzinreichen Abschnitt gebunden ist, gefolgt von einer transmembranösen Domäne und anschließend einer zytoplasmatischen Domäne (modifiziert nach Tardáguila et al. 2013).

1.3.2 Vorkommen und Funktion

Wie andere Chemokine auch, spielt das CX₃CL1 eine bedeutende Rolle in inflammatorischen Prozessen. In der Tat können zahlreiche Zellen das CX₃CL1-Chemokin exprimieren: unter anderem Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Monozyten, Epithelzellen, Hepatozyten, Gliazellen und Neuronen, Fibroblasten und Kardiomyozyten. Wichtig zu erwähnen wäre hierbei, dass einige dieser Zellen, beispielsweise Epithelzellen, Neuronen oder Gliazellen, CX₃CL1 auch ohne inflammatorische Stimuli exprimieren (Lucas et al. 2001).

Außerdem wird zwischen der löslichen und membranständigen Form von CX₃CL1 unterschieden: die lösliche Form besteht aus der Chemokindomäne und dem muzinreichen Abschnitt (Jones et al. 2010). Ihre Funktion besteht in der Chemotaxis von Leukozyten, darunter vor allem von Monozyten, Natürlichen Killerzellen und T-Zellen (Bazan et al. 1997). Die membranständige Form auf Endothelzellen fungiert als Adhäsionsmolekül für scherkräfte-resistente Leukozyten und ermöglicht durch deren Bindung die Migration ins extravasale Gewebe. Ohne CX₃CL1 ist diese nämlich von der Sekretion anderer Chemokine und vor allem von der dadurch stimulierten Bildung von Integrinen und Selektinen auf Endothelzellen abhängig. Das CX₃CL1 macht die Expression der Integrine durch seine stark ausgeprägte Adhäsionskraft überflüssig. Vor allem zytotoxische Leukozyten wie Natürliche

Killerzellen und CD8⁺ T-Zellen besitzen den CX₃CR1 Rezeptor und profitieren von einer Bindung an CX₃CL1, da sie dadurch zusätzlich aktiviert werden, was in einer erhöhten Zytotoxizität und IFN- γ Sekretion resultiert (Fong et al. 1998) (s. Abbildung 5). Im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses exprimiert geschädigtes Endothel vermehrt CX₃CL1 und erleichtert und beschleunigt somit die Migration von zytotoxischen T-Zellen ins entzündete Gewebe (Umehara et al. 2004). Daher ist es nicht verwunderlich, dass CX₃CL1 zum Beispiel auch in der Entstehung und Ruptur von atherosklerotischen Plaques eine entscheidende Rolle spielt, da es durch die Aktivierung von natürlichen Killerzellen zur Schädigung des Endothels führen kann (Lesnik et al. 2003; Yoneda et al. 2000).

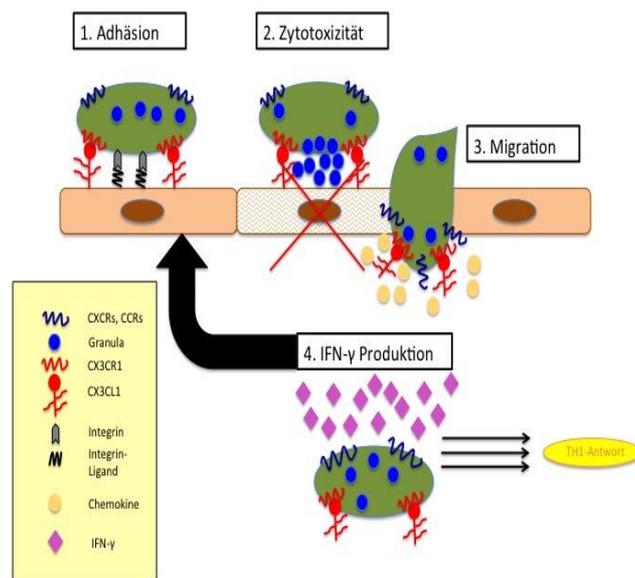


Abbildung 5: Funktionen von CX₃CL1:

1. CX₃CL1 in seiner membranständigen Form auf Endothelzellen fungiert als starkes Adhäsionsmolekül für Leukozyten. 2. CX₃CR1 exprimierende Zellen wie natürliche Killerzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen enthalten in ihrem Zytoplasma Granula. Werden diese Zellen durch ihre Bindung an CX₃CL1 aktiviert, werden diese Granula sezerniert und es kann zur Endothelschädigung kommen. 3. Membranständiges CX₃CL1 verstärkt den Effekt anderer Chemokine und erleichtert somit die Migration und Diapedese von Leukozyten ins entzündete Gewebe (modifiziert nach Umehara et al. 2004).

Aber auch das lösliche CX₃CL1 ist in inflammatorische Prozesse involviert: So findet sich lösliches CX₃CL1 zum Beispiel in Seren von Patienten mit einer instabilen koronaren Herzkrankheit, rheumatoider Arthritis (RA), oder Lupus erythematodes (Damas et al. 2005; Yajima et al. 2005). In der Tat konnten Ikejima et al. eine erhöhte Konzentration von CX₃CL1 in Patienten mit Plaqueruptur nachweisen (Ikejima et al. 2010). Auch bei der rheumatoiden Arthritis ist CX₃CL1 gleich zweimal relevant: als lösliches Chemokin lockt es Entzündungszellen an, als membranständige Form ist es für deren Adhäsion und Migration in die Synovia zuständig (Ruth et al. 2001). Stimuliert wird die Bildung von CX₃CL1 dabei vor allem durch typische Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IFN- γ und IL-1

(Garcia et al. 2000; Yoshida et al. 2001). IL-4 und IL-6 dagegen hemmen seine Bildung (Matsumiya et al. 2001). Dies erklärt zum Beispiel die Tatsache, dass der TNF- α Antikörper Infliximab, welcher im Rahmen der RA-Therapie angewendet wird, zu einer verminderten Sekretion von inflammatorischen Zytokinen führt, darunter auch CX₃CL1 (Odai et al. 2009).

Des Weiteren scheint CX₃CL1 in der Karzinogenese von Bedeutung zu sein. In der Literatur werden dabei unterschiedliche Ansichten bezüglich der Funktion von CX₃CL1 für Tumorwachstum und Metastasierung vertreten. Zum einen haben beispielsweise Vitale et al. gefunden, dass CX₃CL1 bei Patienten mit kolorektalem Karzinom tumorsuppressiv wirkt, da es negativ mit der Tumorgroße korreliert und seine erhöhte Expression mit einer verbesserten Prognose einhergeht (Vitale et al. 2007). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für das Adenokarzinom des Magens sowie für das hepatozelluläre Karzinom gefunden werden (Hyakudomi et al. 2008; Matsubara et al. 2007). In der Tat haben mehrere Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass eine hohe CX₃CL1- Expression mittels Chemotaxis zu einer vermehrten Anzahl an TIL im Tumorgewebe führt, unter anderem CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, Natürliche Killerzellen und dendritische Zellen, welche eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort vermitteln (Guo et al. 2003; Lavergne et al. 2003; Xin et al. 2005). Zum anderen haben Marchesi et al. gezeigt, dass beispielsweise Glioblastome, Mammakarzinome und Pankreastumore vermehrt CX₃CR1 exprimieren, was zur vermehrten Adhäsion, transendothelialen Migration und verstärkten Mobilisation der Tumorzellen führt. Ein hoher CX₃CL1-Gradient scheint damit die Metastasierung dieser Tumore zu fördern (Marchesi et al. 2010). Außerdem aktiviert es durch Bindung an CX₃CR1 exprimierende Tumorzellen die Expression von Wachstumsfaktoren wie EGFR sowie antiapoptotische und promotogene Signalwege wie der MAPK/ERK-Signalweg, was wiederum eine Tumorprogression begünstigt (Tardaguila et al. 2013). CX₃CL1 besitzt somit sowohl pro- als auch antitumorale Eigenschaften.

Insgesamt erfüllt das CX₃CL1-Chemokin unterschiedliche Funktionen, je nachdem, ob es in seiner löslichen oder membranständigen Form vorkommt, und ist in zahlreiche Entzündungsprozesse sowie in die Entwicklung von Tumoren verwickelt.

1.3.3 Cleavage von CX₃CL1 durch ADAM-Proteasen

In 1.3.2 wurde bereits erwähnt, dass die Überführung von CX₃CL1 von der membranständigen in die lösliche Form durch ein sogenanntes Cleavage im Bereich der transmembranösen Domäne erreicht wird (Bazan et al. 1997) (s. Abbildung 6). In der Tat haben Hooper et al. gezeigt, dass das von Zellen nach außen präsentierte Repertoire an Transmembranproteinen, wie zum Beispiel Zytokine, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle, durch proteolytisches Cleavage, auch noch Ektoshedding genannt, reguliert wird (Hooper et al. 1997). Zuständig für dieses Cleavage sind vor allem Matrix-Metalloproteasen (MMP) und ADAMs, welche auch noch als Sheddasen oder Sekretasen bezeichnet werden. ADAM steht für „A Disintegrin And Metalloproteinase“. Hierbei handelt es sich um integrale

Typ I Transmembranproteine, deren Funktion darin besteht, andere Transmembranproteine zu schneiden. Als Kofaktor benötigen sie unter anderem Zink (Blobel 2000). Ähnlich wie das CX₃CL1, bestehen diese Sheddasen aus einer Zink-abhängigen katalytischen Domäne, aus einer Disintegrin-Domäne, welche für die Bindung an Integrine zuständig ist, sowie aus einer transmembranösen und zytoplasmatischen Domäne (Tsou et al. 2001). Neben ihrer Funktion als „Schneidemolekül“, spielen ADAM außerdem eine Rolle in der Entwicklung von Epithelien und Neuronen, Fertilisation und Zell-Zell-Kontakten. Für das Cleavage von CX₃CL1 sind vor allem zwei verschiedene ADAM zuständig. Man unterscheidet dabei eine konstitutive Sheddase, ADAM10, welche unter normalen Bedingungen aktiv ist, und eine induzierbare Sheddase, namentlich ADAM17, auch noch als TACE (=TNF- α converting enzyme) bezeichnet, welche durch bestimmte Mediatoren wie zum Beispiel TNF- α aktiviert wird und zu einer vermehrten Bildung löslichen CX₃CL1 führt (Garton et al. 2001; Patel et al. 1998; Hundhausen et al. 2003). Bezüglich des Zwecks des Cleavages von CX₃CL1 haben Hundhausen et al. die These vorgeschlagen, dass unter proinflammatorischen Bedingungen das membranständige CX₃CL1 auf Endothelzellen hochreguliert wird. Dies würde eine verstärkte Adhäsion zwischen CX₃CR1⁺ Leukozyten und Endothel hervorrufen. Aufgrund der sehr langsamen Dissoziationsrate zwischen CX₃CL1 und seinem Rezeptor unter normalen physiologischen Bedingungen, spielt die gewöhnliche Ligand-Rezeptor-Dissoziation eher eine geringere Rolle für das Auflösen dieser Zell-Zell-Adhäsion (Haskell et al. 2000). Daher erlaubt vor allem das sich anschließende Cleavage von CX₃CL1 in seine lösliche Form durch ADAM10 und ADAM17 es den Leukozyten, sich von dieser starken Rezeptor-Ligand-Bindung zu befreien und ins entzündete Gewebe zu wandern. Ferner stellt das durch das Cleavage vermehrt anfallende lösliche CX₃CL1 einen Konzentrationsgradienten dar, welcher Leukozyten verstärkt anlockt und deren Migration und Diapedese ermöglicht. Abschließend ist festzuhalten, dass sowohl das konstitutive als auch das induzierbare Cleavage von CX₃CL1 zwei regulatorische Elemente für die durch CX₃CL1 vermittelte Zell-Zell-Adhäsion darstellt (Hundhausen et al. 2003).

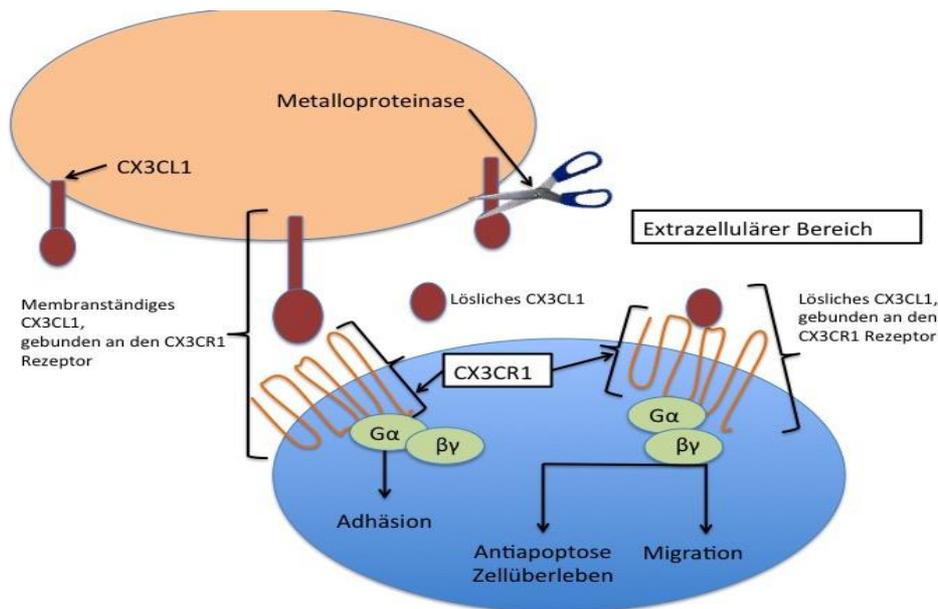


Abbildung 6: Cleavage von CX₃CL1 durch ADAM:

ADAM10 und ADAM17 schneiden CX₃CL1 im Bereich der transmembranösen Domäne auf der Oberfläche von Endothelzellen und überführen es dadurch von seiner membranständigen in seine lösliche Form. Beide Formen können an den CX₃CR Rezeptor binden, wobei jede Form unterschiedliche Funktionen besitzt. Die membranständige Form fungiert vor allem als Adhäsionsmolekül für Leukozyten, die lösliche Form hat eher chemotaktische Eigenschaften (modifiziert nach White und Greaves 2009).

1.3.4 CX₃CL1 im Mamma- und Ovarialkarzinom

In 1.2.2 wurde die Rolle von Chemokinen im Mamma- und Ovarialkarzinom bereits besprochen und in 1.3.2. wurde diskutiert, inwiefern CX₃CL1 sowohl pro- als auch antitumorale Eigenschaften aufweist. Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass CX₃CL1 sowohl im Mamma- als auch im Ovarialkarzinom vorkommt und das Tumormilieu ebenso negativ wie positiv beeinflusst.

Einerseits haben Park et al. gezeigt, dass eine hohe Expression an CX₃CL1 im Mammakarzinom mit einer verstärkten Infiltration von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen im Tumorgewebe einhergeht, und mit einer geringeren Tumorgroße und einem niedrigeren Tumorstadium assoziiert ist. Vor allem PR- Mammakarzinome mit einer hohen CX₃CL1-Expression scheinen zudem weniger oft Lymphknotenmetastasen auszubilden. Eine hohe CX₃CL1-Expression war unabhängig von anderen tumorbiologischen Kriterien mit einem verbesserten krankheitsfreien und Gesamtüberleben assoziiert (Park et al. 2012).

Andererseits haben Tsang et al. das genaue Gegenteil bezüglich der Prognose für das CX₃CL1 im Mammakarzinom festgestellt. In ihrer Arbeit korreliert eine hohe CX₃CL1 Expression bei Patientinnen mit Mammakarzinom mit einer vermehrten lymphoiden Metastasierung, mit einem hohen Ki67-Wert, welcher prognostisch ungünstig ist, und einem schlechteren OS. Tsang et al. bestreiten dabei nicht die

antitumoralen Eigenschaften von CX₃CL1, welche vor allem durch die Chemotaxis von immunkompetenten Zellen ins Tumorgewebe zur Tumorbekämpfung beitragen, vielmehr vertreten sie die Hypothese, dass bei einer zu hohen Expression an CX₃CL1 die protumoralen Eigenschaften von CX₃CL1 überwiegen. Dies erklärt auch, warum in ihrer Arbeit Patientinnen mit einer intermediären CX₃CL1-Konzentration die beste Prognose besitzen und Tumore mit einer geringen Anzahl an TIL und einer hohen CX₃CL1 Expression eine besonders schlechte Prognose vorweisen. Hier scheint der protumorale Effekt von CX₃CL1 besonders zu dominieren, da bei einer geringen Anzahl an TIL von einer geringen chemotaktischen Aktivität von CX₃CL1 auszugehen ist, was einen schwachen antitumoralen Effekt suggeriert. Außerdem proklamieren sie, dass das Gleichgewicht zwischen der membranständigen und löslichen Form von CX₃CL1, und somit die Aktivität der zuständigen ADAM-Proteasen eine maßgebende Rolle in der Karzinogenese spielt (Tsang et al. 2013).

Des Weiteren haben verschiedene Arbeitsgruppen einen Zusammenhang zwischen der Metastasierung und der Expression des CX₃CR1 Rezeptors im Mammakarzinom beschrieben. So haben Jamieson-Gladney et al. festgestellt, dass Mammakarzinomzellen vermehrt ossär metastasieren, wenn sie eine hohe Expression von CX₃CR1 besitzen (Jamieson-Gladney et al. 2011). Andre et al. haben ein ähnliches Ergebnis für die zerebrale Metastasierung beim Mammakarzinom gefunden. Da Neurone konstitutiv CX₃CL1 exprimieren, kann das Chemokin CX₃CR1-exprimierende Mammakarzinomzellen anlocken und somit deren Metastasierung ankurbeln (Andre et al. 2006). Der protumorale Effekt von CX₃CL1 scheint somit vor allem von der CX₃CR1-Rezeptor vermittelten Transmigration von Karzinomzellen abhängig zu sein. Die Metastasierungsmechanismen ähneln dabei sehr dem Mechanismus, wie Leukozyten in entzündete Gewebe angelockt werden und migrieren (Park et al. 2012). Außerdem wurde in 1.4.1.2 erklärt, dass TAM wesentlich zur Tumorprogression beitragen. Reed et al. suggerieren, dass CX₃CL1 CX₃CR1⁺ Makrophagen ins Tumorgewebe lockt, und somit indirekt das Tumorwachstum begünstigt (Reed et al. 2012). Es ist also nicht verwunderlich, dass alle Arbeitsgruppen die Notwendigkeit der weiteren Erforschung der Rolle von CX₃CL1 im Mammakarzinom fordern.

Im Ovarialkarzinom wurde CX₃CL1 bisher nur von einer Arbeitsgruppe analysiert. Gaudin et al. haben CX₃CL1 in allen histologischen Subtypen gefunden, sowohl in benignen, malignen und Borderline-Tumoren, jedoch keine signifikante Assoziation zwischen CX₃CL1 und einem bestimmten Subtyp nachweisen können. Des Weiteren konnten auch sie eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten CX₃CL1-Expression und einem hohen Ki67-Wert darlegen. Insgesamt vertritt die Arbeitsgruppe die Meinung, dass CX₃CL1 zu einer verstärkten Proliferation im Ovarialkarzinom führt und somit eher begünstigend auf das Tumorwachstum wirkt. Nichtsdestotrotz heben auch sie hervor, dass CX₃CL1 antitumorale Eigenschaften besitzt, und dass es die Herausforderung der Zukunft ist, die prognostische Vorhersagekraft von CX₃CL1 im Ovarialkarzinom herauszuarbeiten (Gaudin et al. 2011).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

CX₃CL1 ist als einziges Chemokin der CX₃C Subgruppe bis dato bekannt. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass es sowohl als lösliches wie auch als membranständiges Chemokin vorkommt und dabei unterschiedliche Funktionen ausübt. Wie andere Chemokine auch, trägt es maßgeblich zur Vermittlung der Immunantwort bei und ist an entzündlichen Prozessen beteiligt. Seine Rolle in Autoimmunerkrankheiten wie Rheumatoider Arthritis oder Psoriasis wurde bereits ausgiebig erforscht. In jüngster Zeit ist aber vor allem seine Funktion in der Karzinogenese Gegenstand der Forschung. Da CX₃CL1 sowohl pro- als auch antitumorale Eigenschaften zu besitzen scheint, stellt das Herausarbeiten dieser komplexen Interaktion zwischen dem CX₃CL1-Chemokin, Tumorzellen und Immunsystem eine große Herausforderung dar.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Rolle und Regulation des CX₃CL1 Chemokins im Mamma- und Ovarialkarzinom näher zu beleuchten. Dabei wird in einem ersten experimentellen Ansatz die Wirkung der inflammatorischen Zytokine INF- γ und TNF- α auf die CX₃CL1-Produktion in humanen und murinen Mammakarzinomzellen analysiert, indem Mammakarzinomzellen von zwei unterschiedlichen Zelllinien mit INF- γ und TNF- α stimuliert werden, und die CX₃CL1 Produktion anschließend gemessen wird. In einem zweiten Ansatz wird das Cleavage von CX₃CL1 durch ADAM-Proteasen genauer untersucht. Hierfür werden Mammakarzinomzellen mit ADAM-Inhibitoren inkubiert, und die CX₃CL1-Sekretion wiederum gemessen.

In einem dritten Ansatz wird versucht, die mögliche Rolle von CX₃CL1 in der Tumorlyse von Ovarialkarzinomzellen im Rahmen eines sogenannten Europium-Assays zu klären. Da CX₃CL1 bekannter Weise Natürliche Killerzellen anlockt, werden Ovarialkarzinomzellen unterschiedlich stimuliert und mit Natürlichen Killerzellen inkubiert, anschließend sollte die Tumorlyse gemessen werden. Durch unterschiedliche Stimulationen wird versucht, mehr über die Rolle von CX₃CL1 in der Gestaltung des Tumormikromilieus vom Ovarialkarzinom zu erfahren.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Medien

2.1.1.1 Einfriermedium

Die Tumorzellen wurden in flüssigem Stickstoff in FCS/20% DMSO bei -196 °C kryokonserviert.

2.1.1.2 Zellkulturmedium

Für die SKBR3-Zellen wurde McCoy Medium, für die OVMZ6-Tumorzellen DMEM, für die 4T1-Zellen RPMI 1640 Medium und für die NK-Zellen RPMI 1640 ohne Indikator verwendet.

Tabelle 1: *Benutzte Zellkulturmedien*

<i>Bestandteil</i>	<i>Firma</i>
1x RPMI 1640	Gibco by Life Technologies, (Paisley, UK Gran Island, USA Auckland, NZ)
1x RPMI 1640 (ohne Indikator)	Gibco by Life Technologies, (Paisley, UK)
1x DMEM+ GlutaMAX-I	Gibco by Life Technologies (Paisley, UK)
1x McCoy's SA Medium	Gibco by Life Technologies, (Paisley, UK)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, (Steinheim, DE)
Sodiumpyruvat	Gibco by Life Technologies, (Paisley, UK)
DMSO	Sigma-Aldrich, (Steinheim, DE)
FCS 10% (V/V)	Gibco by Life Technologies, (Paisley, UK)
Asparginin/Arginin 0,2% (m/V)	Sigma-Aldrich, (Steinheim, DE)
Hepes Buffer Lösung 1M	Gibco by Life Technologies, (Paisley, UK)

2.1.3 Puffer und Gele

2.1.3.1 Lysepuffer für Zellysate

Lysepuffe für 5 ml:

1x TBS	3,5 ml	
1% Triton X-100	50 µl	
Complete EDTA (25x)	200 µl	
Vanadat	50 µl	1 mM (Stock: 100 mM)
Glyzerolphosphat	50 µl	1 mM (Stock: 100 mM)
NaF	500 µl	50 mM (Stock: 500 mM: 0,525 g in 25 ml H ₂ O)
Na-Pyrophosphat	500 µl	10 mM (Stock: 100 mM: 1,12 g in 25 ml H ₂ O, pH=7,0)

2.1.3.2 Puffer für Western Blot

10x Elektrophoresepuffer (1000 ml)

Glyzin	144 g	1,6 M
Tris	30 g	250 mM
SDS	10 g	40 mM/ 1%
H ₂ O	Ad 1 Liter	

10x TBST- Waschpuffer (1000 ml)

NaCl	87,7 g	1,5 M
Tris-HCl	78,8 g in 500 ml H ₂ O	1 M pH=8
Tween 20	10 ml	1%
H ₂ O	Ad 1 Liter	

→autoklavieren

Semi-Dry-Puffer (1000 ml)

Tris	5,82 g	50 mM
Glyzin	2,93 g	30 mM
SDS	0,037 g	4‰ (m/V)
H ₂ O	800 ml	
Ethanol	200 ml	100%

2.1.3.4 Puffer für ELISA

10x PBS (1000 ml)

KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	11,4 g
KCl	2 g
Dist. H ₂ O	Ad 800 ml, pH=7,4 einstellen
NaCl	80 g
Dist. H ₂ O	Ad 1 Liter auffüllen
→autoklavieren	

Waschpuffer

450 µl in 900 ml 1x PBS

Blockpuffer

1% (m/V) BSA/PBS: 1 gr BSA in 100 ml 1x PBS

2.1.3.5 Gele

Trenngel 10%, 1,5 mm dick (für 1 Minigel)

H ₂ O	4,8 ml	
Tris-HCl	2,5 ml	1,5 M (36,342 g in 200 ml H ₂ O, pH=8,8)
20% (m/V) SDS	50 µl	
40% (m/V) Acrylamid	2,5 ml	
TEMED	10 µl	
10% (m/V) Ammoniumpersulfat (APS)	50 µl	

Sammelgel 4% (für 2 Minigele)

H ₂ O	6,3 ml	
Tris-HCl	2,5 ml	0,5 M (7 g in 100 ml H ₂ O, pH=6,8)
10% SDS	100 µl	
40% Acrylamid	1 ml	
TEMED	10 µl	
10% APS	100 µl	

2.1.3.7 Medien und Puffer für den Europium-Assay

10% (V/V) BZM

RPMI 1640	500 ml
10% FCS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	
Sodiumpyruvat 1 mM	1 ml

Eu-Medium ohne Stabilizer

RPMI 1640 ohne Indikator	500 ml
10% FCS	50 ml

100x Sulfinpyrazon Stock (Stabilizer)

Sulfinpyrazon	0,2 g
NaOH 2M	500 µl
Ad H ₂ O	4,5 ml

→ steril filtrieren und Aliquots von 500 µl herstellen, die bei -20 °C aufbewahrt werden können

Eu-Medium mit Stabilizer

Eu-Medium ohne Stabilisator	50 ml
100x Sulfinpyrazon	500 µl

2% (V/V) Triton X-100

Triton X-100	200 µl
Eu-Medium ohne Stabilisator	10 ml

Europium Solution (1/5 verdünnt), für 2 Targets

DELFI A Europium Lösung	6 ml
H ₂ O	24 ml
Essigsäure	513 µl

2.1.4 Antikörper und ELISA-Kits

Die humanen und murinen CX₃CL1 und CXCL10 ELISA-Kits, sowie das zugehörige Streptavidin-HRP stammten allesamt von der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstad). Das Peroxidase Substrat System stammte von der Firma Sera Care- KPL (Maryland, USA). Alle Antikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet.

Sowohl der monoklonale als auch der polyklonale CX₃CL1-Antikörper für den Western Blot stammten von der Firma R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstad). Die Zweitantikörper stammten von der Firma Jackson Immuno Research (Suffolk, GB). Der Anti-GAPDH-Antikörper stammte von der Firma Merck Millipore (Darmstad).

Tabelle 2: *Verwendete Antikörper für die Western Blot-Analysen*

	<i>Erkanntes Protein</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Verdünnung bzw. Endkonzentration</i>	
Maus anti-CX ₃ CL1 AK	CX ₃ CL1	Maus	500 µg/ml, 1:500	monoklonal
Ziege anti-CX ₃ CL1 AK	CX ₃ CL1	Ziege	200 µg/ml, 1:1000	polyklonal
Kaninchen-anti-Ziege AK	Ziege IgG	Kaninchen	1:1000	polyklonal
Ziege-anti-Maus AK	Maus IgG	Ziege	1 mg/ml, 1:10000	
Anti-GAPDH-Maus AK	GAPDH	Maus	200 µg, 1 mg/ml, 1:10000	

2.1.5 Stimulantien und Enzyme

Tabelle 3: *Stimulantien und Enzyme*

<i>Stimulanz/ Enzym</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Firma, Firmensitz</i>
hTNF- α	5 ng/ μ l in 0,1% BSA/PBS	PeptoTech (Hamburg)
mTNF- α	5 ng/ μ l in 0,1% BSA/PBS	PeptoTech (Hamburg)
	50 ng/ml	PeptoTech (Hamburg)
mIFN- γ	100 μ g/ml in 0,09% BSA/PBS	PeptoTech (Hamburg)
TAPI2	12 mM in H ₂ O	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GI254	10 mM in DMSO	TOCRIS, R&D Systems Company (Bristol)
h-IL2	500000 U/ml in Essigsäure/0,1% BSA	PeptoTech (Hamburg)

2.1.6 Deglykosylierungsassay

Das Kit für den Deglykosylierungsassay enthielt Neuraminidase mit einer Konzentration von 5×10^4 U/ml, O-Glykosidase mit einer Konzentration von 4×10^7 U/ml. Das verwendete Kit stammte von New England Biolabs (Frankfurt am Main).

2.1.7 Weitere Chemikalien

Tabelle 4: *Chemikalien*

<i>Substanz</i>	<i>Firma, Firmensitz</i>
Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung	Carl ROTH GmbH+Co KG (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau (für Lämmli-Puffer)	AppliChem (Darmstadt)
BSA	Sigma Life Science (Steinheim)
Complete-EDTA	Roche (Mannheim)
DELFIABATDA Reagenz	Perkin-Elmer (Wellac Oy, Turcu, Finnland)
1x DPBS	Gibco (Paisley, UK)
ECL-Lösung: Pierce ECL-Western Blot Substrate	Thermo Scientific (IL, USA)

EDTA, 1% in PBS	Biochrom (Berlin)
Europium-Lösung	Perkin-Elmer (Wellac Oy, Turcu, Finnland)
Essigsäure	Carl ROTH Gmbh+Co KG (Karlsruhe)
Ethanol	Otto Fischar Gmbh (Saarbrücken)
Glyzerolphosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glyzin	Carl ROTH Gmbh+Co KG (Karlsruhe)
H ₂ O	B.Braun (Melsungen)
Isopropanol	Merck KGaA (Darmstadt)
KCl	Riedel de Häen (Seelze)
KH ₂ PO ₄	Merck KgaA (Darmstadt)
Mercaptoethanol	Carl ROTH Gmbh+Co KG (Karlsruhe)
Milchpulver	Carl ROTH Gmbh+Co KG (Karlsruhe)
NaCl	Carl ROTH Gmbh+Co KG (Karlsruhe)
NaF	Merck KgaA (Darmstadt)
Na ₂ HPO ₄ □ H ₂ O	Sigma-Aldrich (Steinheim)
NaH ₂ PO ₄ □ H ₂ O	Carl ROTH Gmbh+Co KG (Karlsruhe)
NaN ₃	Sigma-Aldrich (Steinheim)
NaOH c=2N	Merck KgaA (Darmstadt)
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Page Ruler Plus Prestained	Thermosciences (Waltham, Massachusetts, USA)
Pierce Protein BSA Protein Assay Kit für Proteinbestimmung	ThermoScientific (Illinois, USA)
Ponceau	AppliChem (Darmstadt)
SDS	Carl ROTH Gmbh+Co KG (Karlsruhe)
Sulfinpyrazon	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TEMED	AppliChem (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris-HCL	Carl ROTH Gmbh+Co KG (Karlsruhe)
Tris	Carl ROTH Gmbh+Co KG (Karlsruhe)
Tryptanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypsin	Biochrom (Berlin)
Tween20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Vanadat	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.1.8 Geräte

Tabelle 5: *Benutzte Geräte*

<i>Gerät</i>	<i>Firma, Firmensitz</i>
Elektrophoresespannungsquelle	Consort (Turnhout, Belgien)
ELISA&Proteinbestimmung-Messgerät: Multiscan Fc	Thermo Scientific Instruments Co. (Unity Lab Services Shanghai, China)
Entwicklungsmaschine	CAWO Photometrisches Werk Gmbh (Schrobenhausen)
Europium-Assay-Messgerät	Perkin-Elmer (Wellac Oy, Turcu, Finnland)
Feinwaage	Sartorius (Ismaning)
Heizblocker: Blockthermostat BT1301	Laboratory Products (England)
Inkubator: Heracell 150i CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific (Hanau)
Mikroskop: Olympus CK30-F200	Olympus Optical Co. LTD (Japan)
pH-Messgerät: Öab 850	Schott-Instruments (Mainz)
Schüttler: Vibrax-VXR IKA	Janke&Kunkel IKA Labortechnik Gmbh (Staufen i.Br.)
Semi-Dry-Blotting Maschine	Biometra (Schrobenhausen)
Sterilbank: Hera Safe	Thermo Scientific (Hanau)
Ultraschall Sonotrade	Bandelin Electronic (Berlin)
Waage	Sartorius (Ismaning)
Vortexer: MS1 Minishaker	IKA Works Inc. (Willington, NC)
Zentrifuge: Rotina 48R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

2.1.9 Verbrauchsmaterial

Tabelle 6: *Eingesetztes Verbrauchsmaterial*

<i>Material</i>	<i>Firma, Firmensitz</i>
Abdeckfolien für ELISA-Platten	Rotilabo Exel Scientific (Karlsruhe,)
Combitips Spritzen 5 ml	Eppendorf AG (Hamburg)
Plastikpipetten: Cellstar 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Gesteckte Pipettenspitzen: 10 µl, 100 µl, 200 µl	Biozym Biotech Trading Gmbh (Wien, Österreich)
Zellschaber: Cell Scraper	Greiner Bio-one (Frickenhausen)

Zellkulturflaschen: T50 T75	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturplatten: 12-Well-Platten 6-Well-Platten 6 cm- Petrischalen	Falcon (New York, USA)
ELISA Platte: 96-Well-Platten	NUNC (Dänemark)
96-Well-Platten (V-Bottom)	NUNC (Dänemark)
96-Well-Platten (für Proteinbestimmung)	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Schott-Flaschen 1 L	DURAN Group GmbH (Wertheim/Main)
Falcon-Röhrchen: Cellstar Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Eppendorffgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Glaspipetten/Pasteurpipetten	Hirschmann (Eberstadt)
Pipettierhilfen: Easy Pet & Multipipette plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Nitrocellulose-Transfer-Membran: Protran	Schleicher& Schwell BioRad (Dassel)
PVDF-Transfer-Membran: Roti-PVDF 0,45 µm Porengröße	Carl ROTH GmbH+Co KG (Karlsruhe)
Filterpapier, Blotting Papier	Macherey-Nagel (Düren)
Proteingelgießkammer	BioRad (Hercules, Kalifornien, USA)
Gelkämme	biostep GmbH (Burkhardtsdorf)
Glasplatten	biostep GmbH (Burkhardtsdorf)
Platzhalter	BioRad (Hercules, Kalifornien, USA)
Zellzähler	IVO (Deutschland)
Deckgläser	Menzel GmbH (Braunschweig)
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor Fischer (Lancing, UK)
Sterile Spritzen 10 ml & 20 ml	B.Braun (Melsungen)
Spritzenfilter 0,20 µm	Sartorius Stedin Biotech (Goettingen)
Röntgenfilme	Ernst Christiansen GmbH (Planegg)
Handschuhe: Sempercare	Semperit Technische Produkte GmbH (Wien, Österreich)

2.2 Zelllinien und Kultivierung

2.2.1 Verwendete Zelllinien

Als humane Mammakarzinomzelllinie wurden SKBR3-Zellen verwendet. Sie wurden ursprünglich aus dem Pleurapunktat einer 43-jährigen Frau isoliert und stellen eine Hormonrezeptor-negative HER2-positive Zelllinie dar.

Bei den verwendeten murinen 4T1-Zellen handelte es sich um eine triple-negative Mammakarzinomzelllinie, die aus Balb/c/c3H-Mäusen isoliert wurde. Sie zeigt ein aggressives Wachstumsmuster und metastasiert in vivo hauptsächlich in die Lunge.

Als humane Ovarialkarzinomzelllinie wurden OVMZ6-Zellen verwendet. Sie wurden ursprünglich aus dem Aszitespunktat einer 70-jährigen Frau isoliert. Es handelt sich um ein schlecht differenziertes seröses Adenokarzinom des Ovars. (Mobus et al. 1992)

Die in den Lyseassays verwendeten natürlichen Killerzellen wurden uns freundlicherweise von Frau Dr. Daniela Schilling aus der Forschergruppe der Klinik für Strahlentherapie (TU München) zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden regelmäßig mittels PCR auf Mykoplasmen getestet.

2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei -250 °C im Stickstofftank gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen in 3 ml 100% FCS durch langsames auf- und abpipettieren aufgetaut und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Vitalität der Zellen mikroskopisch kontrolliert, und anschließend in eine T75-Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Medium überführt (s. 2.1.1.2). Die Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 95% Feuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium in den Zellkulturflaschen wurde alle zwei Tage gewechselt.

Zum Einfrieren wurden die Zellen von der Zellkulturflasche abgelöst und abzentrifugiert, dann wurden sie je nach Zellzahl in 1 oder 2 ml Einfriermedium resuspendiert (eine voll bewachsene T75 Zellkulturflasche beinhaltet ca. 20 Millionen Zellen). Das Einfriermedium bestand aus 10% DMSO und 90% FCS.

2.2.3 Stimulationsexperimente

Für die Stimulationsexperimente wurden die Tumorzellen in 12-Well-Platten (je 3 Wells mit gleicher Stimulation), bzw. Petrischalen mit einer entsprechenden Zelldichte besät (150.000 Zellen /ml für die 12-Well-Platten, bzw. 200000 Zellen /ml für die 6 cm Petrischalen). Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Zelldichte unter dem Mikroskop kontrolliert. Ab einer Zelldichte von ca. 6×10^5 /ml pro Well bzw. 1×10^6 pro Petrischale konnte mit dem Hungern begonnen werden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Wells, bzw. die Petrischalen zwei Mal mit PBS (1 ml/Well, bzw. 2 ml/Petrischale) gewaschen.

Anschließend wurde ein entsprechendes Volumen an Hungermedium hinzu pipettiert (1 ml/Well, bzw. 3 ml/Petrischale) und die Zellen wurden weitere 24 Stunden im Inkubator gehungert. Am dritten Tag des Stimulationsexperiments wurden die Well-Platten bzw. die Petrischalen nochmals mit PBS gewaschen, dann wurden entsprechend der Stimulationsprotokolle die Verdünnungen hergestellt und die Zellen für 24 Stunden stimuliert. Zum Schluss wurden entweder die Zellen von den Petrischalen mit Lysepuffer lysiert und abgelöst (s. 2.3.3.) oder die Überstände aus den 12-Well-Platten in Eppendorffgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Diese konnten dann später für einen ELISA-Versuch (s. 2.4.1.) benutzt werden.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung

Um die Gesamtproteinkonzentration in den Zelllysaten zu bestimmen, wurde die BCA Methode verwendet. Die BSA-Standardreihe wurde mit dem BCATM Protein-Assay-Kit von Pierce hergestellt. Dafür wurde das 10x TBST 1:10 verdünnt und mit 0,1% Triton X-100 und 0,05% Tween-20 angesetzt, anschließend wurden davon 400 µl mit 400 µl von der BSA Standard Stocklösung (Konzentration 2 mg/ml) 1:1 verdünnt. Die Standardreihe wurde dann mit BSA-Konzentrationen zwischen 20 µg/ml und 400 µg/ml in beschrifteten Eppendorffgefäßen hergestellt. Von den einzelnen Standards wurden dann Duplets à 50 µl mit je 200 µl von einer Substratlösung, die vorher 1:50 angesetzt worden ist, in eine 96-Well Platte pipettiert.

In die Leerwert- (LW)Wells wurden ausschließlich 250 µl Substratlösung, in die Standard 0- (ST0) Wells wurden 250 µl TBSTT pipettiert. Bei K1 und K2 handelte es sich um eine Proteinlösung, die die maximal vorhandene Proteinmenge darstellen sollte. Dabei wurden 5 µl einer Precipath-Stocklösung mit 995 µl TBSTT verdünnt (K1), von dieser Lösung wurden dann 200 µl mit 800 µl TBSTT zur Herstellung von K2 verdünnt. Auch hier wurden wieder Duplets à 50 µl von K1 und K2 mit 200 µl Substratlösung in die Wells pipettiert.

Die Zelllysate wurden je 1:100 und 1:50 mit TBSTT verdünnt (1:100: 2 µl Zelllysate + 198 µl TBSTT; 1:50: 3 µl Zelllysate + 147 µl TBSTT). Dann wurden auch hier wiederum Duplets à 50 µl mit 200 µl Substratlösung in die Wells pipettiert.

Die Platte wurde anschließend 2 Stunden bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, dann wurde die Extinktion bei 550 nm gemessen. Die Proteinkonzentration für jede Probe wurde berechnet, indem die Extinktion der jeweiligen Proben mit der BSA-Standardkurve verglichen wurde.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente dem Auftrennen von Proteinen entsprechend ihrer Größe. Bei den benutzten Gelen handelte es sich um diskontinuierliche Gele nach Lämmli, die 1,5 mm dick waren und aus einem 10%-igen Dichte-, einem 10%-igen Trenn- und einem 4%-igen Sammelgel bestanden (Zusammensetzung der Gele siehe 2.1.2.5).

Das aus der Proteinbestimmung errechnete Probenvolumen wurde mit Lämmli, Mercaptoethanol und PBS angesetzt, dann 5 Minuten bei 96°C mit offenem Deckel inkubiert.

Für die Vorbereitung der Laufkammer wurde diese bis zur Mitte mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Das Gel wurde in die Laufkammer eingesetzt und der Kamm wurde entfernt. Zuerst wurden 10 µl des Markers in die erste Geltasche hinein pipettiert, dann wurden die restlichen Geltaschen mit 50 µl der jeweiligen Proben gefüllt. Der Marker diente als Längenstandard.

Zum Schluss wurde die Kammer vollständig bis zum Rand mit Puffer gefüllt und die Gelelektrophorese gestartet. Die ersten 30 Minuten wurde eine Spannung von 90 V angelegt, die restlichen 90 Minuten lief die Gelelektrophorese mit einer Spannung von 110 V. Anschließend wurde das Gel auf eine Nitrocellulose- Membran übertragen (siehe 2.3.3).

2.3.3 Immunblot-Analyse

Ziel der Immunblot-Analyse war es, den Effekt von ADAM-Inhibitoren auf die gesamtzelluläre CX₃CL1-Expression zu untersuchen. Nach einem Stimulationsexperiment wurden die Petrischalen zwei Mal mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 250 µl des Lysepuffers hinzugegeben, um die Tumorzellen zu lysieren. Der Lysepuffer wirkte einige Sekunden ein, dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und die Lösung in beschriftete Eppendorffgefäße überführt, die dann 20 Minuten auf Eis stehen gelassen wurden. Alle Schritte erfolgten auf Eis, um die schnelle Denaturierung der Proteine zu vermeiden.

Nach der 20-minütigen Inkubation wurden die Lysate 10 Sekunden mit Ultraschall behandelt und dann bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C aufbewahrt.

Nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die sich auf dem Trenngel befindenden Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Blotting-Apparatur wurde vorher gründlich mit Ethanol gereinigt, dann wurden die beiden Metallplatten mit Semi-Dry-Puffer angefeuchtet. Für eine Membran wurden 6 Filterpapiere benötigt. Sowohl die Filterpapiere als auch die Membran wurden auf 8,5 x 5,5 cm zurechtgeschnitten, anschließend wurden die Filterpapiere in Semi-Dry-Puffer gelegt. Die Nitrocellulose-Membran wurde vorher ebenfalls in Puffer gelegt. Waren die Metallplatten ausreichend befeuchtet, wurden 3 Filterpapiere, dann die Membran, dann das Trenngel und dann nochmals 3 Filterpapiere aufeinandergelegt. Mit einer Glaspipette wurden Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten weggedrückt, um eine vollständige Überführung der Proteine auf die Membran zu gewährleisten. Bei einer Membran wurde 2 Stunden lang mit einer Stromstärke von 75 mA geblottet, bei zwei Membranen wurden 150 mA für dieselbe Dauer verwendet.

Um die Vollständigkeit der Proteinübertragung zu kontrollieren, wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt.

Nun wurde die Membran mit 10 ml 5% Milch/TBST geblockt.

Nach zweistündigem Blocken wurde die Membran kurz in TBST gewaschen, dann mit dem entsprechenden Erstantikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST wurde die Membran mit dem entsprechenden Zweitantikörper für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mittels Enhanced Chemoluminescence Lösung (ECL) auf einem Autoradiografie-Film von der Firma Ernst Christiansen GmbH.

Als Beladungskontrolle wurde analog gegen GAPDH gefärbt.

2.3.4 Deglykosylierung von Proteinen

Da CX₃CL1 als intrazelluläres Vorläuferprotein synthetisiert wird und mehreren Glykosylierungsschritten unterliegt, sollte diese Glykosylierung auch in den Tumorzellen untersucht werden (Garton et al. 2001).

Das Deglykosylierungsexperiment wurde jeweils mit zwei Ansätzen durchgeführt: im ersten Ansatz sollte die Deglykosylierung stattfinden, der zweite Ansatz diente als Kontrolle, hierbei wurden die deglykosylierenden Enzyme nicht hinzugefügt.

40 µg Lysatprotein wurden dazu mit 2 µl 10x Glycoprotein Denaturing Buffer versetzt. Die Probe wurde anschließend für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert. Danach wurden der Probe 4 µl Glycobuffer-2, 4 µl 10% NP40, sowie die beiden deglykosylierenden Enzyme (4 µl Neuraminidase und 10 µl O-Glycosidase) hinzugefügt, bei einem endgültigen Volumen von 40 µl.

Als Kontrolle wurden anstatt der deglykosylierenden Enzyme 14 µl H₂O der Probe hinzugefügt.

Vor der Auftrennung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proben über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Freisetzung der löslichen Form von CX₃CL1 aus humanen SKBR3- und murinen 4T1-Mammakarzinomzellen wurde mittels ELISA gemessen. Ziel war es, die Regulation der CX₃CL1-Sekretion durch inflammatorische Chemokine (IFN- γ , TNF- α) und ADAM-Inhibitoren zu charakterisieren. Als Kontrolle wurde die CXCL10-Sekretion bestimmt, die bekanntermaßen zwar durch IFN- γ und TNF- α , nicht jedoch durch ADAM-Inhibitoren reguliert sein sollte.

Am 1. Tag wurde eine 96-Well-Platte mit dem Capture Antikörper, der 1:180 in PBS verdünnt wurde, mit 100 μ l/ Well gecoatet. Die Platte wurde mit einer Klebefolie abgeklebt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Am nächsten Morgen wurde die ELISA-Platte nach dreimaligem Waschen mit 250 μ l/ Well Blockpuffer (1% BSA/PBS) geblockt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Proben, wenn erforderlich, in 1% BSA/PBS verdünnt, und eine Verdünnungsreihe von rekombinanten murinem oder humanem CXCL10 bzw. CX₃CL1 als Standard entsprechend der Angabe hergestellt.

Nach dem Blocken erfolgte der Waschschrift ein weiteres Mal, und die Proben sowie die Standardreihe wurden mit 100 μ l pro Well auf die Platte aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden.

Nach der Inkubationszeit und nochmaligem Waschen wurde der Detection Antibody, mit 100 μ l pro Well auf die Platte aufgetragen und diese wieder zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach einem weiteren Waschschrift wurde die ELISA-Platte mit 100 μ l pro Well Streptavidin-HRP, einem Peroxidase-Konjugat, für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Dann wurde nach einem letzten Waschgang das Peroxidase-Substrat (1:1) mit 100 μ l pro Well hinzugegeben, um die Reaktion des Streptavidins zu starten. Diese ließ sich durch den blaufarbigen Umschlag der Proben in den Wells überprüfen. Nach einer maximalen Inkubation von 20 Minuten im Dunkeln wurden 50 μ l pro Well 1M H₂SO₄ als Stopplösung hinzugegeben, und die blaue Farbe schlug in gelb um.

Zum Abschluss wurde die Platte bei 450 nm gemessen.

2.4.2 Europium-Assay

Beim Europium-Assay handelt es sich um einen zellvermittelten zytotoxischen Lyse-Assay, in dem Tumorzellen mit Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zusammen inkubiert werden und die lysierten Tumorzellen durch emittierte Fluoreszenz ermittelt wurden. Der Assay lief in zwei verschiedenen Ansätzen ab und dauerte eine Woche. Am ersten Tag (Day 1) wurden die NK-Zellen aufgetaut. Für einen Assay wurden 2 Tuben mit je 20 Millionen NK-Zellen benötigt. Diese wurden zuerst bei 37 °C aufgetaut, dann in 10 ml 100% FCS resuspendiert, und schließlich 5 Minuten bei 500 RCF zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und das Zellpellet in 8 ml 10% BZM (Zusammensetzung

s. 2.1.2.5) in einem Falconröhrchen resuspendiert. Anschließend wurde die Zelllösung in eine T25 Flasche überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator aufbewahrt.

Nach ein paar Stunden wurden die NK-Zellen aus der T25-Flasche mit einer Pipette in ein Falconröhrchen überführt, ein kleiner Teil wurde 1:10 in Trypanblau verdünnt und unter dem Mikroskop gezählt. Nach dem Zählen wurden die NK-Zellen wieder abzentrifugiert und in einem bestimmten Volumen 10% BZM resuspendiert, sodass die Endkonzentration 5 Millionen Zellen pro ml betrug. Anschließend wurden die NK-Zellen in zwei Ansätze aufgeteilt und in einer 6-Well-Platte ausgesät, mit 2-4 ml pro Well. Es wurden nur 2 Wells benutzt. Die NK-Zellen im ersten Well blieben unstimuliert (1.Ansatz), die Zellen des zweiten Wells wurden mit 100 U/ml IL-2 stimuliert (2.Ansatz). Dabei wurde zuerst eine Interleukin-2-Stocklösung von 500000 U/ml auf 20.000 U/ml runterverdünnt (z.B. 10 µl Stock+ 240 µl 10% BZM). Um die finale Endkonzentration von 100 U/ml zu erhalten, wurden 5 µl IL-2 pro ml Zellsuspension hinzugegeben. Die Platte wurde dann 4 Tage (Tag 1-5) lang bei 37 °C im Inkubator aufbewahrt.

Die Ovarialkarzinomzellen wurden einem Stimulationsprotokoll entsprechend kultiviert, sodass sie am letzten Tag des Assays ausreichend stimuliert waren und benutzt werden konnten. Demzufolge wurden sie am zweiten Tag (Tag 2) in 6 cm-Petrischalen ausgesät, am dritten Tag (Tag 3) gehungert und am vierten Tag (Tag 4) stimuliert. Dabei wurden die Tumorzellen in den verschiedenen Petrischalen unterschiedlich stimuliert, sodass man vier verschiedene Targets erhielt.

Am fünften Tag (Tag 5) wurde der eigentliche Europium-Assay durchgeführt. Zuerst wurden die Tumorzellen mit EDTA von den Petrischalen abgelöst und in PBS in Falkons überführt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 4 ml Zellmedium resuspendiert. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop gezählt und das entsprechende Volumen wurde berechnet, um je 500.000 Zellen pro Target in 10 ml Eu-Medium zu überführen. Das Eu-Medium wurde danach wieder abzentrifugiert, und die Tumorzellen wurden nun mit dem Fluoreszenzstoff markiert. Dafür wurden 5 µl des DELFIABATDA Reagenz in 1000 µl Eu-Medium verdünnt, und die Tumorzellen wurden mit 200 µl davon pro Target markiert. Nun sollten die Tumorzellen in ihren Falkons bei 37 °C /5% CO₂ und mit offenem Deckel 30 Minuten lang inkubieren, dabei wurde die Zellsuspension alle 10 Minuten mit einer Pipette resuspendiert um eine homogene Markierung zu gewährleisten.

Währenddessen wurden die NK-Zellen ebenfalls aus den Wells in beschriftete Falkons überführt, dabei war ein mehrmaliges auf-und abpipettieren in den Wells notwendig, um alle Zellen abzulösen. Auch die NK-Zellen wurden gezählt und je 1.400.000 stimulierte und unstimulierte Zellen wurden in ein neues Falcon überführt und bei 330 RCF 5 Minuten lang abzentrifugiert, dann wurden sie in 2,8 ml Eu-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension war Ausgangspunkt für die Verdünnungsreihe der NK-Zellen:

10:1	1.400.000 Zellen in 2,8 ml resuspendiert
5:1	1,4 ml der 10:1 Verdünnung+ 1,4 ml Eu-Medium
2,5:1	1,4 ml der 5:1 Verdünnung+ 1,4 ml Eu-Medium
1,25:1	1,4 ml der 2,5:1 Verdünnung+ 1,4 ml Eu-Medium
0,6:1	1,4 ml der 1,25:1 Verdünnung+ 1,4 ml Eu-Medium
0,3:1	1,4 ml der 0,6:1 Verdünnung+ 1,4 ml Eu-Medium

Nach dem Labeling wurden die Tumorzellen drei Mal mit 10 ml Eu-Medium und Stabilisator gewaschen, um Überreste des nicht aufgenommenen Fluoreszenzstoffes zu entfernen. Außerdem sollte der Stabilisator dem frühzeitigen Zerfall der Tumorzellen entgegenwirken. Das Eu-Medium wurde dabei nach jedem Waschgang 3 Minuten bei 450 RCF abzentrifugiert und verworfen, und die Tumorzellen wurden dann erneut in 10 ml Eu-Medium resuspendiert.

Dann wurden die 96-Well-V-Bottom Platten nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 7: Pipettierschema Eu-Assay.

Target					
<i>unstimuliert</i>			<i>stimuliert</i>		
10:1	10:1	10:1	10:1	10:1	10:1
5:1	5:1	5:1	5:1	5:1	5:1
2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1
1,25:1	1,25:1	1,25:1	1,25:1	1,25:1	1,25:1
0,6:1	0,6:1	0,6:1	0,6:1	0,6:1	0,6:1
0,3:1	0,3:1	0,3:1	0,3:1	0,3:1	0,3:1
blank	blank	blank			
spontan	spontan	spontan	Maximum	Maximum	Maximum

Die Verdünnungsreihe der NK-Zellen wurde dabei zuerst aufgetragen, mit je 100 µl pro Well. Anschließend wurden die Tumorzellen mit ebenfalls 100 µl pro Well hinzugegeben. Der Leerwert (blank) stellte sich aus 100 µl Eu-Medium mit und 100 µl Eu-Medium ohne Stabilisator zusammen, beim Spontanwert handelte es sich um den spontanen Zerfall der Tumorzellen. Hier wurden 100 µl der Tumorzellsuspension mit 100 µl Eu-Medium ohne Stabilisator hinzugegeben. Der Maximalwert stellte den maximal möglichen Zellzerfall dar, und wurde durch Hinzufügen von 100 µl 2% Triton X-100 zu 100 µl Tumorzellsuspension erreicht. Hier war ein mehrmaliges auf- und abpipettieren erforderlich.

Danach wurde die Platte 3 Minuten bei 300 RPM zentrifugiert und für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Währenddessen wurde eine ELISA-Platte vorbereitet, indem 200 µl pro Well von der Europium-Solution (Zusammensetzung s. 2.1.2.6) hineinpipettiert wurden.

Nach der vierstündigen Inkubation wurde die Platte 30 Sekunden geschüttelt, und in den Maximalwert-Wellen wurde noch mal auf- und abpipettiert, dann wurde die Platte nochmals für 3 Minuten bei 300 RPM in die Zentrifuge gestellt. Dann wurden 25 µl pro Well des Überstands von der 96-Well-V-Bottom-Platte in das entsprechende Well der vorbereiteten ELISA-Platte mit der Europium-Solution überführt. Nun wurde die Platte für 10 bis 15 Minuten auf dem Rotator geschüttelt und mit dem Europium-Programm im Victor Reader gelesen

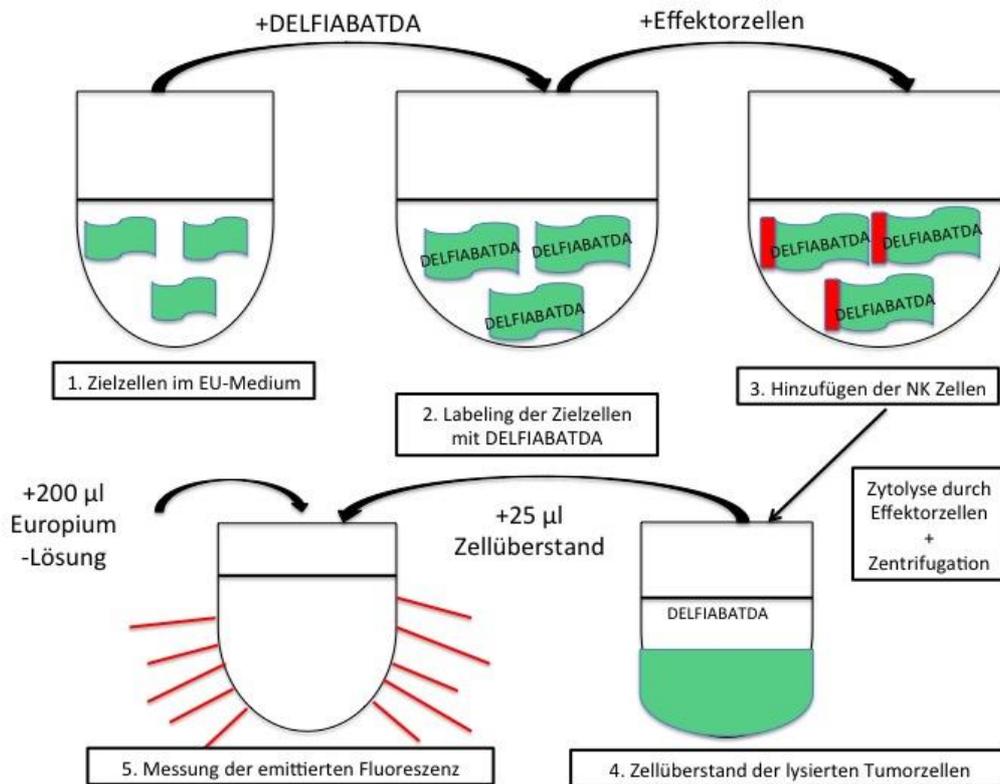


Abbildung 7: Funktionsprinzip des Europium-Assays, (modifiziert nach BMG Labtech).

3 Ergebnisse

3.1 Expression von hCX₃CL1 in SKBR3-Zellen

3.1.1 Induktion von sezerniertem hCX₃CL1 durch hIFN- γ und hTNF- α

Laut Literatur zählen TNF- α und IFN- γ zu den stärksten Induktoren einer CX₃CL1-Produktion in Tumorzellen (Baggiolini et al. 1994). Aus diesem Grund bestand der erste Schritt darin zu analysieren, wie groß der Effekt von TNF- α und IFN- γ auf die hCX₃CL1-Sekretion in Mammakarzinomzellen ist. Die humanen SKBR3-Zellen wurden anfangs mit unterschiedlichen Konzentrationen an hTNF- α und hIFN- γ stimuliert. Sowohl für hTNF- α als auch für hIFN- γ wurde mit einer Konzentration von 1 ng/ml gestartet und dann auf 10 ng/ml und 50 ng/ml erhöht. Als Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit 0,1% BSA/PBS stimuliert, um zu analysieren, ob bereits eine hCX₃CL1-Produktion in Ruhe, also ohne Zytokinstimulation besteht. Die Konzentration sezernierten hCX₃CL1 wurde mittels ELISA gemessen. Abbildung 8 fasst die Ergebnisse der drei Stimulationsversuche zusammen und zeigt eine kontinuierliche Steigerung der hCX₃CL1-Produktion in Abhängigkeit von der Zytokinkonzentration. Dies war sowohl für hTNF- α als auch für hIFN- γ zu beobachten. Der Unterschied zwischen den hCX₃CL1-Produktionen war zum Teil auch signifikant, wie z.B. zwischen hTNF- α 1 ng/ml und hTNF- α 10 ng/ml oder zwischen hIFN- γ 1 ng/ml und hIFN- γ 10 ng/ml.

Außerdem zeigte sich, dass eine gleichzeitige Stimulation mit hTNF- α (10 ng/ml) und hIFN- γ (10 ng/ml) synergistisch hinsichtlich der hCX₃CL1-Sekretion war. In der Tat war diese um 53,7% höher als die isolierte Stimulation mit hTNF- α 10 ng/ml bzw. um 63,0% höher als die isolierte Stimulation mit hIFN- γ 10 ng/ml. Diese Steigerung der hCX₃CL1-Sekretion bei einer simultanen Zytokinstimulation war auch signifikant höher verglichen mit einer einzelnen Stimulation mit hTNF- α 50 ng/ml bzw. hIFN- γ 50 ng/ml. Ohne jegliche Zytokinwirkung (Stimulationen mit 0,1% BSA/PBS) dagegen produzierten die Tumorzellen nahezu gar kein hCX₃CL1, sodass es auch hier einen signifikanten Unterschied zwischen den Stimulationen mit 0,1% BSA/PBS und hTNF- α bzw. hIFN- γ nachgewiesen werden konnte.

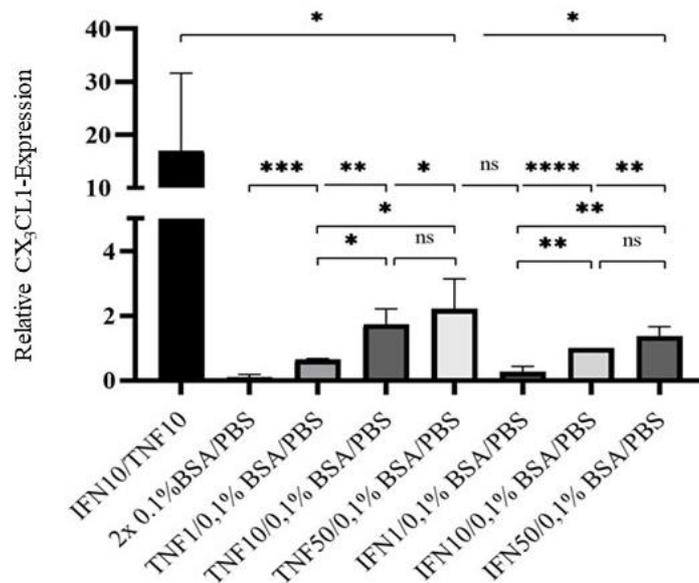


Abbildung 8: Lösliches hCX₃CL1 in Überständen von SKBR3-Zellen, stimuliert mit hTNF- α bzw. hIFN- γ , relativ bezogen auf IFN 10/0,1% BSA/PBS.

Die Erhöhung der Konzentrationen der Zytokine führte ebenfalls zu einer zum Teil auch signifikanten Erhöhung der hCX₃CL1-Produktion (positive Korrelation). Die simultane Stimulation mit hTNF- α 10 ng/ml /hIFN- γ 10 ng/ml zeigte zudem einen deutlich synergistischen Effekt und war signifikant höher bezogen auf die einzelnen Stimulationen mit hTNF- α (50 ng/ml) und hIFN- γ (50 ng/ml).

3.1.2 Einfluss von ADAM-Inhibitoren auf die lösliche hCX₃CL1-Sekretion

Garton et al. sowie Hundhausen et al. haben beschrieben, dass die beiden Proteasen ADAM10 und ADAM17 das Cleavage von membranständigem CX₃CL1 vermitteln können (Garton et al. 2001; Hundhausen et al. 2003). Durch Verwendung geeigneter ADAM-Inhibitoren sollte eine solche Regulation erstmalig auch in Tumorzellen untersucht und die Expression der membranständigen Form gezeigt werden.

Für die folgenden Regulationsexperimente wurde basierend auf den oben beschriebenen Vorversuchen hIFN- γ mit 10 ng/ml und hTNF- α mit 1 ng/ml eingesetzt. Da die ADAM-Proteasen 10 und 17 bereits als Sheddasen für hCX₃CL1 identifiziert worden sind, wurden dementsprechend ADAM10- und ADAM17-Inhibitoren benutzt. In den Abbildungen 9 und 10 zeigt sich eine signifikante Senkung des löslichen hCX₃CL1 bei den Stimulationen mit den ADAM10 und ADAM17-Inhibitoren. Dies war sowohl für die Stimulationen mit hTNF- α als auch mit hIFN- γ zu beobachten. So führte TAPI-2 (v.a. ein ADAM17-Inhibitor) verglichen mit der Kontrolle H₂O zu einer Reduktion des durch hIFN- γ freigesetzten hCX₃CL1 um 78,6% und um 65,2% im Falle einer hTNF- α -Stimulation. Der ADAM10-Inhibitor GI254 senkte das lösliche hCX₃CL1 verglichen mit der Kontrolle DMSO um 71,9% bei der

Stimulation mit hIFN- γ und um 61,8% bei der Stimulation mit hTNF- α . Der Effekt der ADAM-Inhibitoren war sogar nachweisbar, wenn nicht mit hIFN- γ oder hTNF- α stimuliert wurde. Auch hier wurde die Menge an löslichem hCX₃CL1, allerdings nicht signifikant, gesenkt.

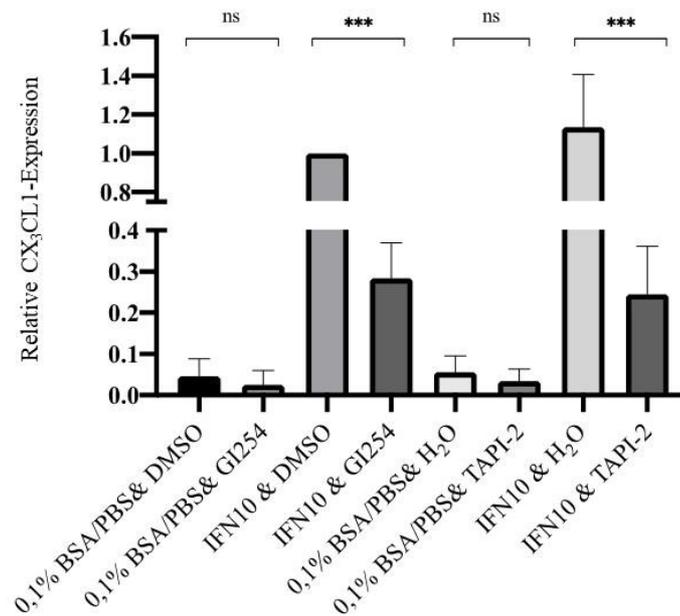


Abbildung 9: Lösliches hCX₃CL1 in SKBR3-Überständen, die für 24 h mit hIFN- γ 10 ng/ml und ADAM-Inhibitoren inkubiert worden waren.

Als Kontrollen für die ADAM-Inhibitoren wurden DMSO für GI254 und H₂O für TAPI-2 verwendet, für das Zytokin wiederum 0,1% BSA/PBS. TAPI-2 wurde mit 50 μ M, GI254 mit 5 μ M eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Relation zu hIFN- γ 10 ng/ml /DMSO angegeben. Es zeigt sich ein hoch-signifikanter Unterschied bezüglich der löslichen hCX₃CL1-Menge zwischen der Stimulation mit den ADAM-Inhibitoren und ihren Kontrollen für die Stimulation mit hIFN- γ 10 ng/ml ($p < 0,001$ (***) in beiden Fällen). Bei den Stimulationen mit 0,1% BSA/PBS war der Unterschied bezüglich der löslichen hCX₃CL1-Menge zwischen den jeweiligen ADAM-Inhibitoren und ihren Kontrollen jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

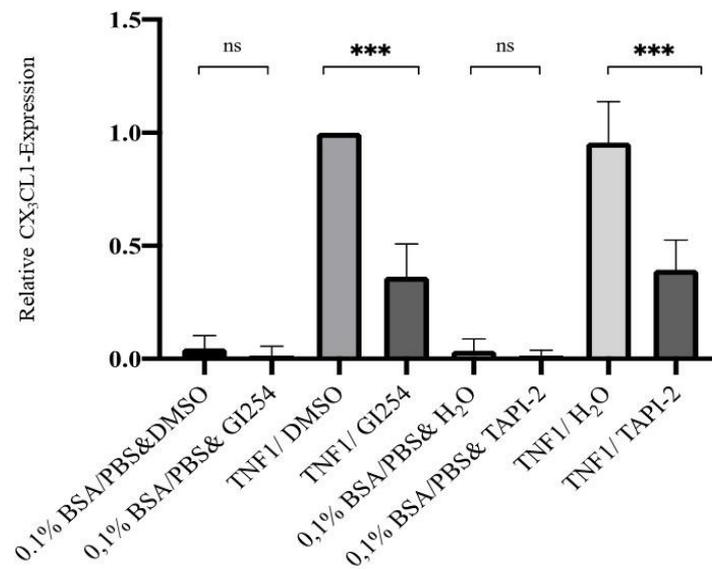


Abbildung 10: Lösliches hCX₃CL₁ in SKBR3-Überständen, die für 24 h mit hTNF- α 1 ng/ml und ADAM-Inhibitoren inkubiert worden waren.

Die Konzentrationen von DMSO, TAPI-2 und GI254 waren die gleichen wie zuvor in Abbildung 9. Die Ergebnisse sind in Relation zu hTNF- α 1 ng/ml/DMSO angegeben. Es zeigt sich ein hoch-signifikanter Unterschied bezüglich der löslichen hCX₃CL₁-Menge zwischen der Stimulation mit den ADAM-Inhibitoren und ihren Kontrollen für die Stimulation mit hTNF- α 1 ng/ml ($p < 0,001$ (***) in beiden Fällen). Bei den Stimulationen mit 0,1% BSA/PBS war der Unterschied bezüglich der löslichen hCX₃CL₁-Menge zwischen den jeweiligen ADAM-Inhibitoren und ihren Kontrollen jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.1.3 Einfluss von ADAM-Inhibitoren auf die lösliche hCXCL10-Sekretion

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob der Effekt von ADAM10- und ADAM17-Inhibitoren auf die INF- γ - und TNF- α -vermittelte CX₃CL₁-Sekretion spezifisch ist, d.h. nicht eine generelle Suppression des Einflusses inflammatorischer Zytokine durch TAPI-2 und GI254 verursacht wird, sondern ein spezifischer Einfluss auf das Shedding. Zu diesem Zweck wurde ein weiteres gut durch IFN- γ und TNF- α in Karzinomzellen induzierbares Chemokin, CXCL10, in den Zellüberständen der unter 3.1.2. gezeigten Experimente mittels ELISA bestimmt. CXCL10 wird ausschließlich als lösliches, nicht wie CX₃CL₁ als zuvor membranständiges Chemokin synthetisiert. Abbildung 11 zeigt die lösliche hCXCL10-Produktion in den SKBR3-Überständen nach einer Stimulation mit hIFN- γ und ADAM-Inhibitoren. Sowohl zwischen DMSO (Kontrolle) und dem ADAM10-Inhibitor (GI254) als auch zwischen H₂O (Kontrolle) und dem ADAM17-Inhibitor (TAPI-2) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Sekretion löslichen hCXCL10. Die gleiche Beobachtung konnte für die Stimulationen mit hTNF- α und den jeweiligen ADAM-Inhibitoren gemacht werden (s. Abbildung 12).

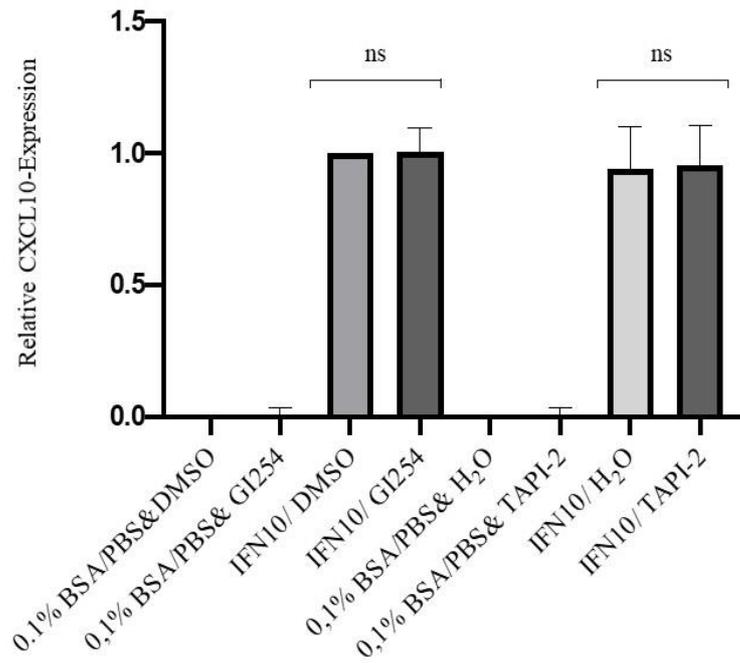


Abbildung 11: Lösliches hCXCL10 in SKBR3-Überständen, die für 24h mit hIFN- γ 10 ng/ml und ADAM-Inhibitoren inkubiert worden waren.

Die Konzentrationen von DMSO, TAPI-2 und GI254 waren die gleichen wie in Abbildung 9 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Relation zu hIFN- γ 10 ng/ml /DMSO dargestellt. Die lösliche hCXCL10-Produktion ohne Zytokinstimulation konnte hierbei vernachlässigt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der löslichen hCXCL10-Menge, $p > 0,05$ in beiden Fällen.

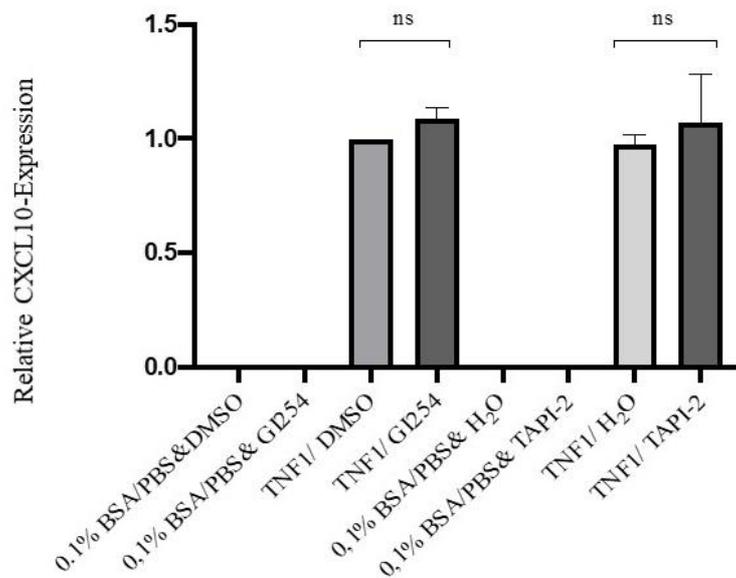


Abbildung 12: Lösliches hCXCL10 in SKBR3-Überständen, die für 24h mit hTNF- α 1 ng/ml und ADAM-Inhibitoren inkubiert worden waren.

Die Konzentrationen von DMSO, TAPI-2 und GI254 waren die gleichen wie in Abbildung 9 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Relation zu hTNF- α 1 ng/ml/DMSO dargestellt. Die lösliche hCXCL10-Produktion ohne Zytokinstimulation konnte hierbei vernachlässigt werden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der löslichen hCXCL10-Menge, $p > 0,05$ in beiden Fällen.

3.1.4 Einfluss von ADAM-Inhibitoren auf das gesamtzelluläre hCX₃CL1 in SKBR3-Zellen

In 3.1.2. wurde gezeigt, dass eine Inhibition der ADAM-Proteasen die lösliche hCX₃CL1-Menge signifikant senkt. Demnach ist anzunehmen, dass die Hemmung des hCX₃CL1-Cleverages ebenfalls zu einer Erhöhung der intrazellulären, bzw. membranständigen Form von hCX₃CL1 führt. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden die SKBR3-Zellen in Petrischalen mit dem Zytokin hTNF- α 10 ng/ml und den ADAM-Inhibitoren TAPI-2 und GI254 stimuliert, anschließend wurden die Zelllysate mittels Western Blots hinsichtlich der hCX₃CL1-Expression untersucht. In den Western Blots wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale hCX₃CL1-Antikörper benutzt. Mit dem monoklonalen Antikörper konnte kein sichtlicher Unterschied in der intrazellulären hCX₃CL1-Menge gefunden werden. Mit dem polyklonalen Antikörper fand sich jedoch ein Unterschied in der hCX₃CL1-Produktion. Abbildung 13 zeigt, dass die Hemmung der ADAM-Proteasen in der Tat zu einer Erhöhung des gesamtzellulären hCX₃CL1 führte. Für jede Reihe konnte eine hCX₃CL1-Produktion nachgewiesen werden, wobei die Menge an hCX₃CL1 in den Reihen 4 und 8, die der Stimulation mit hTNF- α und dem

ADAM10- bzw. ADAM17-Inhibitor entsprechen, am höchsten war. Hier waren die hCX₃CL1-Banden bei 90kDa am stärksten ausgeprägt.

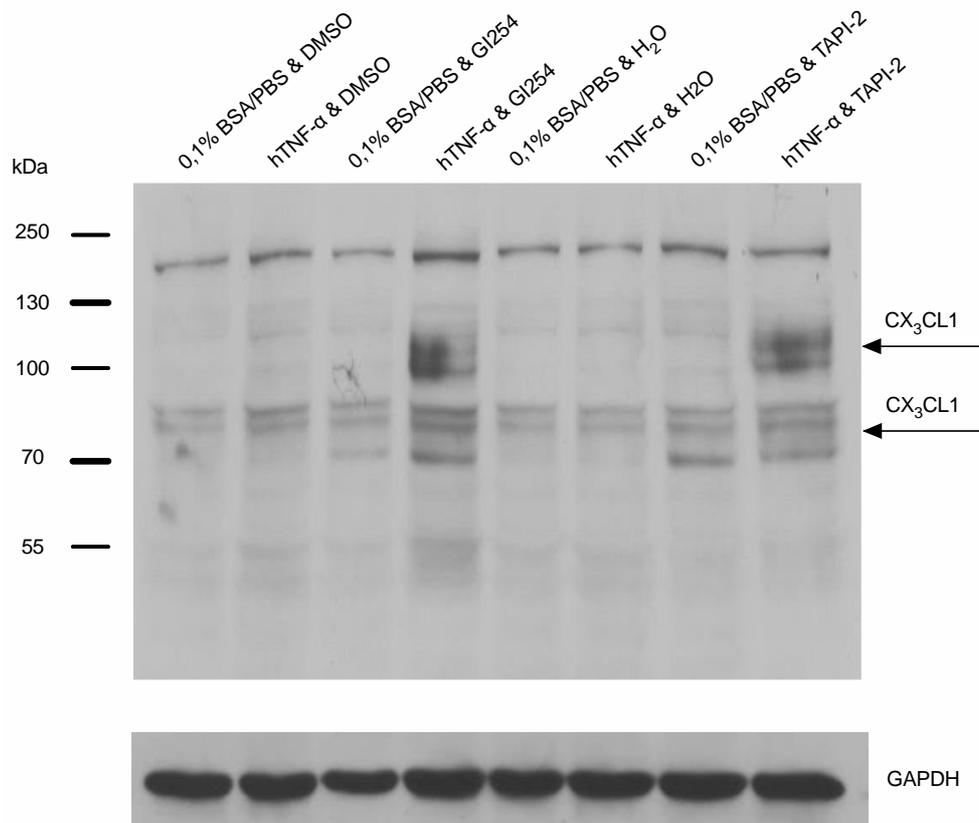


Abbildung 13: hCX₃CL1 in SKBR3-Zelllysaten, stimuliert mit hTNF-α 10 ng/ml und ADAM-Protease-Inhibitoren. Die Nitrocellulose-Membran wurde mit polyklonalem CX₃CL1-Antikörper inkubiert. Als Kontrolle für die ADAM-Inhibitoren wurde DMSO und H₂O genommen, für hTNF-α wiederum 0,1% BSA/PBS. Die eingesetzte Konzentration vom ADAM17-Inhibitor TAPI-2 war 50 μM und die vom ADAM10-Inhibitor GI254 war 5 μM. Die Reihen 1 und 5 zeigen die Stimulation mit 0,1% BSA/PBS und der Kontrolle zum jeweiligen ADAM-Inhibitor, die Reihen 2 und 6 die Stimulation mit hTNF-α und der Kontrolle zum ADAM-Inhibitor, die Reihen 3 und 7 die Stimulation mit 0,1% BSA/PBS und dem ADAM10- bzw. ADAM17-Inhibitor und die Reihen 4 und 8 die Stimulation mit hTNF-α und dem ADAM10- bzw. ADAM17-Inhibitor. Ferner sind durch die ADAM Inhibition in den Reihen 4 und 8 neue hCX₃CL1-Banden hinzugekommen. Vor allem die Banden bei 100 kDa und 90 kDa sind deutlich stärker ausgeprägt. Hierbei handelt es sich a.e. um das membranständige hCX₃CL1. In der Tat wird dieses, dadurch dass die Metalloproteasen gehemmt werden, weniger abgespalten und tritt entsprechend im Zelllysate vermehrt auf.

3.1.5 Molekulargewicht von hCX₃CL1 und Deglykosylierungsassay

In 3.1.4. wurde der Effekt der ADAM-Inhibition auf die gesamtzelluläre hCX₃CL1-Expression besprochen und gezeigt, dass diese bei einer Stimulierung der SKBR3-Zellen mit ADAM10- und ADAM17-Inhibitoren ansteigt. Allerdings zeigten sich hierbei verschiedene Banden, so dass nun geprüft werden sollte, ob es sich dabei um unspezifische Färbungen des verwendeten polyklonalen Antikörpers handelte oder aber einfach um Vorläuferstufen intrazellulären CX₃CL1.

Um das Molekulargewicht von hCX₃CL1 experimentell zu überprüfen und mit den Angaben in der Literatur vergleichen zu können, wurden weitere Western Blots mit rekombinantem humanem CX₃CL1 und SKBR3-Zelllysaten, bei denen die Tumorzellen ausschließlich mit hTNF- α , bzw. mit hTNF- α und ADAM-Inhibitoren stimuliert worden waren, durchgeführt. Für das rekombinante hCX₃CL1 wurde dabei der vom Hersteller mitgelieferte Standard des verwendeten ELISA-Kits benutzt. Dieser hatte eine Ausgangskonzentration von 300 ng/ml, wurde aber für den Westernblot 1:10 in PBS verdünnt.

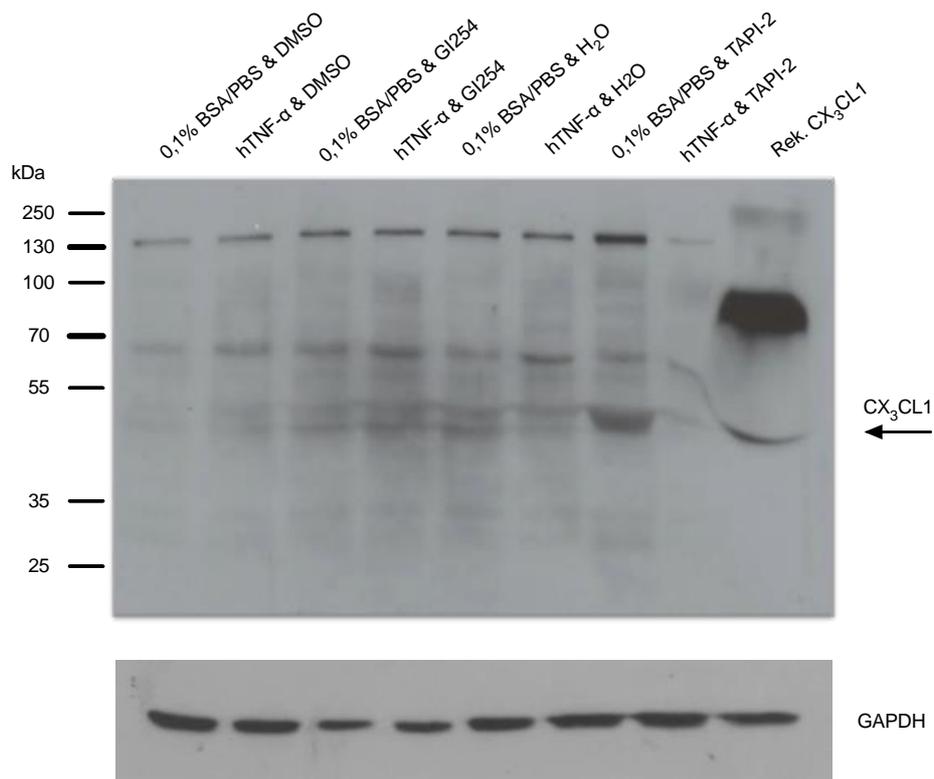


Abbildung 14: hCX₃CL1 in SKBR3-Zelllysaten, stimuliert mit hTNF- α 10 ng/ml und ADAM-Protease-Inhibitoren, sowie rekombinantes humanes CX₃CL1.

Die Nitrocellulose-Membran wurde mit polyklonalem CX₃CL1-Antikörper (1:1000) inkubiert. Die Stimulationen der Reihen 1-8 entsprachen denen des Western Blots der Abbildung 13. Reihe 9 enthielt das rekombinante CX₃CL1. Auch hier sind für alle Reihen mehrere hCX₃CL1 Banden zu erkennen. Die

ausgeprägtesten Banden befinden sich bei 100-90 kDa, 70 kDa und 50 kDa, was den jeweiligen Reifungsschritten von CX₃CL1 entspricht. (Garton et al. 2001) Zusätzlich schienen hier die Stimulationen mit hTNF- α und dem ADAM10-Inhibitor (Reihe 4) sowie mit dem ADAM17-Inhibitor und 0,1% BSA/PBS (Reihe 7) die größte Menge an hCX₃CL1 hervorzubringen.

Des Weiteren wurde ein Deglykosylierungsassay durchgeführt. Wie bereits oben beschrieben, unterliegt CX₃CL1 zahlreichen Glykosylierungsschritten. Ziel dieser Methode war es, mit einem Enzym die Glykosylierungsketten von CX₃CL1 abzuschneiden, damit am Ende nur die Peptidomäne von CX₃CL1 übrigblieb. Laut Literatur sollte das deglykosylierte CX₃CL1 ein Molekulargewicht von 50 kDa haben (Garton et al. 2001).

Der Deglykosylierungsassay wurde mit drei verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde die Probe komplett unbehandelt eingesetzt, im zweiten Ansatz wurde die Probe mit den deglykosylierenden Enzymen O-Glucosidase und Neuraminidase inkubiert und im dritten Ansatz wurden die gleiche Probe anstatt der deglykosylierenden Enzymen mit H₂O (s. 2.3.4) als Kontrolle zur Deglykosylierung behandelt. Abbildung 15 zeigt den Western Blot dieses Deglykosylierungsexperimentes.

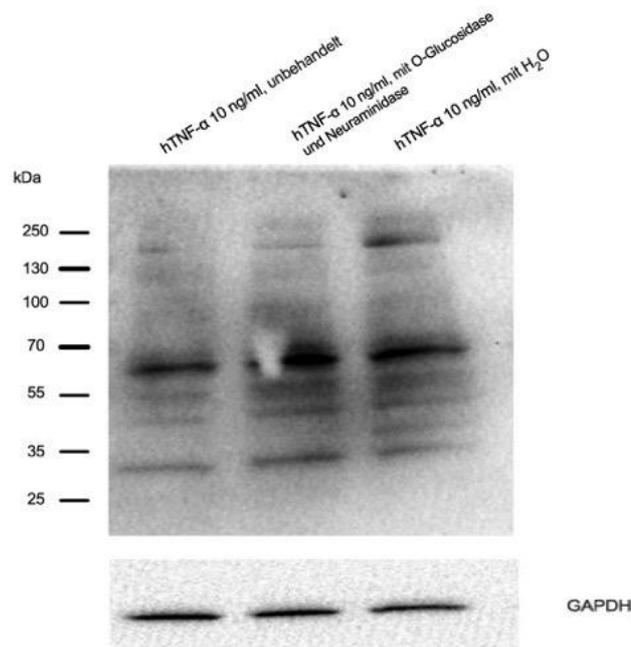


Abbildung 15: hCX₃CL1 in SKBR3-Zelllysaten, stimuliert mit hTNF- α 10 ng/ml sowie die GAPDH-Kontrolle.

Reihe 1 zeigt die unbehandelte Probe, stimuliert mit hTNF- α 10 ng/ml. Reihe 2 zeigt die gleiche Probe, behandelt mit den deglykosylierenden Enzymen O-Glucosidase und Neuraminidase. Reihe 3 zeigt die gleiche Probe, behandelt mit H₂O (s. 2.3.4) als Kontrolle zur Deglykosylierung.

3.2 Expression von mCX₃CL1 in 4T1-Zellen

3.2.1 Induktion von sezerniertem mCX₃CL1 durch mTNF- α und mIFN- γ

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die obigen mit der SKBR3-Zelllinie erzielten Resultate in einer murinen Zelllinie zu reproduzieren. Aus diesem Grund wurden murine tripel-negative 4T1-Zellen nach gleichem Schema stimuliert, unter Verwendung der entsprechenden murinen Zytokine mTNF- α und mIFN- γ . Die Experimente wurden jeweils dreimal durchgeführt und das murine mCX₃CL1 im Zellüberstand unter Verwendung des entsprechenden ELISA-Kits gemessen.

Im Unterschied zur humanen SKBR3-Zelllinie produzierten 4T1-Zellen bereits ohne Stimulation mCX₃CL1 in großen Mengen. Während die SKBR3-Zellen ohne Stimulation weniger als 0,5 ng/ml an hCX₃CL1 produzierten, betrug die Absolutkonzentration von mCX₃CL1 bei den 4T1-Zellen unter gleichen Versuchsbedingungen etwa 6 ng/ml (s. Abbildung 16). Des Weiteren führte die Stimulation mit mTNF- α zu keiner signifikanten Induktion löslichen mCX₃CL1. So war die Menge an mCX₃CL1 des mit 0,1% BSA/PBS (ca. 6 ng/ml) stimulierten Ansatzes ungefähr so hoch wie die hCX₃CL1-Menge der Stimulation mit hTNF- α 50 ng/ml (ca. 6,3 ng/ml), und es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Stimulationen ($p > 0,05$). Die Erhöhung der mTNF- α -Konzentration führte ebenfalls zu keiner signifikanten Steigerung der mCX₃CL1-Produktion.

IFN- γ dagegen, wie bei den SKBR3-Zellen auch, induzierte die Sekretion des löslichen mCX₃CL1. So führte die Stimulation mit mIFN- γ 50 ng/ml zu einer Produktion von 11,9 ng/ml mCX₃CL1. Insgesamt zeigte sich hier sowohl ein signifikanter Unterschied zwischen den Stimulationen mit 0,1% BSA/PBS und mIFN- γ 10 ng/dl, bzw. mIFN- γ 50 ng/dl, als auch teilweise zwischen den einzelnen Stimulationen mit mIFN- γ (zB. $p = *$ zwischen mIFN- γ 1 ng/dl und mIFN- γ 50 ng/dl).

Ein synergistischer Effekt von mTNF- α und mIFN- γ 10 ng/ml wie bei den SKBR3-Zellen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, und es konnte hierbei auch kein signifikanter Unterschied zwischen mIFN- γ 10/mTNF- α 10 und mIFN- γ 50 ng/ml bzw. mTNF- α 50 ng/ml gefunden werden. Eine Stimulation mit beiden Zytokinen zusammen führte zur Bildung von nur 8,5 ng/ml mCX₃CL1, also zu weniger als die Stimulation mit mIFN- γ 50 ng/ml allein. Insgesamt zeigte sich also eine schwache Induktion durch inflammatorische Zytokine in den 4T1-Zellen, und dies vor allem durch mIFN- γ .

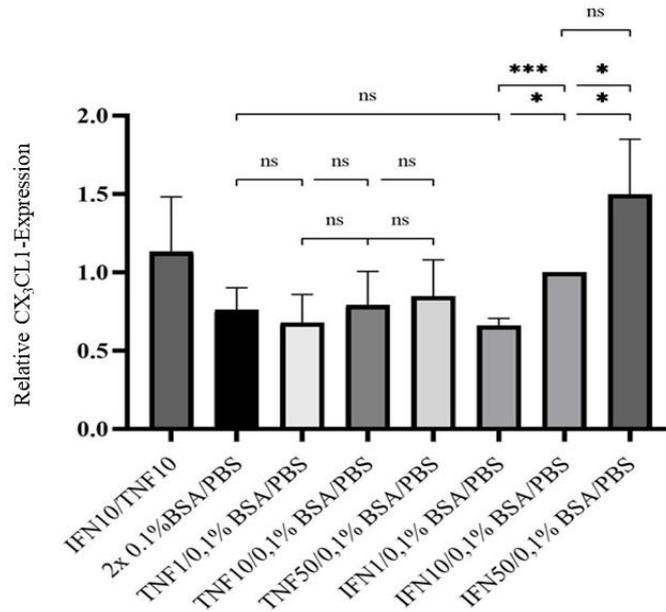


Abbildung 16: Lösliches mCX_3CL1 in Überständen von 4T1-Zellen, stimuliert mit $mTNF-\alpha$ bzw. $mIFN-\gamma$, relativ bezogen auf $IFN10/0,1\%$ BSA/PBS.

Die Erhöhung der Konzentrationen der Zytokine führte anders als bei den SKBR3 Zellen nur bei den Stimulationen mit $mIFN-\gamma$ ebenfalls signifikanten Erhöhung der mCX_3CL1 -Produktion (positive Korrelation). Die simultane Stimulation mit $mTNF-\alpha$ 10 ng/ml / $mIFN-\gamma$ 10 ng/ml zeigte hier jedoch keinen synergistischen Effekt.

3.2.2 Einfluss von ADAM-Inhibitoren auf die lösliche mCX_3CL1 -Sekretion

Nach der Stimulationsversuchsreihe mit $mTNF-\alpha$ und $mIFN-\gamma$ haben sich die Experimente mit den ADAM-Protease-Inhibitoren angeschlossen. Es wurde eine Konzentration von 10 ng/ml für beide Zytokine ausgewählt. Die 4T1-Zellen wurden auch hier nach den gleichen Stimulationsprotokollen behandelt wie die SKBR3-Zellen. Bei den ADAM-Inhibitoren wurde nicht zwischen murin und human unterschieden, bei beiden Zelllinien wurden die gleichen Substanzen benutzt. (Andrzejewski et al. 2010) Die mCX_3CL1 -Konzentrationen im Zellüberstand wurden anschließend mittels murinem mCX_3CL1 -ELISA quantifiziert.

In den Abbildungen 17 und 18 werden die Beobachtungen, die unter 3.2.1. gemacht worden sind, noch einmal bestätigt: bereits in Ruhe produzierten die 4T1-Zellen eine gewisse Menge an mCX_3CL1 und die Stimulation mit $mIFN-\gamma$ 10 ng/ml führte zu einer Erhöhung des löslichen mCX_3CL1 . Ebenso fand sich kein Unterschied zwischen der Stimulation mit $mTNF-\alpha$ 10 ng/ml und 0,1% BSA/PBS bezüglich der mCX_3CL1 -Menge. Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Abfall des löslichen mCX_3CL1 bei der Stimulation mit den ADAM-Protease-Inhibitoren. So senkten GI254 und TAPI2 die lösliche mCX_3CL1 -Menge um jeweils 60,3% und 56,6% bei einer Stimulation mit $mIFN-\gamma$ 10 ng/ml, sowie um jeweils 59,4% und 55,1% bei einer Stimulation mit $mTNF-\alpha$ 10 ng/ml. Die gleiche Beobachtung konnte

bei der Stimulation mit 0,1% BSA/PBS gemacht werden. Diese Resultate untermauern die Ergebnisse von 3.1.2.: Sowohl in murinen als auch in humanen Mammakarzinomzellen wurde das lösliche, sezernierte CX₃CL1 durch eine ADAM-Inhibition gesenkt.

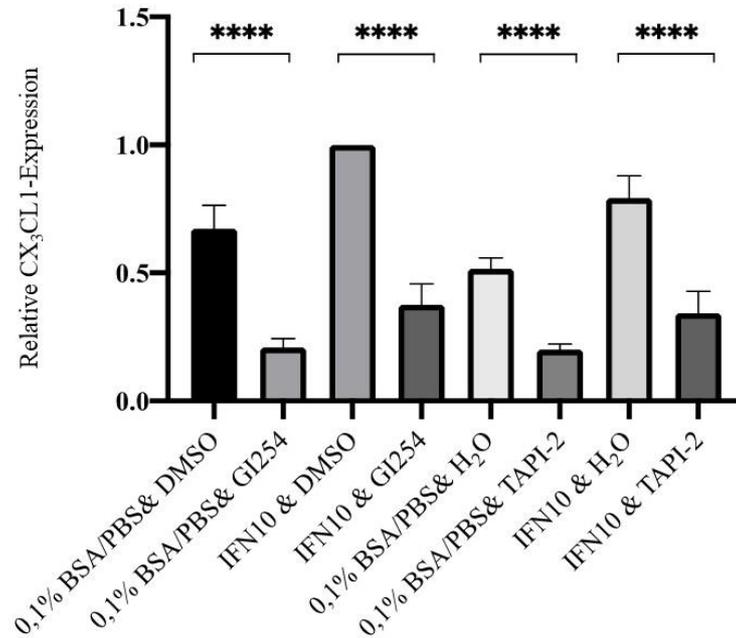


Abbildung 17: Lösliches mCX₃CL1 in 4T1-Überständen, die für 24 h mit mIFN- γ 10 ng/ml und ADAM-Inhibitoren inkubiert worden waren.

Als Kontrollen für die ADAM-Inhibitoren wurden DMSO für GI254 und H₂O für TAPI-2 verwendet, für das Zytokin wiederum 0,1% BSA/PBS. TAPI-2 wurde mit 50 μ M, GI254 mit 5 μ M eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Relation zu IFN- γ 10 ng/ml /DMSO dargestellt. Es zeigte sich ein hoch-signifikanter Unterschied bezüglich der löslichen mCX₃CL1-Menge zwischen der Stimulation mit den ADAM-Inhibitoren und ihren Kontrollen, dies sowohl für 0,1% BSA/PBS als auch für IFN- γ 10 ng/ml ($p < 0,0001$ (****)).

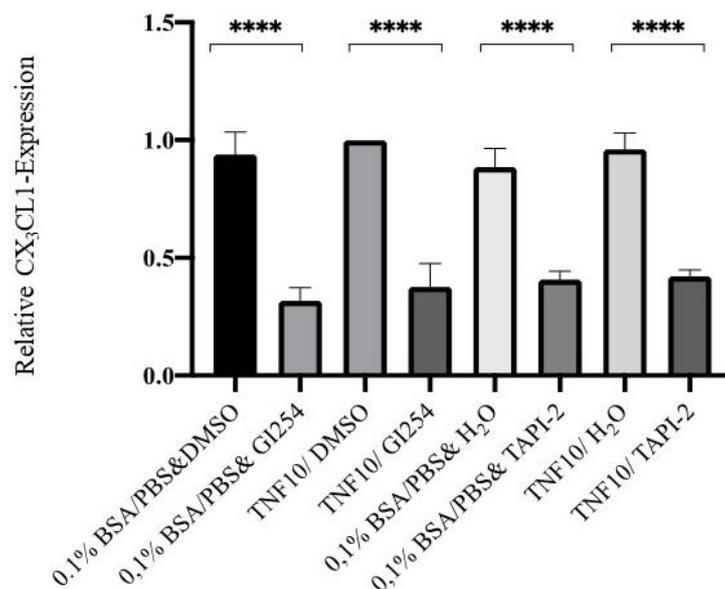


Abbildung 18: Lösliches mCX₃CL1 in 4T1-Überständen, die für 24 h mit mTNF- α 10 ng/ml und ADAM-Inhibitoren inkubiert worden waren.

Die Konzentrationen von DMSO, TAPI-2 und GI254 waren die gleichen wie in Abbildung 17 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Relation zu mTNF- α 10 ng/ml /DMSO dargestellt. Auch hier zeigte sich ein hoch-signifikanter Unterschied bezüglich der löslichen mCX₃CL1-Menge zwischen der Stimulation mit den ADAM-Inhibitoren und ihren Kontrollen, dies sowohl für 0,1% BSA/PBS als auch für mTNF- α 10 ng/ml ($p < 0,0001$ (****) in allen Fällen).

3.2.3 Einfluss von ADAM- Inhibitoren auf die lösliche mCXCL10-Sekretion

In 3.2.2. wurde die lösliche mCX₃CL1-Menge im ELISA durch eine Hemmung der ADAM-Proteasen signifikant gesenkt. Um die Spezifität dieses Effekts weiter zu untermauern, wurden die Zellüberstände hinsichtlich der Sekretion von mCXCL10, einem nicht durch ADAM-Proteasen geschnittenen und freigesetzten Chemokin, untersucht. Dies geschah erneut unter Verwendung entsprechender kommerzieller mCXCL10-ELISAs.

In den hCXCL10-ELISAs mit den Überständen der SKBR3-Zellen in 3.1.3. konnte ein solcher Effekt der ADAM-Proteasen bereits ausgeschlossen werden, die Abbildungen 19 und 20 bestätigen diese Beobachtung für die murinen Mammakarzinomzellen. So zeigte sich kein signifikanter Abfall oder Anstieg in der löslichen mCXCL10-Menge in Bezug auf eine ADAM-Inhibition. In der Tat blieben die mCXCL10-Mengen für die jeweiligen Stimulationen mit 0,1% BSA/PBS, mTNF- α oder mIFN- γ gleich hoch. Die Ergebnisse von 3.1.3. werden durch diese Resultate untermauert. Sowohl in murinen als auch in humanen Mammakarzinomzellen zeigte sich kein Effekt der ADAM-Inhibition auf die lösliche CXCL10-Produktion.

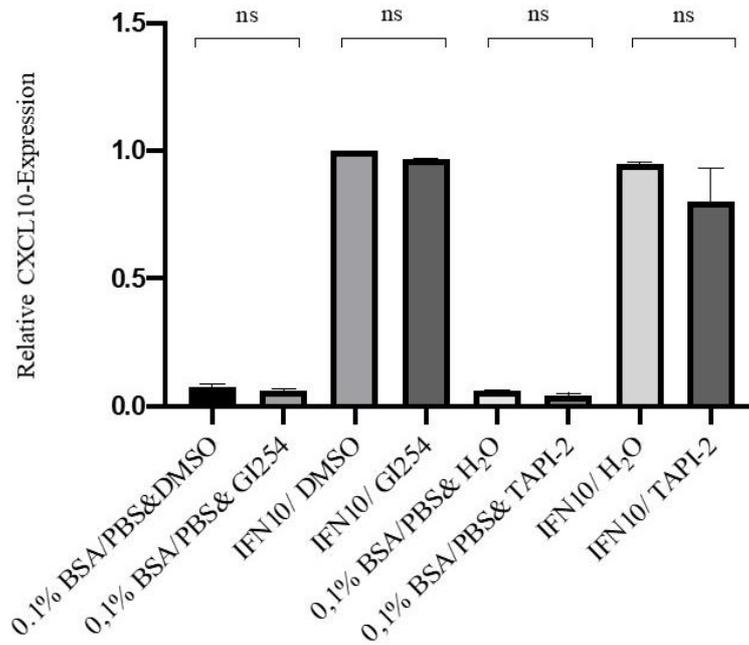


Abbildung 19: Lösliches mCXCL10 in 4T1-Überständen, die für 24 h mit mIFN- γ 10 ng/ml und ADAM-Inhibitoren inkubiert worden waren.

Die Konzentrationen von DMSO, TAPI-2 und GI254 waren die gleichen wie in Abbildung 17 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Relation zu mIFN- γ 10 ng/ml /DMSO dargestellt. Es zeigte sich hierbei wie erwartet kein signifikanter Unterschied in der löslichen mCXCL10-Menge, $p > 0,05$ in allen Fällen.

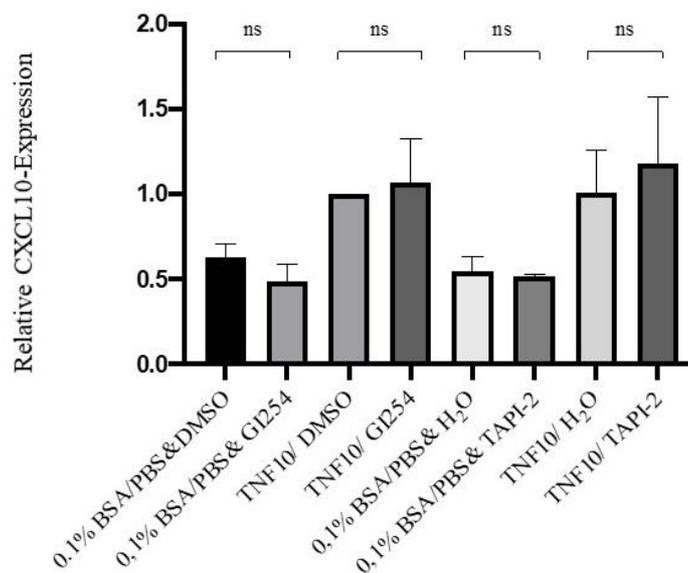


Abbildung 20: Lösliches mCXCL10 in 4T1-Überständen, die für 24 h mit mTNF- α 10 ng/ml und ADAM-Inhibitoren inkubiert worden waren.

Die Konzentrationen von DMSO, TAPI-2 und GI254 waren die gleichen wie in Abbildung 17 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Relation zu mTNF- α 10 ng/ml /DMSO dargestellt. Es zeigte sich hierbei wie erwartet kein signifikanter Unterschied in der löslichen mCXCL10-Menge, $p > 0,05$ in allen Fällen.

3.3 EU-Assay

Im ersten Teil der Ergebnisse wurde die Regulation der löslichen hCX₃CL1-Produktion in Abhängigkeit der ADAM-Proteasen analysiert und festgestellt, dass deren Hemmung zu einem Absinken des löslichen hCX₃CL1, und zu einem Anstieg des membranständigen hCX₃CL1 führt. In einem zweiten Ansatz sollte nun untersucht werden, inwiefern eine Inhibition der ADAM-Proteasen eine Auswirkung auf die Funktion des hCX₃CL1-Chemokins hat. So spielt lösliches hCX₃CL1 eine wichtige Rolle in der Chemotaxis von Leukozyten, darunter auch von Natürlichen Killerzellen (Bazan et al. 1997).

Das Prinzip des Assays beruhte dabei auf der Analyse der spezifischen Lyse (gerechnet in Prozent) der Tumorzellen durch die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Dies wurde durch eine intrazelluläre Markierung der unterschiedlich stimulierten Tumorzellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff und deren Inkubation zusammen mit den NK-Zellen erreicht.

Für diese Versuchsreihe wurden humane Ovarialkarzinomzellen benutzt. Diese wurden, wie unter 2.2.4. beschrieben, kultiviert und anschließend in vier unterschiedlichen Ansätzen stimuliert.

Die Versuchsreihe wurde insgesamt vier Mal wiederholt und die Ergebnisse anschließend zusammengefasst. Die Abbildung 21 zeigt jeweils die spezifische Lyse der Tumorzellen durch stimulierte und unstimulierte NK-Zellen für unterschiedliche Verdünnungen. Die mit IL-2 stimulierten NK-Zellen erzielten dabei wie erwartet eine höhere Zelllyse als die unstimulierten NK-Zellen. Dieser Unterschied war für alle Ansätze hoch signifikant ($p < 0,0001$ in allen Fällen). So erzielten die unstimulierten NK-Zellen bei den unterschiedlichen Targets für die 1:10 Verdünnung beispielsweise eine um jeweils 47,3% (0,1% BSA/PBS), 65,6% (TNF10), 51,4% (0,1% BSA/PBS & GI254) und 65,0% (TNF10 & GI254) niedrigere Zelllyse als die stimulierten NK-Zellen für die entsprechenden Ansätze.

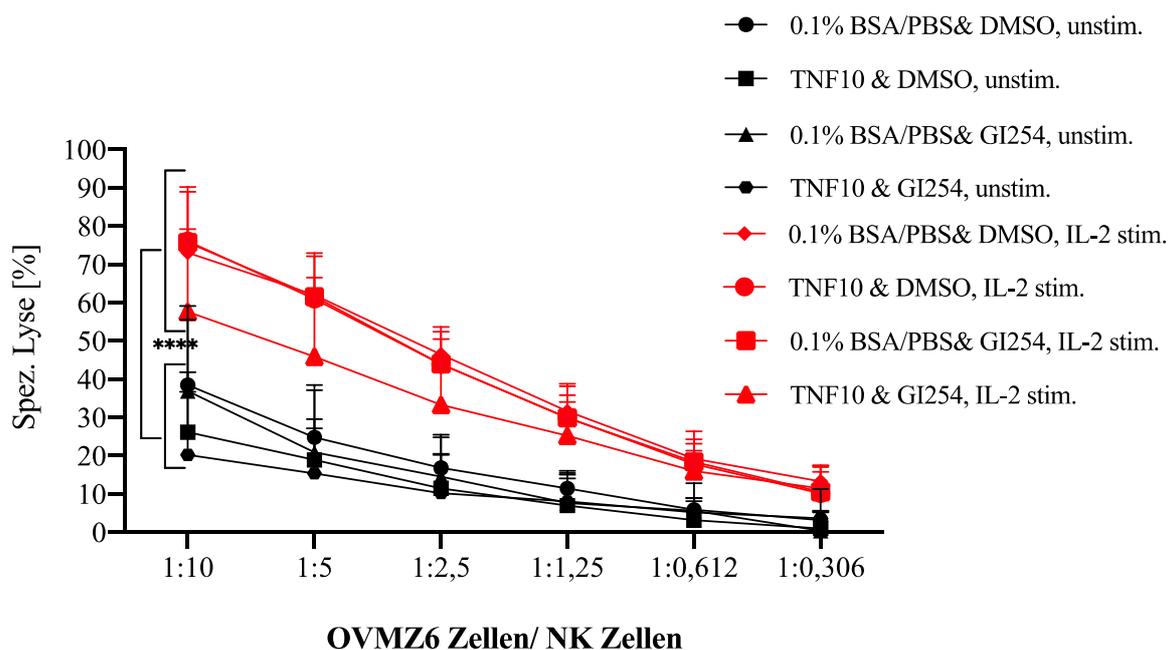


Abbildung 21: Spezifische Lyse in [%] (vertikale Achse) der OVMZ6-Zellen durch IL-2 stimulierte und unstimulierte NK-Zellen für unterschiedliche Verdünnungen (horizontale Achse).

Die Tumorzellen wurden 24 h je mit 10 ng/ml TNF- α (TNF10), dem ADAM10 Inhibitor GI254 mit einer Konzentration von 5 μ M (GI254) oder einer Kombination (GI254 & TNF10) stimuliert. Als Kontrolle wurde 0,1% BSA/PBS verwendet. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt. (** p < 0,0001).

Anschließend wurden die einzelnen Targets bezüglich der Zellyse jeweils untereinander verglichen, einmal für die unstimulierten und einmal für die mit IL-2 stimulierten NK-Zellen. Dabei wurde die 1:10 Verdünnung noch einmal separat analysiert.

Abbildung 22 zeigt die spezifische Lyse der OVMZ6-Zellen durch unstimulierte NK-Zellen für die gesamte Verdünnungsreihe. Hierbei zeigte sich ein hoch-signifikanter Unterschied bezüglich der spezifischen Zellyse zwischen der Stimulation mit 0,1% BSA/PBS/ DMSO und TNF10/ DMSO sowie zwischen 0,1% BSA/PBS/DMSO und TNF10/ GI254. Hierbei erzeugte die Stimulation mit 0,1% BSA/PBS/DMSO eine höhere Zellyse. Und auch die spezifische Lyse von 0,1% BSA/PBS/GI254 war verglichen mit TNF10/ GI254 ebenfalls signifikant höher. So erzielte die Stimulation mit TNF10/ GI254 für die 1:10 Verdünnung eine um jeweils 47,5% (verglichen mit 0,1% BSA/PBS/DMSO) niedrigere bzw. um 45,2% (verglichen mit 0,1% BSA/PBS & GI254) niedrigere Zellyse. Die Zellyse durch die Stimulation mit TNF10/DMSO war um 45,2% niedriger als die Stimulation mit 0,1% BSA/PBS/DMSO. Die Abbildung 23 zeigt die Lyse der Tumorzellen durch die unstimulierten NK-Zellen alleine für die 1:10 Verdünnung, Dabei zeigte sich zwischen „TNF- α 10 ng/ml & GI254“ und 0,1% BSA/PBS/ DMSO ein signifikanter Unterschied, in diesem Fall betrug p= 0,04.

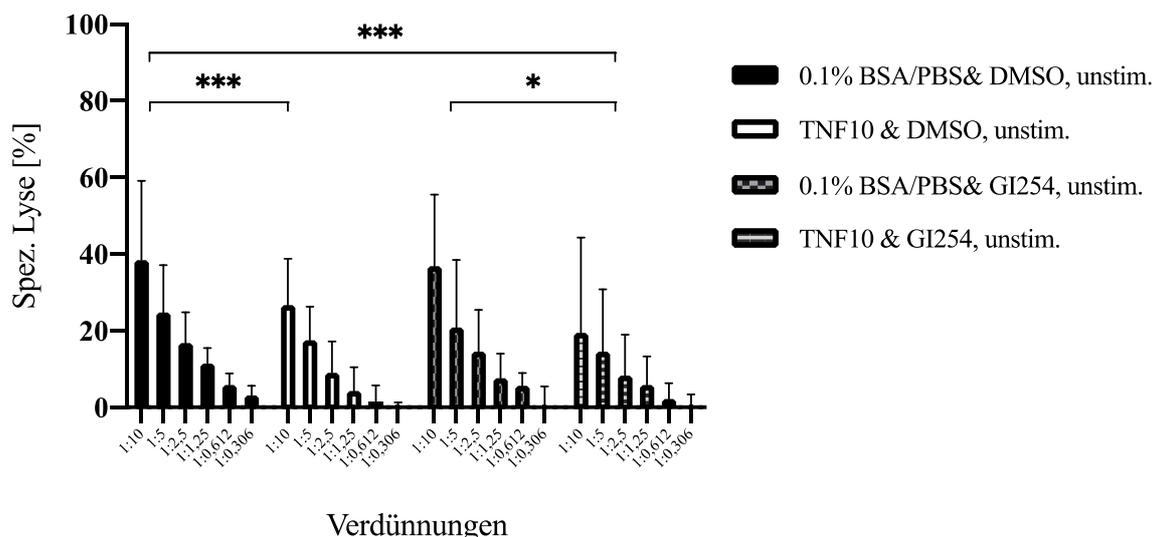


Abbildung 22: Spezifische Lyse in [%] (vertikale Achse) der OVMZ6-Zellen durch unstimulierte NK-Zellen für unterschiedliche Verdünnungen (horizontale Achse).

Das Stimulationsprotokoll war das Gleiche wie unter Abbildung 21 beschrieben. (* = p<0,05, *** p < 0,001).

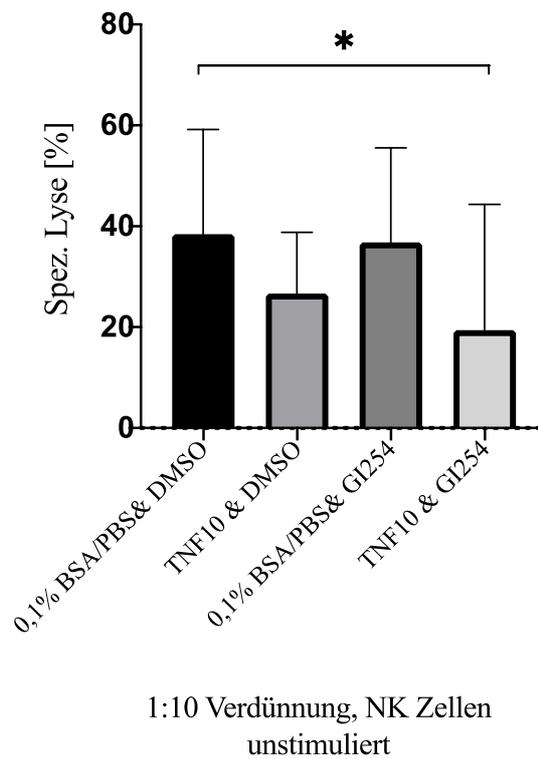


Abbildung 23: Spezifische Lyse in [%] der OVMZ6-Zellen durch unstimulierte NK-Zellen für die 1:10 Verdünnung.

So betrug die Zelllyse für die Targets 0,1% BSA/PBS, 0,1% BSA/PBS & GI254, TNF- α 10 ng/ml, und TNF- α 10 ng/ml & GI254 jeweils 38,5%, 36,8%, 26,1% und 20,2% für die unstimulierten NK-Zellen.

Bei den mit IL-2 stimulierten NK-Zellen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen TNF10 & GI254 und den Stimulationen mit 0,1% BSA/PBS, sowohl für die Kontrolle DMSO als auch den Inhibitor GI254, gefunden werden. ($p < 0,05$) (s. Abbildung 24). So erzielte die Stimulation mit TNF10/GI254 für die 1:10 Verdünnung eine um jeweils 21,1% (verglichen mit 0,1% BSA/PBS/DMSO) niedrigere bzw. um 23,9% (verglichen mit 0,1% BSA/PBS & GI254) niedrigere Zelllyse. Betrachtet man jedoch die 1:10 Verdünnung separat, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Targets gefunden werden, nichtsdestotrotz zeichnete sich hier der gleiche Trend ab (verminderte Zelllyse bei TNF10 & GI254) wie bei der gesamten Verdünnungsreihe (s. Abbildung 25).

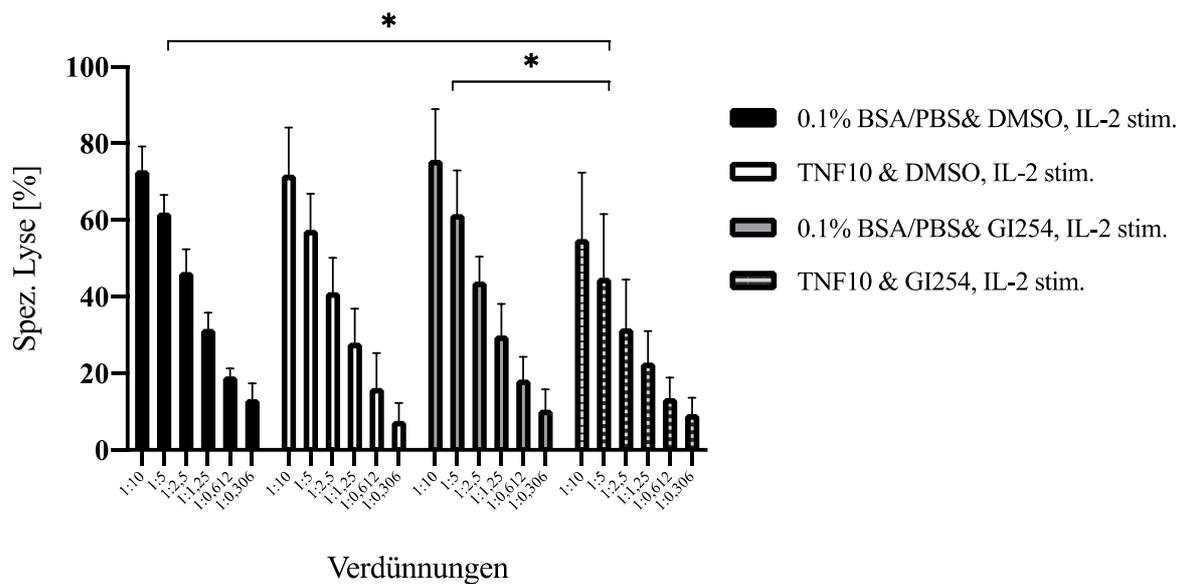
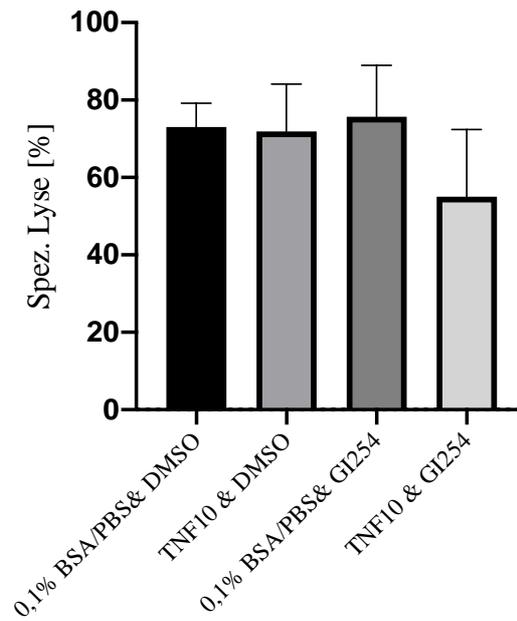


Abbildung 24: Spezifische Lyse in [%] (vertikale Achse) der OVMZ6-Zellen durch IL-2 stimulierte NK-Zellen für unterschiedliche Verdünnungen (horizontale Achse).

Das Stimulationsprotokoll war das Gleiche wie unter Abbildung 21 beschrieben. (* = $p < 0,05$)



1:10 Verdünnung, NK Zellen mit IL2
stimuliert

Abbildung 25: Spezifische Lyse in [%] der OVMZ6-Zellen durch IL-2-stimulierte NK-Zellen für die 1:10 Verdünnung. So betrug die Zellyse für die Targets 0,1% BSA/PBS, 0,1% BSA/PBS & GI254, TNF- α 10 ng/ml und TNF- α 10 ng/ml & GI254 jeweils 73,0%, 75,7%, 76,1% und 57,6% für die stimulierten NK-Zellen.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von TNF- α und IFN- γ auf die CX₃CL1-Expression

Baggiolini et al. hatten bereits 1994 dargestellt, dass die beiden Zytokine TNF- α und IFN- γ Induktoren der Chemokinproduktion in Tumorzellen sind (Baggiolini et al. 1994). Dies konnte nun im Rahmen der Stimulationen mit den beiden Zytokinen für das CX₃CL1-Chemokin sowohl in humanen als auch in murinen Mammakarzinomzellen bestätigt werden. Während für die humanen Mammakarzinomzellen sowohl eine Stimulation mit hTNF- α als auch mit hIFN- γ zu einer verstärkten Bildung von hCX₃CL1 geführt hat, war dies bei den murinen Mammakarzinomzellen nur für mIFN- γ nachweisbar. In den SKBR3-Zellen konnte darüber hinaus ein Synergismus für hTNF- α und hIFN- γ gefunden werden. Diesen synergistischen Effekt von TNF- α und IFN- γ auf die CX₃CL1-Produktion haben sowohl Isozaki et al. in Osteoblasten, als auch Sukkar et al. in glatten Muskelzellen nachweisen können (Sukkar et al. 2004; Isozaki et al. 2008). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass 4T1-Zellen – im Gegensatz zu SKBR-3-Zellen – auch in Ruhe mCX₃CL1 freisetzen.

IFN- γ gehört zur Gruppe II der Interferone, und wird hauptsächlich von natürlichen Killerzellen und CD4⁺- und CD8⁺ T-Lymphozyten produziert, nachdem diese durch inflammatorische Stimuli aktiviert worden sind (Boehm et al. 1997). Humanes und murines IFN- γ unterscheiden sich dabei wesentlich in ihrer Aminosäuresequenz. Nur 40% ihrer Aminosäuresequenz sind identisch. Dadurch unterscheiden sie sich auch in ihren Rezeptoreigenschaften und die damit verbundenen induzierten Signalkaskaden in ihren Zielzellen (Farrar et al. 1993). Die Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor auf seinen Zielzellen führt zur Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges. Dabei scheinen die Hauptkomponenten dieses Signalweges die drei Kinasen JAK1, JAK2 und STAT1 zu sein. So wirkt STAT1 als Transkriptionsfaktor in dieser Signalkaskade und aktiviert die Transkription von bestimmten Genen (Bach et al. 1997). Dazu gehört zum Beispiel die Aktivierung von Genen, welche die Apoptose regulieren, darunter intrazelluläre oder membranständige Komponenten wie die Caspase-1 oder Fas (Chin et al. 1997; Xu et al. 1998). Legrier et al. haben zum Beispiel gefunden, dass Mammakarzinomzellen nach einer Chemotherapie mit Anthrazyklin und Cyclophosphamid vermehrt IFN- γ sezernieren, was wiederum zur Aktivierung des STAT1-Signalweges und dadurch zu DNA Schäden und letztendlich zur Apoptose führt. Patientinnen mit einem aktivierten STAT1-Signalweg zeigten somit ein besseres Therapieansprechen auf Chemotherapeutika, als Patientinnen, bei denen dieser Signalweg nicht verstärkt induziert werden konnte (Legrier et al. 2016).

Aber auch die Sekretion von einigen Chemokinen wird durch IFN- γ über den STAT1-Signalweg stimuliert. So haben Isozaki et al. in ihrer Arbeit zeigen können, dass die Produktion von CX₃CL1 unter anderem durch die Hochregulation des Transkriptionsfaktors STAT1 IFN- γ -abhängig aktiviert wird (Isozaki et al. 2008).

Ein anderer wichtiger Transkriptionsfaktor für CX₃CL1 ist NF-κB. Garcia et al. haben in ihrer Arbeit dargestellt, wie TNF-α als wichtiger Induktor des Transkriptionsfaktors NF-κB wirkt und dadurch die Produktion von CX₃CL1 ankurbelt (Garcia et al. 2000).

Insgesamt lässt sich die verstärkte Produktion von CX₃CL1 in den Mammakarzinomzellen durch IFN-γ und TNF-α durch deren induzierte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und NFκB erklären. Interessant ist, dass- ähnlich wie beim CX₃CL1 Chemokin- sowohl TNF-α als auch IFN-γ anti- und protumorale Eigenschaften zugesprochen werden.

Auf der einen Seite diskutieren Kaplan et al. in ihrer Arbeit, wie wichtig eine IFN-γ-Sensitivität für die Kontrolle von Tumorwachstum ist. So haben einige ihrer Experimente am Tiermodell gezeigt, dass Mäuse, die gegenüber IFN-γ resistent sind, viel schneller Tumore entwickeln (Kaplan et al. 1998). Ogawa et al. haben ebenfalls demonstriert, wie wichtig IFN-γ für die Wirksamkeit von verschiedenen Tumortherapien ist (Ogawa et al. 1998). Eine bedeutende Funktion von IFN-γ ist seine Eigenschaft, Immunogenität in Tumoren hervorzurufen, also eine Immunantwort gegen den Tumor zu provozieren. Dies erreicht IFN-γ vor allem, indem es die Migration von Monozyten, natürlichen Killerzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen ins Tumorgewebe anreizt. Diese Effektorzellen sind maßgeblich für eine Tumorregression zuständig (Mukai et al. 1999). Die Migration und Aktivierung von Effektorzellen wird dabei durch drei verschiedene Komponenten IFN-γ abhängig erleichtert. Erstens verstärkt IFN-γ die Präsentation von tumorspezifischen Antigenen, indem es die dafür notwendigen Komponenten hochreguliert (Seliger et al. 1997). Aufgrund der verstärkten Antigenpräsentation werden Monozyten, Natürliche Killerzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen zur Tumorbekämpfung angezogen (Ritter et al. 1994). Zweitens induziert IFN-γ die Bildung von Chemokinen wie CXCL9 und CXCL10, welche mittels Chemotaxis ebenfalls diese Effektorzellen anziehen (Bukowski et al. 1999). Die beiden Chemokine CXCL9 und CXCL10 sind auch für ihre angiostatischen Eigenschaften bekannt. So hemmen sie wichtige Wachstumsfaktoren wie VEGF (Luster et al. 1993). IFN-γ hemmt somit durch ihre induzierte Sekretion zusätzlich die Angiogenese von Tumoren (Sgadari et al. 1996). Drittens stimuliert IFN-γ die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen und inhibiert gleichzeitig deren Differenzierung zu Th2-Zellen, was, wie bereits in 1.1.4.1 beschrieben worden ist, einen tumorsuppressiven Effekt hat. In der Tat sezernieren Th1-Zellen weitere Zytokine, unter anderem IFN-γ und IL-12, und unterstützen dadurch die zytotoxische Aktivität von Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen (Romagnani 1997). Somit aktiviert IFN-γ Vertreter des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen und Natürliche Killerzellen, die weiteren Entzündungsmediatoren wie IL-12 aber auch wiederum IFN-γ produzieren, was in einer ständigen gegenseitigen Aktivierung von Immunzellen, darunter auch Effektorzellen des adaptiven Immunsystems, resultiert und zu einer starken Immunantwort gegen das Tumorwachstum führt.

Auf der anderen Seite sprechen Ikeda et al. IFN-γ eine kritische Rolle in der Karzinogenese zu. IFN-γ beeinflusst den immungenetischen Phänotypen von Tumoren während ihrer Entwicklung maßgeblich. Das Zytokin hat eine große protektive Funktion innerhalb der Karzinogenese, trotzdem kann es die

Selektion von immunresistenten Tumorvarianten begünstigen, indem es die Aktivierung oder Inhibition von bestimmten Signalwegen hervorruft, welche es Tumorzellen erlauben, einer Immunantwort zu entgehen (Ikeda et al. 2002). Beispielsweise stimuliert IFN- γ über den JAK1- und JAK2-Signalweg die Expression von PD-L1, einem wichtigen Immuncheckpoint in Tumorzellen, hemmt dadurch die Aktivität von NK-Zellen und führt letzten Endes zu einer erhöhten Resistenz der Tumorzellen gegenüber der Immunantwort. (Bellucci et al. 2015) Weiterhin haben Beatty et al. gefunden, dass IFN- γ durch Aktivierung verschiedener Signalwege die Präsentation von tumorspezifischen Antigenen auch runterregulieren kann und zum Verlust von antigenpräsentierenden Tumorvarianten führt (Beatty et al. 2000). Dies kann eine Tumorprogression begünstigen und ein Ansprechen auf antigenbasierte Immuntherapien abschwächen (Beatty et al. 2001).

Ähnliches findet sich für das Zytokin TNF- α : Wie IFN- γ auch, spielt das Zytokin TNF- α eine große Rolle bei akuten und chronischen inflammatorischen Prozessen und wird vor allem von Makrophagen und T-Lymphozyten produziert (Estevam et al. 2005). Ebenfalls wie CX₃CL1, existiert TNF- α sowohl in der membranständigen als auch in der löslichen Form. Genauso ist auch die Metalloprotease ADAM17 für sein Cleavage zuständig. Beide Formen binden dabei an unterschiedliche Rezeptoren: die lösliche Form an den TNFR1, ubiquitär auf allen Zellen vorhanden, die membranständige Form an den TNFR2, auf hämatopoetische Zellen limitiert (Locksley et al. 2001). Die Bindung löslichen TNF- α an den TNFR1-Rezeptor kann dabei unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren, welche entweder in einer gesteigerten Proliferation und Zellüberleben enden, oder aber die Apoptose der Zelle auslösen. Standardmäßig wird vor allem der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, welche die Transkription proliferativer und antiapoptotischer Gene induziert. Ist die Zelle dagegen geschädigt, kommt es über die Caspase-8 zur Apoptose der Zelle (Varfolomeev et al. 2004).

Durch die mögliche Aktivierung zahlreicher Signalwege ist es nicht verwunderlich, dass TNF- α eine zentrale Rolle sowohl in der Promotion als in der Inhibition der Entwicklung von Tumoren zu spielen scheint.

So wird TNF- α nicht nur von Vertretern des Immunsystems, sondern kann auch von Tumorzellen und Stromazellen synthetisiert werden. Seine Sekretion führt zu DNA-Schäden, stimuliert antiapoptotische und proliferative Signalkaskaden, unterstützt die Wirkung von Wachstumsfaktoren, induziert die Produktion von zahlreichen matrixdestruierenden Metalloproteasen, Zytokinen und Chemokinen, und schafft dadurch ein Tumormikromilieu, welches sich begünstigend auf Tumordinvasion und -wachstum auswirkt (Balkwill 2006). So haben Katanov et al. beobachtet, dass TNF- α die Bildung der Tumorwachstum- begünstigenden Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL8 in tumorassoziierten Fibroblasten im Stroma von Mammakarzinomen stimuliert, und Soria et al. haben bestätigt, dass eine erhöhte Konzentration von TNF- α und dieser Chemokine mit einem negativen Krankheitsverlauf assoziiert ist (Katanov et al. 2015; Soria et al. 2011). Das Zytokin induziert auch die Expression des CXCR4 Rezeptors auf Tumorzellen und seines Liganden CXCL12 (Kulbe et al. 2005). Diesem Chemokin und seinem Rezeptor wird eine bedeutsame Rolle in der Migration und Metastasierung von

Tumorzellen zugesprochen (Balkwill 2004) (s. 1.4.). Gleichmaßen haben Ardizzoia et al. bereits früh die These aufgestellt, dass hohe TNF- α Konzentrationen im Blutserum von Tumorpatienten mit der Entwicklung von Metastasen assoziiert sind (Ardizzoia et al. 1992). Tripsianis et al. haben gefunden, dass eine hohe Expression der beiden Zytokine TNF- α und IL-6 im Mammakarzinom mit positivem Lymphknotenstatus, lymphovaskulärer Invasion und vermindertem Überleben assoziiert ist (Tripsianis et al. 2014). Abschließend ist festzuhalten, dass viele Arbeitsgruppen die Wirkung von TNF- α auf die Karzinogenese untersucht haben, und vor allem der durch dieses Zytokin vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B eine erhebliche Rolle in der Begünstigung der Tumorprogression zusprechen, und in der Inhibition dieses Transkriptionsfaktors einen möglichen therapeutischen Ansatz sehen (Katanov et al. 2015; Reed et al. 2012).

Andererseits scheint TNF- α auch antitumorale Eigenschaften zu besitzen. So stimuliert TNF- α neutrophile Monozyten, und erhöht dadurch ihre Zytotoxizität gegen Tumorzellen (Comen et al. 2016). Im Mammakarzinom haben Shen et al. zudem gefunden, dass TNF- α zusammen mit anderen Interleukinen durch die Inhibition bestimmter Wachstumsrezeptoren eine Tumorproliferation hemmt (Shen et al. 2002). Im Mausmodell haben Sabel et al. nachweisen können, dass TNF- α und IL-12 zur Migration von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen ins Tumorgewebe und dadurch zur Tumorregression beitragen (Sabel et al. 2004). Gleichmaßen haben Estevam et al. in ihrer Arbeit gezeigt, dass Mammakarzinom-Patientinnen mit einer negativen Metastasierungsrate eine hohe TNF- α Konzentration im Tumorgewebe vorweisen (Estevam et al. 2005). Korobko et al. haben die ähnliche Observation gemacht, dass eine Resistenz gegen eine TNF- α -induzierte Apoptose mit einer verstärkten Metastasierungstendenz von Tumorzellen assoziiert ist (Korobko et al. 1999).

Bezogen auf die CX₃CL1-Expression in Mammakarzinomzellen lassen sich dadurch folgende Schlussfolgerungen ziehen: Die Experimente mit den Zytokinen haben gezeigt, dass TNF- α und IFN- γ zu starken Induktoren der CX₃CL1-Produktion in Mammakarzinomzellen gehören. Der nächste Schritt wäre nun, in weiteren experimentellen Ansätzen zu analysieren, unter welchen Bedingungen Mammakarzinomzellen in vivo beginnen CX₃CL1 zu sezernieren- und zum anderen zu erforschen, welche Auswirkungen CX₃CL1 auf die Gestaltung des Mikromilieus der Mammakarzinome hat, um eine mögliche Korrelation zwischen der CX₃CL1-Konzentration im Tumorgewebe und der Prognose des Mammakarzinoms zu erheben, wie es bereits Tsang und Park et al. gemacht haben.

Ob TNF- α und IFN- γ durch die Induktion der CX₃CL1-Produktion in Mammakarzinomzellen nun insgesamt pro- oder antitumoral wirken, ist kontrovers zu diskutieren.

Interessant wäre also herauszuarbeiten, inwiefern eine (durch TNF- α oder durch IFN- γ induzierte) hohe CX₃CL1-Konzentration im Mammakarzinom mit einer guten oder schlechten Prognose korreliert. Wie bereits oben ausgeführt haben verschiedene Arbeiten sowohl einen positiven als auch einen negativen Einfluss einer hohen CX₃CL1-Konzentration im Tumorgewebe auf die Prognose beim Mammakarzinom gefunden. Wichtig scheint hierbei vor allem die Gesamtzusammensetzung des Mikromilieus, und das Verhältnis von membranständigem zu löslichem CX₃CL1, wobei letzteres noch

genauer zu analysieren gilt (Tsang et al. 2013). Bislang ist noch nicht geklärt, wie sich CX₃CL1 intratumoral anreichern lässt. Denkbar sind pharmakologische Zielstrukturen, mit deren Hilfe die Expression gesteigert wird, aber auch solche, mit denen der beispielsweise proteasenvermittelte CX₃CL1-Abbau inhibiert werden kann.

4.2 Wirkung der ADAM-Inhibition auf die CX₃CL1- und CXCL10-Produktion

In der Literatur wurde bereits die Rolle der beiden ADAM-Proteasen ADAM10 und ADAM17 für das Cleavage von CX₃CL1 beschrieben (Garton et al. 2001; Hundhausen et al. 2003).

Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente unter Verwendung der entsprechenden ADAM-Inhibitoren haben diese Funktion nun erstmalig auch in humanen und murinen Mammakarzinomzellen bestätigt. In der Tat ist durch die ADAM-Inhibition die lösliche CX₃CL1-Menge signifikant gesunken. Im Western Blot dagegen konnte gezeigt werden, dass gesamtzelluläres CX₃CL1 bei einer ADAM10/17-Inhibition ansteigt. Eine Hemmung der ADAM-Proteasen inhibiert also wirksam und signifikant das Cleavage von CX₃CL1.

Die Tatsache, dass die verwendete ADAM-Inhibition keinen Einfluss auf die lösliche Menge von CXCL10 hat, zeigt zum einen, dass es sich um einen spezifischen Effekt handelt, zum anderen, dass die CXCL10-Konzentration unabhängig von der Aktivität von ADAM10 oder ADAM17 ist. Um die Spezifität der ADAM-Proteasen noch konkreter zu untersuchen, hätte anstatt eines löslichen Chemokins ein anderes membranständiges Chemokin in den Mammakarzinomzellen untersucht werden können. Hier hätte sich das CXCL16-Chemokin angeboten, was ebenfalls wie CX₃CL1 als membranständiges Chemokin synthetisiert wird (Matloubian et al. 2000). Dabei ist bis jetzt bekannt, dass nur ADAM10 für das Cleavage von CXCL16 verantwortlich ist, nicht jedoch ADAM17 (Gough et al. 2004). Dies hätte in einem ähnlichen wie dem hier gezeigten experimentellen Aufbau unter Verwendung eines CXCL16-ELISAs überprüft werden können.

Die Bedeutung der ADAM-Proteasen und des Cleavages von CX₃CL1 im Mammakarzinom wurde bis jetzt noch nicht geklärt. In der Tat stellt sich die Frage, ob CX₃CL1 in seiner löslichen oder membranständigen Form unterschiedlich auf das Tumorstadium wirkt. Besitzt einer der beiden Formen einen Vorteil oder einen Nachteil für die Tumorstadiumprogression? Hier würde es sich anbieten, weitere Analysen mit Tumorgewebe von Mammakarzinomen durchzuführen um herauszuarbeiten, ob es einen Unterschied zwischen der löslichen und der membranständigen Konzentration von CX₃CL1 für die Prognose des Mammakarzinoms gibt. Dabei ist es wichtig zu unterscheiden, welche Zellen CX₃CL1 bzw. CX₃CR1 exprimieren.

Folgende Hypothese könnte in weiteren Experimenten überprüft werden: CX₃CL1 in seiner membranständigen Form fungiert als Adhäsionsmolekül für Scherkräfte-resistente Leukozyten mit einem CX₃CR1-Rezeptor, und erleichtert somit die Migration von Effektorzellen wie CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und Natürliche Killerzellen ins extravasale Gewebe bzw. Tumorgewebe. Dadurch ermöglicht es eine wirksame Immunantwort gegen den Tumor (Fong et al. 1998).

Allerdings können die Leukozyten erst nach Cleavage von CX₃CL1 ins Gewebe wandern, aktive ADAM-Proteasen sind also wahrscheinlich dennoch notwendig für die Diapedese der Effektorzellen ins

Tumorgewebe (Hundhausen et al. 2003). Zusätzlich kann membranständiges CX₃CL1 die Migration von CX₃CR1 exprimierenden Tumorzellen verhindern, da diese am membranständigen CX₃CL1 auf Endothelzellen „kleben“ bleiben. Hier wäre eine ADAM-Inhibition von Vorteil, da sie das Cleavage und somit das Loslösen der Tumorzellen vom membranständigen CX₃CL1 unterbindet und dadurch einer Metastasierung entgegengewirkt (Jamieson et al. 2008).

Lösliches CX₃CL1 lockt vor allem mittels Chemotaxis CX₃CR1⁺-Leukozyten ins Tumorgewebe, und trägt somit ebenfalls zur Immunantwort bei. Dennoch werden dadurch nicht nur tumorsuppressive Effektorzellen, sondern auch Makrophagen angelockt, welche durch Sekretion von bestimmten Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren eine Angiogenese und Tumordinvasion unterstützen (Reed et al. 2012). Außerdem machen sich Tumorzellen einen hohen CX₃CL1-Gradienten ebenfalls zu Nutzen. In der Tat lockt lösliches CX₃CL1 nicht nur CX₃CR1⁺-Leukozyten, sondern auch CX₃CR1⁺-Tumorzellen an. Vor allem Zellen in Metastasierungsorten, wie zum Beispiel im Gehirn, induzieren durch einen hohen CX₃CL1-Gradienten die Migration von Tumorzellen und somit eine Metastasierung des Tumors (Andre et al. 2006). Zudem exprimieren Tumorzellen selbst membranständiges CX₃CL1, was anschließend durch ADAM-Proteasen in seine lösliche Form überführt wird. In einer autokrinen Weise aktiviert CX₃CL1 somit promotogene und antiapoptotische Signalwege und induziert die Expression von Wachstumsfaktoren wie EGF in der Tumorzelle, und favorisiert damit die Tumorphoregression (s. Abbildung 26) (Tardáguila et al. 2013).

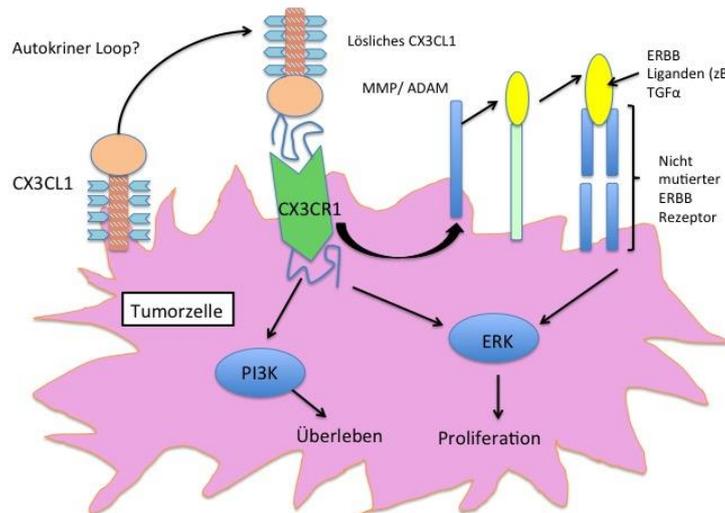


Abbildung 26: Durch lösliches CX₃CL1 induzierte Signalwege.

Lösliches CX₃CL1 induziert durch Bindung an den CX₃CR1-Rezeptor promotogene und antiapoptotische Signalwege, wie ERK und PI3K, was zum Überleben und Proliferation der Tumorzelle führt. So werden zum Beispiel Wachstumsrezeptoren der ERB-Familie hochreguliert. ADAM-Proteasen sind zusätzlich für das Cleavage der an diesen Rezeptor bindenden Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel TGF- α zuständig, und unterstützen damit indirekt die Tumorzellproliferation. (modifiziert nach Tardáguila et al. 2013)

Die Idee einer ADAM-Inhibition als therapeutischer Ansatz im Mammakarzinom wird durch andere Erkenntnisse bezüglich der Funktion dieser ADAM-Proteasen in der Karzinogenese unterstützt. ADAM10 und ADAM17 sind nicht nur für das Cleavage von CX₃CL1 zuständig, sondern haben auch noch weitere Funktionen, welche für das Tumorwachstum von Bedeutung sind. So sind die beiden Metalloproteasen an der Freisetzung und Aktivierung zahlreicher Wachstumsfaktoren wie TGF- α und EGF, und Liganden von Zytokinrezeptoren wie TNF- α beteiligt. Durch die Bindung dieser Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren (unter anderem EGFR) auf Zielzellen werden promotogene und antiapoptotische Signalwege aktiviert. Im Mammakarzinom scheint vor allem der EGFR-PI3K-AKT-Signalweg von besonderer Bedeutung für das Zellüberleben zu sein (Zheng et al. 2009). Auf diese Weise spielen die beiden ADAM-Proteasen eine bedeutende Rolle in der Tumorzellproliferation, -migration und -invasion (Sahin et al. 2007) (s. Abbildung 27).

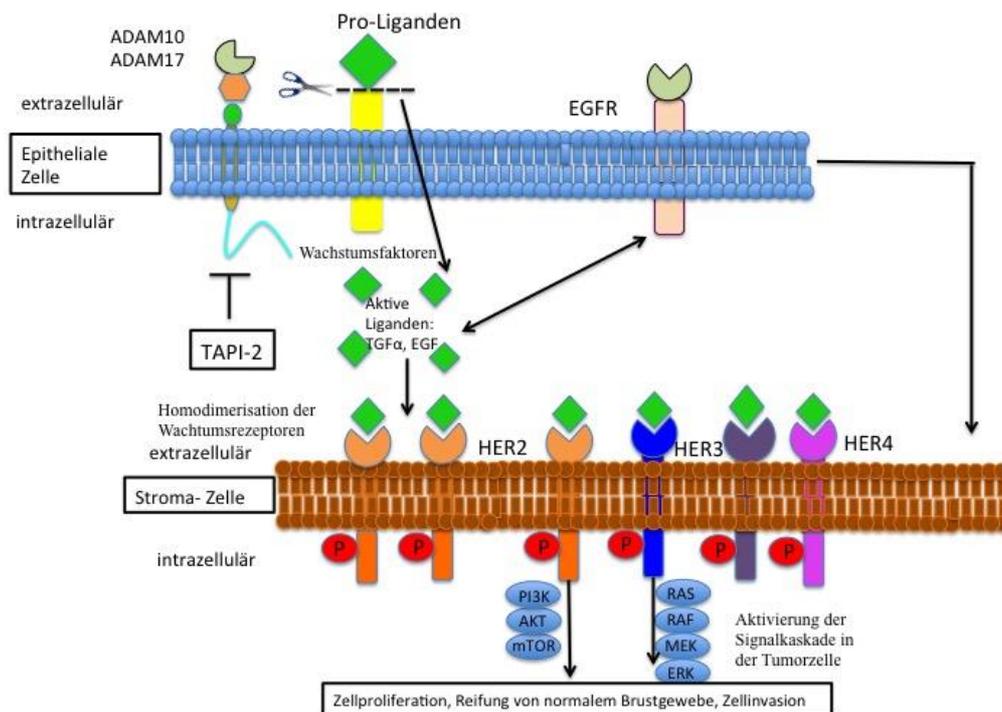


Abbildung 27: Rolle von ADAM10 und ADAM17 in der Karzinogenese.

Die ADAM-Proteasen spalten zahlreiche Wachstumsfaktoren von der Zelloberfläche, die anschließend durch Bindung an die entsprechenden Wachstumsrezeptoren Signalkaskaden in der Tumorzelle aktivieren, was dann die Tumorzellproliferation und –invasion fördert. ADAM-Inhibitoren wie der ADAM17-Antikörper TAPI-2 hemmen die Spaltung der Wachstumsfaktoren. (modifiziert nach Shen et al. 2016))

Der Zusammenhang zwischen ADAM-Expression und Prognose für unterschiedliche Tumore wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. McGowan et al. haben nachgewiesen, dass die ADAM17-Konzentration höher im Mammakarzinom als im normalen Brustgewebe ist. Diese hohen Konzentrationen korrelieren mit einer verstärkten Proliferation und Invasion der Tumorzellen. Eine hohe ADAM17-Expression im Mammakarzinom ist darüber hinaus mit einem schlechteren Outcome assoziiert (McGowan et al. 2007; McGowan et al. 2008). Mullooly et al. haben ebenfalls in ihrer Arbeit gefunden, dass eine hohe ADAM10-Konzentration im Mammakarzinom mit einer schlechteren Prognose korreliert, und dass eine ADAM10-Inhibition der Invasion und Migration von Mammakarzinomzellen entgegenwirkt (Mullooly et al. 2015). Ähnliches haben Feldinger et al. gezeigt: hohe ADAM10-Konzentrationen senken das rezidivfreie Überleben und begünstigen eine Resistenz gegen den HER2-Antikörper Trastuzumab im HER2⁺-Mammakarzinom (Feldinger et al. 2014). In der Tat aktiviert ADAM10 die Freisetzung von HER2-Liganden, die dann mit dem Antikörper Trastuzumab um die Bindung an den HER2-Rezeptor konkurrieren (Sahin et al. 2004). Zusätzlich spaltet ADAM10 ebenfalls den HER2-Rezeptor, und setzt dadurch seine extrazelluläre Domäne frei, welche eine

konstitutive Kinase-Aktivität besitzt und unabhängig von einer Ligand-Bindung Proliferations- und Überlebenssignale an die Tumorzelle weitergibt (Liu et al. 2006).

Den gleichen Effekt konnte für ADAM17 nachgewiesen werden (Shen et al. 2016). Entsprechend konnten Liu et al. schon zeigen, dass eine ADAM-Inhibition die Spaltung der konstitutiv aktiven Extrazellulärdomäne von HER2 durch ADAM-Proteasen hemmt und dadurch das Ansprechen auf den HER2-Antikörper verbessert. Des Weiteren konnten sie nachweisen, dass eine ADAM-Inhibition zusammen mit Trastuzumab den proapoptotischen und antiproliferativen Effekt von Chemotherapeutika wie Paclitaxel zusätzlich verstärkt (Liu et al. 2006).

Außerdem scheint ADAM10 auch die durch Chemotherapeutika wie Doxorubicin induzierte Apoptose in Mammakarzinomzellen zu beeinflussen. Liu et al. haben gezeigt, dass Doxorubicin den apoptotischen Fas-Signalweg hochreguliert und Wachstumsrezeptoren wie EGFR inaktiviert. Eine hohe ADAM10-Expression in Mammakarzinomzellen jedoch wirkt dieser Aktivität entgegen und reduziert die Wirksamkeit von Doxorubicin in Mammakarzinomzellen. Aus diesem Grund sehen Liu et al. in der ADAM10-Inhibition ein potentiell therapeutisches Target, um ein besseres Ansprechen auf eine Chemotherapie zu erzeugen (Liu et al. 2011).

ADAM17 spielt zusätzlich auch eine indirekte Rolle in der Angiogenese des Mammakarzinoms. So führt die Metalloprotease zur Sekretion von M-CSF und CCL2, beides Faktoren, welche tumor-assoziierte Makrophagen aktivieren, die dann wiederum proangiogene Faktoren wie VEGF sezernieren, welche unentbehrlich für die Vaskularisation in Tumoren sind. Eine ADAM17-Inhibition könnte also auch indirekt der Angiogenese von Tumoren entgegenwirken (Rego et al. 2014).

Und neuere Studien haben gezeigt, dass PD-L1 ebenfalls durch ADAM10 und ADAM17 proteolytisch abgespalten wird und dies vor allem in triple-negativen Mammakarzinomzellen zu hohen Leveln von löslichem PD-L1 führt, was wiederum die Antitumor-Immunität von Mammakarzinomzellen verstärkt (Romero et al. 2020).

Entsprechend haben bereits einige Arbeitsgruppen den Effekt der ADAM-Inhibition auf die Tumorzellproliferation *in vitro* und *in vivo* in Mammakarzinomzellen getestet. Die Ergebnisse von Fridman et al. demonstrieren, dass eine ADAM-Inhibition die Spaltung von Wachstumsfaktoren senkt und die damit verbundene Aktivierung der promotogenen und antiapoptotischen Signalwege reduziert. Dadurch konnte die Tumorzellproliferation und das Zellüberleben signifikant gehemmt werden. Ebenso konnten keine toxischen Nebenwirkungen der ADAM-Inhibition gefunden werden, was eine gute Toleranz der Therapie suggeriert. Aus diesem Grund proklamieren Fridman et al., dass eine ADAM-Inhibition den Weg in die Tumorthherapie finden wird (Fridman et al. 2007).

Weiterhin haben Caiazza et al. *in vitro* gezeigt, dass eine ADAM17-Inhibition in triple-negativen Mammakarzinomzellen einerseits zu einer verminderten Lebensfähigkeit von Karzinomzellen und verminderten Zellmotilität, und andererseits zu einem verstärkten Zelltod von Mammakarzinomzellen führt (Caiazza et al. 2015). Auch diese Arbeitsgruppe suggeriert, dass man ihre Ergebnisse in ein *in vivo* Modell von TNBC überführt.

Pham et al. haben den Effekt einer ADAM-Inhibition auf die zytotoxische Aktivität von natürlichen Killerzellen im Mammakarzinom untersucht und gefunden, dass vor allem eine ADAM17-Inhibition nicht nur den zytotoxischen Effekt der NK-Zellen gegen Tumorzellen erhöht, sondern auch die IFN- γ Produktion (Pham et al. 2017).

Diese zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine ADAM-Inhibition sich auf vielen Ebenen in der Therapie des Mammakarzinoms anbieten würde. Inwiefern eine ADAM-Inhibition und das dadurch gehemmte Cleavage von CX₃CL1 einen Effekt in Tumorzellen und im Tumorgewebe in vivo ausüben, und welche pro- oder antitumoralen Konsequenzen dieser mit sich bringt, sollte Gegenstand der zukünftigen Forschung werden.

4.3 Interpretation des Deglykosylierungsassays

Ziel der Western Blots mit dem rekombinanten CX₃CL1 und des Deglykosylierungsassays war es, die einzelnen Banden den verschiedenen Vorstufen von CX₃CL1 zuordnen zu können und das Molekulargewicht des deglykosylierten CX₃CL1 im Versuch zu bestimmen. In der Tat zeigten die Western Blots mit dem polyklonalen CX₃CL1-Antikörper mehrere Banden für das CX₃CL1-Chemokin. So färbte der Antikörper Banden bei 200 kDa, 130-120 kDa, 100-90 kDa, 70 kDa und 50 kDa. Bei einigen Banden ist nicht klar, ob es sich hier tatsächlich noch um CX₃CL1 handelt, oder ob der Antikörper unspezifisch gebunden haben könnte. In der Literatur wird das Molekulargewicht vom membranständigen CX₃CL1 mit 100-90 kDa angegeben, das Molekulargewicht des löslichen CX₃CL1 beträgt 85 kDa und deglykosyliertes CX₃CL1 sollte ca. 50 kDa wiegen. Zusätzlich wird CX₃CL1 als Precursorprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 50-75 kDa synthetisiert (Garton et al. 2001). Somit lässt sich zumindest die Herkunft des Großteils der unterschiedlichen CX₃CL1-Banden erklären. Das rekombinante CX₃CL1 ergab zwei Banden im Western Blot: eine bei 90 kDa, was dem membranständigen CX₃CL1 entspricht und eine bei 50 kDa, wobei es sich um das deglykosylierte CX₃CL1 handelt. Für die 200kDa Bande konnte auch in der Literatur kein Korrelat gefunden werden. Es könnte sich hierbei möglicherweise einfach um 100 kDa- CX₃CL1 Dimere handeln.

Der Deglykosylierungsassay gestaltete sich schwierig. In der Tat konnte kein klarer Unterschied zwischen der Probe mit dem Enzym und der Kontrollprobe ausgemacht werden, sodass vermutet wird, dass die Deglykosylierung nicht optimal funktioniert hat, bzw. im Western Blot nicht deutlich nachweisbar ist. Ursache hierfür könnte die Tatsache sein, dass der glykosylierte Teil von CX₃CL1 als Epitop für den CX₃CL1-Antikörper fungiert, und somit das deglykosylierte CX₃CL1 nicht mehr vom Antikörper detektiert werden kann. Ostuni et al. haben diese Vermutung in ihrer Arbeit bestätigt: durch die Deglykosylierung wurde die Zugänglichkeit des Antikörpers zum CX₃CL1 Chemokin vermindert. Ihre Ergebnisse zeigen, wie wichtig der glykosylierte muzinreiche Abschnitt für die Präsentation der Chemokindomäne nach außen ist. Durch die Deglykosylierung verliert der muzinreiche Abschnitt an Festigkeit, sodass er sich nicht mehr vollständig entfalten kann. Dies führt dazu, dass die Chemokindomäne nicht mehr zum Extrazellulärbereich hin präsentiert wird, sondern in der Glykokalyx der Zellmembran verborgen bleibt und dadurch einen verminderten Zugang zum CX₃CR1-Rezeptor bzw. zum polyklonalen Antikörper hat (Ostuni et al. 2014). Tatsächlich wurde in ihrer Arbeit der gleiche Antikörper wie im hier dargestellten Deglykosylierungsassay benutzt (Nummer AF365, von R&D Systems Europe, Lille, France, 1:500 verdünnt). Diese Erkenntnis könnte eine Erklärung für die Ergebnisse des Deglykosylierungsassays sein.

4.4 Interpretation des Europium-Assays

Mit dem Europium-Assay sollte die Funktion von CX₃CL1 im Ovarialkarzinom näher untersucht und gleichzeitig analysiert werden, inwiefern eine Inhibition der ADAM-Proteasen diese Funktion beeinflusst. Die vorherigen Versuche haben erstens gezeigt, dass eine Stimulation mit TNF- α die CX₃CL1-Produktion in Tumorzellen erhöht und zweitens, dass eine ADAM-Inhibition das membranständige CX₃CL1 in den Tumorzellen hochreguliert und spiegelbildlich die Konzentration des löslichen CX₃CL1 im Zellüberstand abnimmt. Im Europium-Assay ist somit davon auszugehen, dass der Unterschied zwischen den unterschiedlichen Targets darin besteht, dass Ovarialkarzinomzellen, bei denen das CX₃CL1-Cleavage durch eine ADAM-Inhibition inhibiert worden ist, eine vermehrte membranständige CX₃CL1-Expression besitzen. Diese CX₃CL1-Expression wurde zusätzlich noch durch eine Stimulation mit TNF- α verstärkt. Dabei ist es wichtig zu erläutern, dass lösliches CX₃CL1 bei diesem Versuch keine Rolle gespielt hat, da lediglich die Tumorzellen selbst und nicht der Zellüberstand mit den natürlichen Killerzellen in Kontakt gekommen sind. Zu Beginn des Versuchs standen die Hypothesen, dass erstens mit IL-2 stimulierte NK-Zellen die Tumorzellen stärker lysieren als unstimulierte NK-Zellen, und zweitens, dass eine ADAM-Inhibition zusammen mit TNF- α zusätzlich zu einer verstärkten Tumorzelllyse führen würde, da das vermehrt exprimierte membranständige CX₃CL1 die Adhäsion der natürlichen Killerzellen an die Ovarialkarzinomzellen erleichtert. Diese Annahme beruht auf den Ergebnissen von Xin et al. Die Arbeitsgruppe hat in vivo gezeigt, dass im CX₃CL1-transfizierten Tumormausmodell das Tumorstadium signifikant gehemmt werden konnte, und dass diese Tumorsuppression vor allem abhängig von der Aktivierung von natürlichen Killerzellen durch CX₃CL1 war. So lockte das lösliche CX₃CL1 die NK-Zellen ins Tumorgewebe, das membranständige CX₃CL1 führte zu ihrer Adhäsion an die Tumorzellen und aktivierte schließlich die Tumorzelllyse (Xin et al. 2005).

Die beiden Hypothesen des Europium-Assays konnten nur teilweise bestätigt werden. So erzielten stimulierte NK-Zellen in der Tat eine signifikant höhere Zelllyse als unstimulierte NK-Zellen. Diese Beobachtung haben auch andere Arbeitsgruppen gemacht. So haben Lotzova et al. in ihrer Arbeit beschrieben, dass eine Stimulation der natürlichen Killerzellen mit IL-2 in einer verstärkten Zytotoxizität gegen Ovarialkarzinomzellen resultiert, und dass sogar zu Beginn sogenannte NK-resistente Tumorzellen dennoch von mit IL-2 stimulierten natürlichen Killerzellen lysiert werden können (Lotzova et al. 1988). Eine Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass IL-2 den CX₃CR1 Rezeptor auf natürlichen Killerzellen hoch zu regulieren scheint (Barlic et al. 2003). Insgesamt führt IL-2 zu einer verstärkten Zellproliferation und Zytotoxizität von NK Zellen, da es nicht nur die Expression des CX₃CR1 Rezeptors auf deren Zellmembran verstärkt, sondern auch die von zahlreichen adhäsiven Molekülen. (Taga et al. 1999).

Die zweite Hypothese konnte jedoch nicht untermauert werden. So wurde bei den mit IL-2 stimulierten NK-Zellen ein signifikanter Unterschied zwischen TNF- α 10 ng/ml & GI254 5 μ M und den Stimulationen mit 0,1% BSA/PBS (sowohl für die Kontrolle DMSO als auch den Inhibitor GI254) gefunden ($p < 0,05$). Zudem zeigte sich bei den unstimulierten NK-Zellen ein signifikanter Unterschied bezüglich der spezifischen Zelllyse zwischen der Stimulation mit 0,1% BSA/PBS/GI254 und TNF10/GI254 sowie ein hoch-signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit 0,1% BSA/PBS/DMSO und TNF- α 10 ng/ml/ DMSO und zwischen 0,1% BSA/PBS/DMSO und TNF- α 10 ng/ml & GI254 5 μ M. Letzteres bestätigte sich auch noch mal separat für die 1:10 Verdünnung.

Anders als erwartet führten sowohl die ADAM-Inhibition als auch die TNF- α -Stimulation jedoch nicht zu einer vermehrten, sondern zu einer verminderten Tumorzelllyse, und dies konnte sowohl bei den mit IL-2 stimulierten, als auch bei den unstimulierten NK-Zellen beobachtet werden. So erzielte bei den unstimulierten NK-Zellen die Stimulation mit TNF- α 10 ng/ml & GI254 5 μ M für die 1:10 Verdünnung eine um jeweils 47,5% (verglichen mit 0,1% BSA/PBS/DMSO) niedrigere bzw. um 45,2% (verglichen mit 0,1% BSA/PBS & GI254 5 μ M) niedrigere Zelllyse. Die Zelllyse durch die Stimulation mit TNF- α 10 ng/ml/DMSO war um 45,2% niedriger als die Stimulation mit 0,1% BSA/PBS/DMSO. Gleichmaßen war bei den stimulierten NK-Zellen für die 1:10 Verdünnung die Zelllyse der Stimulation mit TNF- α 10 ng/ml & GI254 5 μ M um jeweils 21,1% (verglichen mit 0,1% BSA/PBS/DMSO), bzw. um 23,9% (verglichen mit 0,1% BSA/PBS & GI254) niedriger. Dieses Ergebnis widerspricht somit der Hypothese die zu Beginn des Versuchs aufgestellt worden ist, nämlich, dass die ADAM-Inhibition zusammen mit TNF- α zusätzlich zu einer verstärkten Tumorzelllyse führen würde. Diese Erwartung beruhte auf der Idee, dass die Ovarialkarzinomzellen aufgrund der ADAM-Inhibition vermehrt membranständiges CX₃CL1 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und somit die Adhäsion der natürlichen Killerzellen an die Ovarialkarzinomzellen erleichtert wird. Der Eu-Assay hat jedoch sowohl für die unstimulierten als auch für die mit IL-2 stimulierten NK-Zellen gezeigt, dass eine erhöhte Expression des membranständigen CX₃CL1 auf den Ovarialkarzinomzellen tendenziell zu einer verminderten Tumorlyse führt.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sich der Eu-Assay nur auf membranständiges CX₃CL1 beschränkt, und die Funktion seiner löslichen Komponente nicht berücksichtigt hat. So haben Yoneda et al. den Effekt von CX₃CL1 auf die Zellaktivität von natürlichen Killerzellen untersucht und gefunden, dass membranständiges CX₃CL1 vor allem für deren Adhäsion an den Zielzellen zuständig ist, und dass lösliches CX₃CL1 sogar eine Dissoziation dieser starken Bindung durch kompetitive Hemmung hervorrufen kann. Des Weiteren scheint vor allem lösliches CX₃CL1 über die Bindung an den G-Protein gekoppelten CX₃CR1-Rezeptor die Aktivierung des PI3K-Signalweges, und darüber die Degranulation und die Zytotoxizität der NK-Zellen, zu fördern (Haskell et al. 1999; Yoneda et al. 2000). Somit wurden im Europium-Assay die natürlichen Killerzellen zwar verstärkt an die Ovarialkarzinomzellen gebunden, die notwendige Ausschüttung von Perforinen und Granzyme B wurde aber nicht vermehrt ausgelöst. Aus diesem Grund würde es sich anbieten, den Versuch mit löslichem CX₃CL1 zu wiederholen.

Wie in 4.2 stellt auch hier sich die Frage nach einer möglichen ADAM-Inhibition als therapeutischer Ansatz im Ovarialkarzinom, und welche Folgen diese für Tumorwachstum und -metastasierung haben könnte. Obwohl die Wirkung und Konsequenzen einer ADAM-Inhibition bezüglich des CX₃CL1-Cleavages im Ovarialkarzinom noch nicht ausreichend erforscht worden ist, haben dennoch viele Arbeitsgruppen die Wirksamkeit von ADAM-Inhibitoren in anderen Gesichtspunkten als mögliche Therapie des Ovarialkarzinoms analysiert. In der Tat scheinen die ADAM-Proteasen, wie beim Mammakarzinom auch, die Prognose der Patientinnen mit Ovarialkarzinom zu beeinflussen. So sind hohe Konzentrationen von ADAM10 und ADAM17 mit einem signifikant verminderten progressionsfreien Überleben assoziiert (Buchanan et al. 2017). In der Tat spalten die beiden Metalloproteasen zahlreiche membranständige Faktoren, auch bestimmte Adhäsionsmoleküle, welche die Mobilität und Invasion von Ovarialkarzinomzellen stimulieren. Nuti et al. haben gezeigt, dass eine ADAM-Inhibition im Ovarialkarzinom die Metastasierungstendenz von Tumorzellen senkt (Nuti et al. 2013). Die beiden Metalloproteasen spalten nämlich nicht nur membranständiges CX₃CL1, sondern zum Beispiel auch membranständiges CXCL16. Gooden et al. haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass lösliches CXCL16 ein unabhängiger prognostischer Faktor für ein vermindertes Gesamtüberleben bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom ist, und dass eine ADAM-Inhibition die Konzentration löslichen CXCL16 signifikant senkt und dadurch das Migrationspotential der Ovarialkarzinomzellen gehemmt wird (Gooden et al. 2014). Und auch Richards et al. haben untersucht, dass eine ADAM17-Inhibition im Ovarialkarzinom die Spaltung von Wachstumsfaktoren wie EGFR-Liganden und TGF- α hemmt und dadurch dem Tumorwachstum entgegenwirkt (Richards et al. 2012). Zusätzlich dazu scheinen neuere Antikörpertherapien wie die mit dem PD-1-Antikörper Nivolumab ihre proapoptotische und antiproliferative Eigenschaften zumindest teilweise über die Inhibition von ADAM17 auszuüben (Sun et al. 2017).

Abschließend kann, wie beim Mammakarzinom auch, die Erkenntnis festgehalten werden, dass eine ADAM-Inhibition in vielerlei Hinsicht einen möglichen Nutzen auch in der Therapie des Ovarialkarzinoms haben könnte, und dass auch hier in weiteren experimentellen Versuchen analysiert werden sollte, welche Rolle dabei das durch die ADAM-Inhibitoren gehemmte Cleavage von CX₃CL1 für das Tumorwachstum spielt.

5 Ausblick

Immunologische Therapieansätze stellen mitunter die wichtigsten Pfeiler der Tumorthherapie der Zukunft dar. Zahlreiche experimentelle Studien haben bereits erste Erfolge aufweisen können. Dennoch ist vieles bezüglich der genauen Funktion des Immunsystems in der Karzinogenese, sowie die genaue Abwicklung der Immunantwort und ihre Beeinflussung durch zahlreiche Faktoren, bis dato nicht ausreichend untersucht und verstanden. Chemokine bilden eine heterogene Familie der Zytokine, wobei einige das Tumorstadium fördern, andere dagegen hemmen. Verschiedene Chemokine besitzen zudem eine prognostische Aussagekraft und ermöglichen eine Charakterisierung des immunologischen Phänotyps von soliden Tumoren. Auch das CX₃CL1-Chemokin scheint solche Eigenschaften zu besitzen. Die Herausforderung der Zukunft wird es sein, durch die molekulargenetische und immunologische Phänotypisierung mit Hilfe von prognostischen Faktoren und Biomarkern, darunter auch Chemokinen, für jeden spezifischen Tumor eine zugeschnittene Therapie herauszuarbeiten, sodass für jeden einzelnen Tumorpatienten eine individuelle, prognoseverbessernde und nebenwirkungsarme Tumorthherapie möglich wird. Dies wird durch die weitere Entwicklung von Immuntherapien möglich.

6 Zusammenfassung

Chemokine gehören zur Gruppe der Zytokine und erfüllen wichtige immunologische Funktionen. Unterteilt werden sie in vier Untergruppen, abhängig bezüglich der Position und Anzahl der Cysteine in ihrer Aminosäuresequenz. Das CX₃CL1-Chemokin ist der einzige Vertreter der CX₃C-Gruppe. Besonderen Stellenwert hat es aufgrund seiner Fähigkeit, sowohl als membranständige, als auch als lösliche Form vorzuliegen. Für seine Spaltung sind vor allem zwei ADAM-Proteasen zuständig: ADAM10 und ADAM17. Die Funktion der löslichen Form besteht in der Chemotaxis von Leukozyten, darunter vor allem von Monozyten, Natürlichen Killerzellen und zytotoxischen T-Zellen. Die membranständige Form auf Endothelzellen fungiert als Adhäsionsmolekül für scherkräfte-resistente Leukozyten, welche den CX₃CR1-Rezeptor exprimieren, und ermöglicht durch deren Bindung die Migration ins extravasale Gewebe.

CX₃CL1 spielt jedoch, wie andere Chemokine auch, nicht nur bei inflammatorischen Prozessen, sondern auch bei der Kanzerogenese eine wesentliche Rolle. Dabei werden ihm sowohl tumorsuppressive als auch tumorbegünstigende Eigenschaften zugesprochen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben einerseits gezeigt, dass CX₃CL1 durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ in Mammakarzinomzellen induziert wird. Weiterhin unterbindet eine Hemmung der beiden Proteasen ADAM10 und ADAM17 die Abspaltung des löslichen CX₃CL1 von seiner membranständigen Form, hier erstmalig gezeigt in Tumorzellen. Inwieweit beide CX₃CL1-Formen einen Einfluss auf die Tumorbiologie in vivo haben, soll nun Gegenstand zukünftiger Forschung werden.

7 Literaturverzeichnis

- Aaltomaa, S., P. Lipponen, M. Eskelinen, V. M. Kosma, S. Marin, E. Alhava and K. Syrjanen (1992). "Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer." *Eur J Cancer* 28A(4-5): 859-864.
- Adams, S., R. J. Gray, S. Demaria, L. Goldstein, E. A. Perez, L. N. Shulman, S. Martino, M. Wang, V. E. Jones, T. J. Saphner, A. C. Wolff, W. C. Wood, N. E. Davidson, G. W. Sledge, J. A. Sparano and S. S. Badve (2014). "Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199." *J Clin Oncol* 32(27): 2959-2966.
- Adams, S. F., D. A. Levine, M. G. Cadungog, R. Hammond, A. Facciabene, N. Olvera, S. C. Rubin, J. Boyd, P. A. Gimotty and G. Coukos (2009). "Intraepithelial T cells and tumor proliferation: impact on the benefit from surgical cytoreduction in advanced serous ovarian cancer." *Cancer* 115(13): 2891-2902.
- Andre, F., N. Cabioglu, H. Assi, J. C. Sabourin, S. Delaloge, A. Sahin, K. Broglio, J. P. Spano, C. Combadiere, C. Bucana, J. C. Soria and M. Cristofanilli (2006). "Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer." *Ann Oncol* 17(6): 945-951.
- Andrzejewski, M. G., A. Koelsch, T. Kogel, D. Drey Mueller, N. Schwarz and A. Ludwig (2010). "Distinct role of the intracellular C-terminus for subcellular expression, shedding and function of the murine transmembrane chemokine CX3CL1." *Biochem Biophys Res Commun* 395(2): 178-184.
- Antonilli, M., H. Rahimi, V. Visconti, C. Napoletano, I. Ruscito, I. G. Zizzari, S. Caponnetto, G. Barchiesi, R. Iadarola, L. Pierelli, A. Rughetti, F. Bellati, P. B. Panici and M. Nuti (2016). "Triple peptide vaccination as consolidation treatment in women affected by ovarian and breast cancer: Clinical and immunological data of a phase I/II clinical trial." *Int J Oncol* 48(4): 1369-1378.
- Ardizzoia, A., P. Lissoni, F. Brivio, E. Tisi, M. S. Perego, M. G. Grassi, S. Pittalis, S. Crispino, S. Barni and G. Tancini (1992). "Tumor necrosis factor in solid tumors: increased blood levels in the metastatic disease." *J Biol Regul Homeost Agents* 6(3): 103-107.
- Azenshtein, E., G. Luboshits, S. Shina, E. Neumark, D. Shahbazian, M. Weil, N. Wigler, I. Keydar and A. Ben-Baruch (2002). "The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity." *Cancer Res* 62(4): 1093-1102.
- Bach, E. A., M. Aguet and R. D. Schreiber (1997). "The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling." *Annu Rev Immunol* 15: 563-591.
- Baggiolini, M., B. Dewald and B. Moser (1994). "Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines." *Adv Immunol* 55: 97-179.
- Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." *Nat Rev Cancer* 4(7): 540-550.
- Balkwill, F. (2004). "The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4." *Semin Cancer Biol* 14(3): 171-179.

Balkwill, F. (2006). "TNF-alpha in promotion and progression of cancer." *Cancer Metastasis Rev* 25(3): 409-416.

Balkwill, F., K. A. Charles and A. Mantovani (2005). "Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease." *Cancer Cell* 7(3): 211-217.

Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* 357(9255): 539-545.

Bancroft, G. J., R. D. Schreiber and E. R. Unanue (1991). "Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse." *Immunol Rev* 124: 5-24.

Barlic, J., J. M. Sechler and P. M. Murphy (2003). "IL-15 and IL-2 oppositely regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1." *Blood* 102(10): 3494-3503.

Bass, S. S., G. H. Lyman, C. R. McCann, N. N. Ku, C. Berman, K. Durand, M. Bolano, S. Cox, C. Salud, D. S. Reintgen and C. E. Cox (1999). "Lymphatic Mapping and Sentinel Lymph Node Biopsy." *Breast J* 5(5): 288-295.

Bates, G. J., S. B. Fox, C. Han, R. D. Leek, J. F. Garcia, A. L. Harris and A. H. Banham (2006). "Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse." *J Clin Oncol* 24(34): 5373-5380.

Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik and T. J. Schall (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." *Nature* 385(6617): 640-644.

Beatty, G. L. and Y. Paterson (2000). "IFN-gamma can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen." *J Immunol* 165(10): 5502-5508.

Beatty, G. L. and Y. Paterson (2001). "Regulation of tumor growth by IFN-gamma in cancer immunotherapy." *Immunol Res* 24(2): 201-210.

Bellucci, R., A. Martin, D. Bommarito, K. Wang, S. H. Hansen, G. J. Freeman and J. Ritz (2015). "Interferon-gamma-induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression." *Oncoimmunology* 4(6): e1008824.

Ben-Baruch, A. (2003). "Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interactions." *Breast Cancer Res* 5(1): 31-36.

Blobel, C. P. (2000). "Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface." *Curr Opin Cell Biol* 12(5): 606-612.

Boehm, U., T. Klamp, M. Groot and J. C. Howard (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." *Annu Rev Immunol* 15: 749-795.

Bromberg, J. F., C. M. Horvath, Z. Wen, R. D. Schreiber and J. E. Darnell, Jr. (1996). "Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15): 7673-7678.

Bronger, H., J. Singer, C. Windmuller, U. Reuning, D. Zech, C. Delbridge, J. Dorn, M. Kiechle, B. Schmalfeldt, M. Schmitt and S. Avril (2016). "CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer." *Br J Cancer* 115(5): 553-563.

Buchanan, P. C., K. L. M. Boylan, B. Walcheck, R. Heinze, M. A. Geller, P. A. Argenta and A. P. N. Skubitz (2017). "Ectodomain shedding of the cell adhesion molecule Nectin-4 in ovarian cancer is mediated by ADAM10 and ADAM17." *J Biol Chem* 292(15): 6339-6351.

Bukowski, R. M., P. Rayman, L. Molto, C. S. Tannenbaum, T. Olencki, D. Peereboom, R. Tubbs, D. McLain, G. T. Budd, T. Griffin, A. Novick, T. A. Hamilton and J. Finke (1999). "Interferon-gamma and CXC chemokine induction by interleukin 12 in renal cell carcinoma." *Clin Cancer Res* 5(10): 2780-2789.

Burnet, F. M. (1967). "Immunological aspects of malignant disease." *Lancet* 1(7501): 1171-1174.

Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." *Prog Exp Tumor Res* 13: 1-27.

Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." *Br Med J* 1(5022): 779-786.

Caiazza, F., P. M. McGowan, M. Mullooly, A. Murray, N. Synnott, N. O'Donovan, L. Flanagan, C. J. Tape, G. Murphy, J. Crown and M. J. Duffy (2015). "Targeting ADAM-17 with an inhibitory monoclonal antibody has antitumour effects in triple-negative breast cancer cells." *Br J Cancer* 112(12): 1895-1903.

Cascieri, M. A. and M. S. Springer (2000). "The chemokine/chemokine-receptor family: potential and progress for therapeutic intervention." *Curr Opin Chem Biol* 4(4): 420-427.

Charo, I. F. and R. M. Ransohoff (2006). "The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation." *N Engl J Med* 354(6): 610-621.

Chekmasova, A. A., T. D. Rao, Y. Nikhamin, K. J. Park, D. A. Levine, D. R. Spriggs and R. J. Brentjens (2010). "Successful eradication of established peritoneal ovarian tumors in SCID-Beige mice following adoptive transfer of T cells genetically targeted to the MUC16 antigen." *Clin Cancer Res* 16(14): 3594-3606.

Chen, D. S. and I. Mellman (2013). "Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle." *Immunity* 39(1): 1-10.

Chen, W. (2006). "Dendritic cells and (CD4⁺)CD25⁺ T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance." *Front Biosci* 11: 1360-1370.

Chiang, C. L., L. E. Kandalaft, J. Tanyi, A. R. Hagemann, G. T. Motz, N. Svoronos, K. Montone, G. M. Mantia-Smaldone, L. Smith, H. L. Nisenbaum, B. L. Levine, M. Kalos, B. J. Czerniecki, D. A. Torigian, D. J. Powell, Jr., R. Mick and G. Coukos (2013). "A dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad antitumor immunity: from bench to bedside." *Clin Cancer Res* 19(17): 4801-4815.

Chin, Y. E., M. Kitagawa, K. Kuida, R. A. Flavell and X. Y. Fu (1997). "Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis." *Mol Cell Biol* 17(9): 5328-5337.

Cimino-Mathews, A., E. Thompson, J. M. Taube, X. Ye, Y. Lu, A. Meeker, H. Xu, R. Sharma, K. Lecksell, T. C. Cornish, N. Cuka, P. Argani and L. A. Emens (2016). "PD-L1 (B7-H1) expression and the immune tumor microenvironment in primary and metastatic breast carcinomas." *Hum Pathol* 47(1): 52-63.

Clarke, B., A. V. Tinker, C. H. Lee, S. Subramanian, M. van de Rijn, D. Turbin, S. Kalloger, G. Han, K. Ceballos, M. G. Cadungog, D. G. Huntsman, G. Coukos and C. B. Gilks (2009). "Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss." *Mod Pathol* 22(3): 393-402.

Collaborative Group On Epidemiological Studies Of Ovarian, C., V. Beral, K. Gaitskell, C. Hermon, K. Moser, G. Reeves and R. Peto (2015). "Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant meta-analysis of 52 epidemiological studies." *Lancet* 385(9980): 1835-1842.

Comen, E., P. Wojnarowicz, V. E. Seshan, R. Shah, C. Coker, L. Norton and R. Benezra (2016). "TNF is a key cytokine mediating neutrophil cytotoxic activity in breast cancer patients." *NPJ Breast Cancer* 2: 16009.

Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* 420(6917): 860-867.

Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen and W. Zou (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* 10(9): 942-949.

Damas, J. K., A. Boullier, T. Waehre, C. Smith, W. J. Sandberg, S. Green, P. Aukrust and O. Quehenberger (2005). "Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(12): 2567-2572.

Dawson, S. J., E. Provenzano and C. Caldas (2009). "Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications." *Eur J Cancer* 45 Suppl 1: 27-40.

De Larco, J. E., B. R. Wuertz, K. A. Rosner, S. A. Erickson, D. E. Gamache, J. C. Manivel and L. T. Furcht (2001). "A potential role for interleukin-8 in the metastatic phenotype of breast carcinoma cells." *Am J Pathol* 158(2): 639-646.

DeNardo, D. G. and L. M. Coussens (2007). "Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression." *Breast Cancer Res* 9(4): 212.

Denkert, C., S. Loibl, A. Noske, M. Roller, B. M. Muller, M. Komor, J. Budczies, S. Darb-Esfahani, R. Kronenwett, C. Hanusch, C. von Torne, W. Weichert, K. Engels, C. Solbach, I. Schrader, M. Dietel and G. von Minckwitz (2010). "Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer." *J Clin Oncol* 28(1): 105-113.

Denkert, C., G. von Minckwitz, J. C. Brase, B. V. Sinn, S. Gade, R. Kronenwett, B. M. Pfitzner, C. Salat, S. Loi, W. D. Schmitt, C. Schem, K. Fisch, S. Darb-Esfahani, K. Mehta, C. Sotiriou, S. Wienert,

P. Klare, F. Andre, F. Klauschen, J. U. Blohmer, K. Krappmann, M. Schmidt, H. Tesch, S. Kummel, P. Sinn, C. Jackisch, M. Dietel, T. Reimer, M. Untch and S. Loibl (2015). "Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers." *J Clin Oncol* 33(9): 983-991.

DeSantis, C. E., F. Bray, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, B. O. Anderson and A. Jemal (2015). "International Variation in Female Breast Cancer Incidence and Mortality Rates." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24(10): 1495-1506.

Dorsey, R., N. Kundu, Q. Yang, C. S. Tannenbaum, H. Sun, T. A. Hamilton and A. M. Fulton (2002). "Immunotherapy with interleukin-10 depends on the CXC chemokines inducible protein-10 and monokine induced by IFN-gamma." *Cancer Res* 62(9): 2606-2610.

Dowsett, M., J. Cuzick, J. Ingle, A. Coates, J. Forbes, J. Bliss, M. Buyse, M. Baum, A. Buzdar, M. Colleoni, C. Coombes, C. Snowdon, M. Gnant, R. Jakesz, M. Kaufmann, F. Boccardo, J. Godwin, C. Davies and R. Peto (2010). "Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen." *J Clin Oncol* 28(3): 509-518.

Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The three Es of cancer immunoediting." *Annu Rev Immunol* 22: 329-360.

Duraiswamy, J., K. M. Kaluza, G. J. Freeman and G. Coukos (2013). "Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors." *Cancer Res* 73(12): 3591-3603.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative, G., C. Davies, J. Godwin, R. Gray, M. Clarke, D. Cutter, S. Darby, P. McGale, H. C. Pan, C. Taylor, Y. C. Wang, M. Dowsett, J. Ingle and R. Peto (2011). "Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials." *Lancet* 378(9793): 771-784.

Emens, L. A. (2012). "Breast cancer immunobiology driving immunotherapy: vaccines and immune checkpoint blockade." *Expert Rev Anticancer Ther* 12(12): 1597-1611.

Emens, L. A. (2017). "Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes." *Clin Cancer Res*.

Emens, L. A., M. Kok and L. S. Ojalvo (2016). "Targeting the programmed cell death-1 pathway in breast and ovarian cancer." *Curr Opin Obstet Gynecol* 28(2): 142-147.

Emens L A, et al. Long-term clinical outcomes and biomarker analyses of atezolizumab therapy for patients with metastatic triple-negative breast cancer: a phase 1 study. *JAMA Oncol*. 2019;5(1):74–82. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.4224.

Estevam, F. R., S. F. Augusto, S. A. Rodrigues, M. R. Pinheiro and A. F. Monteiro (2005). "Apoptosis and production of TNF-alpha by tumor-associated inflammatory cells in histological grade III breast cancer." *Cancer Immunol Immunother* 54(7): 671-676.

Farrar, M. A. and R. D. Schreiber (1993). "The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor." *Annu Rev Immunol* 11: 571-611.

Feldinger, K., D. Generali, G. Kramer-Marek, M. Gijsen, T. B. Ng, J. H. Wong, C. Strina, M. Cappelletti, D. Andreis, J. L. Li, E. Bridges, H. Turley, R. Leek, I. Roxanis, J. Capala, G. Murphy, A. L. Harris and A. Kong (2014). "ADAM10 mediates trastuzumab resistance and is correlated with survival in HER2 positive breast cancer." *Oncotarget* 5(16): 6633-6646.

Fong, A. M., H. P. Erickson, J. P. Zachariah, S. Poon, N. J. Schamberg, T. Imai and D. D. Patel (2000). "Ultrastructure and function of the fractalkine mucin domain in CX(3)C chemokine domain presentation." *J Biol Chem* 275(6): 3781-3786.

Fong, A. M., L. A. Robinson, D. A. Steeber, T. F. Tedder, O. Yoshie, T. Imai and D. D. Patel (1998). "Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow." *J Exp Med* 188(8): 1413-1419.

Fridman, J. S., E. Caulder, M. Hansbury, X. Liu, G. Yang, Q. Wang, Y. Lo, B. B. Zhou, M. Pan, S. M. Thomas, J. R. Grandis, J. Zhuo, W. Yao, R. C. Newton, S. M. Friedman, P. A. Scherle and K. Vaddi (2007). "Selective inhibition of ADAM metalloproteases as a novel approach for modulating ErbB pathways in cancer." *Clin Cancer Res* 13(6): 1892-1902.

Gao, J. L., D. B. Kuhns, H. L. Tiffany, D. McDermott, X. Li, U. Francke and P. M. Murphy (1993). "Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor." *J Exp Med* 177(5): 1421-1427.

Garcia, G. E., Y. Xia, S. Chen, Y. Wang, R. D. Ye, J. K. Harrison, K. B. Bacon, H. G. Zerwes and L. Feng (2000). "NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS." *J Leukoc Biol* 67(4): 577-584.

Garton, K. J., P. J. Gough, C. P. Blobel, G. Murphy, D. R. Greaves, P. J. Dempsey and E. W. Raines (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)." *J Biol Chem* 276(41): 37993-38001.

Gasparri, M. L., F. Bellati, C. Napoletano, P. B. Panici and M. Nuti (2013). "Interaction between Treg cells and angiogenesis: a dark double track." *Int J Cancer* 132(10): 2469.

Gaudin, F., S. Nasreddine, A. C. Donnadieu, D. Emilie, C. Combadiere, S. Prevot, V. Machelon and K. Balabanian (2011). "Identification of the chemokine CX3CL1 as a new regulator of malignant cell proliferation in epithelial ovarian cancer." *PLoS One* 6(7): e21546.

Gerlach, C., J. C. Rohr, L. Perie, N. van Rooij, J. W. van Heijst, A. Velds, J. Urbanus, S. H. Naik, H. Jacobs, J. B. Beltman, R. J. de Boer and T. N. Schumacher (2013). "Heterogeneous differentiation patterns of individual CD8+ T cells." *Science* 340(6132): 635-639.

Ghiringhelli, F., C. Menard, P. E. Puig, S. Ladoire, S. Roux, F. Martin, E. Solary, A. Le Cesne, L. Zitvogel and B. Chauffert (2007). "Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients." *Cancer Immunol Immunother* 56(5): 641-648.

Gilewski, T., S. Adluri, G. Ragupathi, S. Zhang, T. J. Yao, K. Panageas, M. Moynahan, A. Houghton, L. Norton and P. O. Livingston (2000). "Vaccination of high-risk breast cancer patients with mucin-1 (MUC1) keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS-21." *Clin Cancer Res* 6(5): 1693-1701.

Goede, V., L. Brogelli, M. Ziche and H. G. Augustin (1999). "Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1." *Int J Cancer* 82(5): 765-770.

Gong, J., N. Nikrui, D. Chen, S. Koido, Z. Wu, Y. Tanaka, S. Cannistra, D. Avigan and D. Kufe (2000). "Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity." *J Immunol* 165(3): 1705-1711.

Gooden, M. J., V. R. Wiersma, A. Boerma, N. Leffers, H. M. Boezen, K. A. ten Hoor, H. Hollema, A. M. Walenkamp, T. Daemen, H. W. Nijman and E. Bremer (2014). "Elevated serum CXCL16 is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer and may reflect pro-metastatic ADAM protease activity." *Br J Cancer* 110(6): 1535-1544.

Gough, P. J., K. J. Garton, P. T. Wille, M. Rychlewski, P. J. Dempsey and E. W. Raines (2004). "A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16." *J Immunol* 172(6): 3678-3685.

Gradishar, W. J., B. O. Anderson, R. Balassanian, S. L. Blair, H. J. Burstein, A. Cyr, A. D. Elias, W. B. Farrar, A. Forero, S. H. Giordano, M. Goetz, L. J. Goldstein, C. A. Hudis, S. J. Isakoff, P. K. Marcom, I. A. Mayer, B. McCormick, M. Moran, S. A. Patel, L. J. Pierce, E. C. Reed, K. E. Salerno, L. S. Schwartzberg, K. L. Smith, M. L. Smith, H. Soliman, G. Somlo, M. Telli, J. H. Ward, D. A. Shead and R. Kumar (2016). "Invasive Breast Cancer Version 1.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology." *J Natl Compr Canc Netw* 14(3): 324-354.

Greenwald, R. J., G. J. Freeman and A. H. Sharpe (2005). "The B7 family revisited." *Annu Rev Immunol* 23: 515-548.

Genzwürker H., Hinkelbein J., Keil J., Zimmer G. und Ackermann H. (2014). Alles fürs Examen (AllEx), Das Kompendium für die 2. ÄP Band B (2. Aufl.). Georg Thieme Verlag KG, Seiten 378-380.

Gulley, J. L., P. M. Arlen, K. Y. Tsang, J. Yokokawa, C. Palena, D. J. Poole, C. Remondo, V. Cereda, J. L. Jones, M. P. Pazdur, J. P. Higgins, J. W. Hodge, S. M. Steinberg, H. Kotz, W. L. Dahut and J. Schlom (2008). "Pilot study of vaccination with recombinant CEA-MUC-1-TRICOM poxviral-based vaccines in patients with metastatic carcinoma." *Clin Cancer Res* 14(10): 3060-3069.

Guo, J., M. Zhang, B. Wang, Z. Yuan, Z. Guo, T. Chen, Y. Yu, Z. Qin and X. Cao (2003). "Fractalkine transgene induces T-cell-dependent antitumor immunity through chemoattraction and activation of dendritic cells." *Int J Cancer* 103(2): 212-220.

Hamanishi, J., M. Mandai, M. Iwasaki, T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Yamaguchi, T. Higuchi, H. Yagi, K. Takakura, N. Minato, T. Honjo and S. Fujii (2007). "Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-

infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9): 3360-3365.

Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* 86(3): 353-364.

Haskell, C. A., M. D. Cleary and I. F. Charo (1999). "Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation." *J Biol Chem* 274(15): 10053-10058.

Haskell, C. A., M. D. Cleary and I. F. Charo (2000). "Unique role of the chemokine domain of fractalkine in cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion." *J Biol Chem* 275(44): 34183-34189.

Hedrick, J. A. and A. Zlotnik (1997). "Lymphotactin: a new class of chemokine." *Methods Enzymol* 287: 206-215.

Hernand, P., F. Pincet, S. Carvalho, H. Ansanay, E. Trinquet, M. Daoudi, C. Combadiere and P. Deterre (2008). "Functional adhesiveness of the CX3CL1 chemokine requires its aggregation. Role of the transmembrane domain." *J Biol Chem* 283(44): 30225-30234.

Hirano, F., K. Kaneko, H. Tamura, H. Dong, S. Wang, M. Ichikawa, C. Rietz, D. B. Flies, J. S. Lau, G. Zhu, K. Tamada and L. Chen (2005). "Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity." *Cancer Res* 65(3): 1089-1096.

Hodi, F. S., M. Butler, D. A. Oble, M. V. Seiden, F. G. Haluska, A. Kruse, S. Macrae, M. Nelson, C. Canning, I. Lowy, A. Korman, D. Lutz, S. Russell, M. T. Jaklitsch, N. Ramaiya, T. C. Chen, D. Neuberg, J. P. Allison, M. C. Mihm and G. Dranoff (2008). "Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(8): 3005-3010.

Hooper, N. M., E. H. Karran and A. J. Turner (1997). "Membrane protein secretases." *Biochem J* 321 (Pt 2): 265-279.

Hundhausen, C., D. Misztela, T. A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K. J. Kallen, S. Rose-John and A. Ludwig (2003). "The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion." *Blood* 102(4): 1186-1195.

Hurwitz, A. A., T. F. Yu, D. R. Leach and J. P. Allison (1998). "CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(17): 10067-10071.

Hyakudomi, M., T. Matsubara, R. Hyakudomi, T. Yamamoto, S. Kinugasa, A. Yamanoi, R. Maruyama and T. Tanaka (2008). "Increased expression of fractalkine is correlated with a better prognosis and an increased number of both CD8⁺ T cells and natural killer cells in gastric adenocarcinoma." *Ann Surg Oncol* 15(6): 1775-1782.

Ikeda, H., L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." *Cytokine Growth Factor Rev* 13(2): 95-109.

Ikejima, H., T. Imanishi, H. Tsujioka, M. Kashiwagi, A. Kuroi, T. Tanimoto, H. Kitabata, K. Ishibashi, K. Komukai, T. Takeshita and T. Akasaka (2010). "Upregulation of fractalkine and its receptor, CX3CR1, is associated with coronary plaque rupture in patients with unstable angina pectoris." *Circ J* 74(2): 337-345.

Imai, T., K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T. J. Schall and O. Yoshie (1997). "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion." *Cell* 91(4): 521-530.

Isozaki, T., T. Kasama, R. Takahashi, T. Odai, K. Wakabayashi, H. Kanemitsu, K. Nohtomi, H. T. Takeuchi, S. Matsukura and M. Tezuka (2008). "Synergistic induction of CX3CL1 by TNF alpha and IFN gamma in osteoblasts from rheumatoid arthritis: involvement of NF-kappa B and STAT-1 signaling pathways." *J Inflamm Res* 1: 19-28.

Jamieson, W. L., S. Shimizu, J. A. D'Ambrosio, O. Meucci and A. Fatatis (2008). "CX3CR1 is expressed by prostate epithelial cells and androgens regulate the levels of CX3CL1/fractalkine in the bone marrow: potential role in prostate cancer bone tropism." *Cancer Res* 68(6): 1715-1722.

Jamieson-Gladney, W. L., Y. Zhang, A. M. Fong, O. Meucci and A. Fatatis (2011). "The chemokine receptor CX(3)CR1 is directly involved in the arrest of breast cancer cells to the skeleton." *Breast Cancer Res* 13(5): R91.

Jones, B. A., M. Beamer and S. Ahmed (2010). "Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases." *Mol Interv* 10(5): 263-270.

Kandalaf, L. E., D. J. Powell, Jr., N. Singh and G. Coukos (2011). "Immunotherapy for ovarian cancer: what's next?" *J Clin Oncol* 29(7): 925-933.

Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old and R. D. Schreiber (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7556-7561.

Katanov, C., S. Lerrer, Y. Liubomirski, L. Leider-Trejo, T. Meshel, J. Bar, R. Feniger-Barish, I. Kamer, G. Soria-Artzi, H. Kahani, D. Banerjee and A. Ben-Baruch (2015). "Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF-alpha and the NF-kappaB pathway." *Stem Cell Res Ther* 6: 87.

Kiechle M., Prof. Dr. med. (2007). *Gynäkologie und Geburtshilfe* (1. Aufl.). Elsevier Urban&Fischer Verlag, Seiten 541-545 und Seiten 553-564.

Kobayashi, M., H. Kobayashi, R. B. Pollard and F. Suzuki (1998). "A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma." *J Immunol* 160(12): 5869-5873.

Koneru, M., R. O'Cearbhaill, S. Pendharkar, D. R. Spriggs and R. J. Brentjens (2015). "A phase I clinical trial of adoptive T cell therapy using IL-12 secreting MUC-16(ecto) directed chimeric antigen receptors for recurrent ovarian cancer." *J Transl Med* 13: 102.

Korobko, E. V., L. P. Saschenko, E. B. Prockhorchouk, I. V. Korobko, N. V. Gnuchev and S. L. Kiselev (1999). "Resistance to tumor necrosis factor induced apoptosis in vitro correlates with high metastatic capacity of cells in vivo." *Immunol Lett* 67(2): 71-76.

Krag, D. N., S. J. Anderson, T. B. Julian, A. M. Brown, S. P. Harlow, J. P. Costantino, T. Ashikaga, D. L. Weaver, E. P. Mamounas, L. M. Jalovec, T. G. Frazier, R. D. Noyes, A. Robidoux, H. M. Scarth and N. Wolmark (2010). "Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial." *Lancet Oncol* 11(10): 927-933.

Krishnan, V., J. S. Berek and O. Dorigo (2017). "Immunotherapy in ovarian cancer." *Curr Probl Cancer* 41(1): 48-63.

Kulbe, H., T. Hagemann, P. W. Szlosarek, F. R. Balkwill and J. L. Wilson (2005). "The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells." *Cancer Res* 65(22): 10355-10362.

Kumar, A., M. Commane, T. W. Flickinger, C. M. Horvath and G. R. Stark (1997). "Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases." *Science* 278(5343): 1630-1632.

Lavergne, E., B. Combadiere, O. Bonduelle, M. Iga, J. L. Gao, M. Maho, A. Boissonnas, P. M. Murphy, P. Debre and C. Combadiere (2003). "Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo." *Cancer Res* 63(21): 7468-7474.

Leek, R. D., C. E. Lewis, R. Whitehouse, M. Greenall, J. Clarke and A. L. Harris (1996). "Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma." *Cancer Res* 56(20): 4625-4629.

Legrier, M. E., I. Bieche, J. Gaston, A. Beurdeley, V. Yvonnet, O. Deas, A. Thuleau, S. Chateau-Joubert, J. L. Servely, S. Vacher, M. Lassalle, S. Depil, G. C. Tucker, J. J. Fontaine, M. F. Poupon, S. Roman-Roman, J. G. Judde, D. Decaudin, S. Cairo and E. Marangoni (2016). "Activation of IFN/STAT1 signalling predicts response to chemotherapy in oestrogen receptor-negative breast cancer." *Br J Cancer* 114(2): 177-187.

Lesnik, P., C. A. Haskell and I. F. Charo (2003). "Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis." *J Clin Invest* 111(3): 333-340.

Liu, G. Y., V. Kulasingam, R. T. Alexander, N. Touret, A. M. Fong, D. D. Patel and L. A. Robinson (2005). "Recycling of the membrane-anchored chemokine, CX3CL1." *J Biol Chem* 280(20): 19858-19866.

Liu, P. C., X. Liu, Y. Li, M. Covington, R. Wynn, R. Huber, M. Hillman, G. Yang, D. Ellis, C. Marando, K. Katiyar, J. Bradley, K. Abremski, M. Stow, M. Rupal, J. Zhuo, Y. L. Li, Q. Lin, D. Burns, M. Xu,

C. Zhang, D. Q. Qian, C. He, V. Sharief, L. Weng, C. Agrios, E. Shi, B. Metcalf, R. Newton, S. Friedman, W. Yao, P. Scherle, G. Hollis and T. C. Burn (2006). "Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells." *Cancer Biol Ther* 5(6): 657-664.

Liu, W. H. and L. S. Chang (2011). "Fas/FasL-dependent and -independent activation of caspase-8 in doxorubicin-treated human breast cancer MCF-7 cells: ADAM10 down-regulation activates Fas/FasL signaling pathway." *Int J Biochem Cell Biol* 43(12): 1708-1719.

Liu, X., J. S. Fridman, Q. Wang, E. Caulder, G. Yang, M. Covington, C. Liu, C. Marando, J. Zhuo, Y. Li, W. Yao, K. Vaddi, R. C. Newton, P. A. Scherle and S. M. Friedman (2006). "Selective inhibition of ADAM metalloproteases blocks HER-2 extracellular domain (ECD) cleavage and potentiates the anti-tumor effects of trastuzumab." *Cancer Biol Ther* 5(6): 648-656.

Liu, Y. L. and D. Zamarin (2018). "Combination Immune Checkpoint Blockade Strategies to Maximize Immune Response in Gynecological Cancers." *Curr Oncol Rep* 20(12): 94.

Locksley, R. M., N. Killeen and M. J. Lenardo (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* 104(4): 487-501.

Loi, S., S. Michiels, R. Salgado, N. Sirtaine, V. Jose, D. Fumagalli, P. L. Kellokumpu-Lehtinen, P. Bono, V. Kataja, C. Desmedt, M. J. Piccart, S. Loibl, C. Denkert, M. J. Smyth, H. Joensuu and C. Sotiriou (2014). "Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial." *Ann Oncol* 25(8): 1544-1550.

Long, H., R. Xie, T. Xiang, Z. Zhao, S. Lin, Z. Liang, Z. Chen and B. Zhu (2012). "Autocrine CCL5 signaling promotes invasion and migration of CD133+ ovarian cancer stem-like cells via NF-kappaB-mediated MMP-9 upregulation." *Stem Cells* 30(10): 2309-2319.

Lotzova, E., C. A. Savary, R. S. Freedman, C. L. Edwards and J. T. Wharton (1988). "Recombinant IL-2-activated NK cells mediate LAK activity against ovarian cancer." *Int J Cancer* 42(2): 225-231.

Lowes, M. A., G. A. Bishop, K. Crotty, R. S. Barnetson and G. M. Halliday (1997). "T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas." *J Invest Dermatol* 108(6): 914-919.

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

Lucas, A. D., N. Chadwick, B. F. Warren, D. P. Jewell, S. Gordon, F. Powrie and D. R. Greaves (2001). "The transmembrane form of the CX3CL1 chemokine fractalkine is expressed predominantly by epithelial cells in vivo." *Am J Pathol* 158(3): 855-866.

Lukanova, A. and R. Kaaks (2005). "Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(1): 98-107.

Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." *N Engl J Med* 338(7): 436-445.

Luster, A. D. and P. Leder (1993). "IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo." *J Exp Med* 178(3): 1057-1065.

Mantovani, A., P. Allavena, S. Sozzani, A. Vecchi, M. Locati and A. Sica (2004). "Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors." *Semin Cancer Biol* 14(3): 155-160.

Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena and A. Sica (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Trends Immunol* 23(11): 549-555.

Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, T. Schioppa, A. Saccani, P. Allavena and A. Sica (2004). "Infiltration of tumours by macrophages and dendritic cells: tumour-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Novartis Found Symp* 256: 137-145; discussion 146-138, 259-169.

Marchesi, F., M. Locatelli, G. Solinas, M. Erreni, P. Allavena and A. Mantovani (2010). "Role of CX3CR1/CX3CL1 axis in primary and secondary involvement of the nervous system by cancer." *J Neuroimmunol* 224(1-2): 39-44.

Matloubian, M., A. David, S. Engel, J. E. Ryan and J. G. Cyster (2000). "A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo." *Nat Immunol* 1(4): 298-304.

Matsubara, T., T. Ono, A. Yamanoi, M. Tachibana and N. Nagasue (2007). "Fractalkine-CX3CR1 axis regulates tumor cell cycle and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma." *J Surg Oncol* 95(3): 241-249.

Matsumiya, T., T. Imaizumi, K. Fujimoto, X. Cui, T. Shibata, W. Tamo, M. Kumagai, K. Tanji, H. Yoshida, H. Kimura and K. Satoh (2001). "Soluble interleukin-6 receptor alpha inhibits the cytokine-Induced fractalkine/CX3CL1 expression in human vascular endothelial cells in culture." *Exp Cell Res* 269(1): 35-41.

McArthur, H. L., A. Diab, D. B. Page, J. Yuan, S. B. Solomon, V. Sacchini, C. Comstock, J. C. Durack, M. Maybody, J. Sung, A. Ginsberg, P. Wong, A. Barlas, Z. Dong, C. Zhao, B. Blum, S. Patil, D. Neville, E. A. Comen, E. A. Morris, A. Kotin, E. Brogi, Y. H. Wen, M. Morrow, M. E. Lacouture, P. Sharma, J. P. Allison, C. A. Hudis, J. D. Wolchok and L. Norton (2016). "A Pilot Study of Preoperative Single-Dose Ipilimumab and/or Cryoablation in Women with Early-Stage Breast Cancer with Comprehensive Immune Profiling." *Clin Cancer Res* 22(23): 5729-5737.

McGowan, P. M., E. McKiernan, F. Bolster, B. M. Ryan, A. D. Hill, E. W. McDermott, D. Evoy, N. O'Higgins, J. Crown and M. J. Duffy (2008). "ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer." *Ann Oncol* 19(6): 1075-1081.

McGowan, P. M., B. M. Ryan, A. D. Hill, E. McDermott, N. O'Higgins and M. J. Duffy (2007). "ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression." *Clin Cancer Res* 13(8): 2335-2343.

McTiernan, A., P. Porter and J. D. Potter (2008). "Breast cancer prevention in countries with diverse resources." *Cancer* 113(8 Suppl): 2325-2330.

Mira, E., R. A. Lacalle, M. A. Gonzalez, C. Gomez-Mouton, J. L. Abad, A. Bernad, A. C. Martinez and S. Manes (2001). "A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling." *EMBO Rep* 2(2): 151-156.

Mobus, V., C. D. Gerharz, U. Press, R. Moll, T. Beck, W. Mellin, K. Pollow, P. G. Knapstein and R. Kreienberg (1992). "Morphological, immunohistochemical and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines." *Int J Cancer* 52(1): 76-84.

Moss, R. B., T. Moll, M. El-Kalay, C. Kohne, W. Soo Hoo, J. Encinas and D. J. Carlo (2004). "Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications." *Expert Opin Biol Ther* 4(12): 1887-1896.

Muenst, S., A. R. Schaerli, F. Gao, S. Daster, E. Trella, R. A. Drosner, M. G. Muraro, P. Zajac, R. Zanetti, W. E. Gillanders, W. P. Weber and S. D. Soysal (2014). "Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 146(1): 15-24.

Mukai, S., J. Kjaergaard, S. Shu and G. E. Plautz (1999). "Infiltration of tumors by systemically transferred tumor-reactive T lymphocytes is required for antitumor efficacy." *Cancer Res* 59(20): 5245-5249.

Muller, A., B. Homey, H. Soto, N. Ge, D. Catron, M. E. Buchanan, T. McClanahan, E. Murphy, W. Yuan, S. N. Wagner, J. L. Barrera, A. Mohar, E. Verastegui and A. Zlotnik (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 410(6824): 50-56.

Muller, P., M. Kreuzaler, T. Khan, D. S. Thommen, K. Martin, K. Glatz, S. Savic, N. Harbeck, U. Nitz, O. Gluz, M. von Bergwelt-Baildon, H. Kreipe, S. Reddy, M. Christgen and A. Zippelius (2015). "Trastuzumab emtansine (T-DM1) renders HER2+ breast cancer highly susceptible to CTLA-4/PD-1 blockade." *Sci Transl Med* 7(315): 315ra188.

Mulligan, A. M., I. Raitman, L. Feeley, D. Pinnaduwege, L. T. Nguyen, F. P. O'Malley, P. S. Ohashi and I. L. Andrusis (2013). "Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry." *Clin Cancer Res* 19(2): 336-346.

Mullooly, M., P. M. McGowan, S. A. Kennedy, S. F. Madden, J. Crown, O. D. N and M. J. Duffy (2015). "ADAM10: a new player in breast cancer progression?" *Br J Cancer* 113(6): 945-951.

Munk, M. E. and M. Emoto (1995). "Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections." *Eur Respir J Suppl* 20: 668s-675s.

Murphy, P. M. (1994). "The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors." *Annu Rev Immunol* 12: 593-633.

Negus, R. P., G. W. Stamp, J. Hadley and F. R. Balkwill (1997). "Quantitative assessment of the leukocyte infiltrate in ovarian cancer and its relationship to the expression of C-C chemokines." *Am J Pathol* 150(5): 1723-1734.

Negus, R. P., G. W. Stamp, M. G. Relf, F. Burke, S. T. Malik, S. Bernasconi, P. Allavena, S. Sozzani, A. Mantovani and F. R. Balkwill (1995). "The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer." *J Clin Invest* 95(5): 2391-2396.

Niwa, Y., H. Akamatsu, H. Niwa, H. Sumi, Y. Ozaki and A. Abe (2001). "Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer." *Clin Cancer Res* 7(2): 285-289.

Nuti, E., F. Casalini, S. Santamaria, M. Fabbi, G. Carbotti, S. Ferrini, L. Marinelli, V. La Pietra, E. Novellino, C. Camodeca, E. Orlandini, S. Nencetti and A. Rossello (2013). "Selective arylsulfonamide inhibitors of ADAM-17: hit optimization and activity in ovarian cancer cell models." *J Med Chem* 56(20): 8089-8103.

Odai, T., M. Matsunawa, R. Takahashi, K. Wakabayashi, T. Isozaki, N. Yajima, Y. Miwa and T. Kasama (2009). "Correlation of CX3CL1 and CX3CR1 levels with response to infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 36(6): 1158-1165.

Ogawa, M., W. G. Yu, K. Umehara, M. Iwasaki, R. Wijesuriya, T. Tsujimura, T. Kubo, H. Fujiwara and T. Hamaoka (1998). "Multiple roles of interferon-gamma in the mediation of interleukin 12-induced tumor regression." *Cancer Res* 58(11): 2426-2432.

Okazaki, T. and T. Honjo (2006). "The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance." *Trends Immunol* 27(4): 195-201.

Orre, M. and P. A. Rogers (1999). "Macrophages and microvessel density in tumors of the ovary." *Gynecol Oncol* 73(1): 47-50.

Ostuni, M. A., J. Guellec, P. Hermand, P. Durand, C. Combadiere, F. Pincet and P. Deterre (2014). "CX3CL1, a chemokine finely tuned to adhesion: critical roles of the stalk glycosylation and the membrane domain." *Biol Open* 3(12): 1173-1182.

Pardoll, D. M. (2012). "The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy." *Nat Rev Cancer* 12(4): 252-264.

Park, M. H., J. S. Lee and J. H. Yoon (2012). "High expression of CX3CL1 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating CD8+ T cells, natural killer cells, and dendritic cells in breast carcinoma." *J Surg Oncol* 106(4): 386-392.

Parker, D. C. (1993). "T cell-dependent B cell activation." *Annu Rev Immunol* 11: 331-360.

Patel, I. R., M. G. Attur, R. N. Patel, S. A. Stuchin, R. A. Abagyan, S. B. Abramson and A. R. Amin (1998). "TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha." *J Immunol* 160(9): 4570-4579.

Perez, E. A., E. H. Romond, V. J. Suman, J. H. Jeong, G. Sledge, C. E. Geyer, Jr., S. Martino, P. Rastogi, J. Gralow, S. M. Swain, E. P. Winer, G. Colon-Otero, N. E. Davidson, E. Mamounas, J. A. Zujewski and N. Wolmark (2014). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor

receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831." *J Clin Oncol* 32(33): 3744-3752.

Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, D. T. Ross, H. Johnsen, L. A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S. X. Zhu, P. E. Lonning, A. L. Borresen-Dale, P. O. Brown and D. Botstein (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 406(6797): 747-752.

Pham, D. H., J. S. Kim, S. K. Kim, D. J. Shin, N. T. Uong, H. Hyun, M. S. Yoon, S. J. Kang, Y. J. Ryu, J. S. Cho, J. H. Yoon, J. S. Lee, D. Cho, S. H. Lee and M. H. Park (2017). "Effects of ADAM10 and ADAM17 Inhibitors on Natural Killer Cell Expansion and Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity Against Breast Cancer Cells In Vitro." *Anticancer Res* 37(10): 5507-5513.

Pike, M. C. and D. V. Spicer (2000). "Hormonal contraception and chemoprevention of female cancers." *Endocr Relat Cancer* 7(2): 73-83.

Pollard, J. W. (2004). "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis." *Nat Rev Cancer* 4(1): 71-78.

Premack, B. A. and T. J. Schall (1996). "Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection." *Nat Med* 2(11): 1174-1178.

Redjimi, N., C. Raffin, I. Raimbaud, P. Pignon, J. Matsuzaki, K. Odunsi, D. Valmori and M. Ayyoub (2012). "CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity." *Cancer Res* 72(17): 4351-4360.

Reed, J. R., M. D. Stone, T. C. Beadnell, Y. Ryu, T. J. Griffin and K. L. Schwertfeger (2012). "Fibroblast growth factor receptor 1 activation in mammary tumor cells promotes macrophage recruitment in a CX3CL1-dependent manner." *PLoS One* 7(9): e45877.

Rego, S. L., R. S. Helms and D. Dreau (2014). "Breast tumor cell TACE-shed MCSF promotes pro-angiogenic macrophages through NF-kappaB signaling." *Angiogenesis* 17(3): 573-585.

Richards, F. M., C. J. Tape, D. I. Jodrell and G. Murphy (2012). "Anti-tumour effects of a specific anti-ADAM17 antibody in an ovarian cancer model in vivo." *PLoS One* 7(7): e40597.

Ritter, M., C. Huber, J. Aubock, H. Pohl-Markl, J. Troppmair, M. Herold, A. Gachter, W. Nussbaumer, G. Bock, D. Nachbaur and et al. (1994). "Lytic susceptibility of target cells to cytotoxic T cells is determined by their constitutive major histocompatibility complex class I antigen expression and cytokine-induced activation status." *Immunology* 81(4): 569-577.

Romagnani, S. (1997). "The Th1/Th2 paradigm." *Immunol Today* 18(6): 263-266.

Romero, Y., R. Wise and A. Zolkiewska (2020). "Proteolytic processing of PD-L1 by ADAM proteases in breast cancer cells." *Cancer Immunol Immunother* 69(1): 43-55.

Rosenberg, S. A. and M. E. Dudley (2009). "Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma." *Curr Opin Immunol* 21(2): 233-240.

Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." *Annu Rev Immunol* 18: 217-242.

Ruth, J. H., M. V. Volin, G. K. Haines, 3rd, D. C. Woodruff, K. J. Katschke, Jr., J. M. Woods, C. C. Park, J. C. Morel and A. E. Koch (2001). "Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis." *Arthritis Rheum* 44(7): 1568-1581.

Sabel, M. S., J. Skitzki, L. Stoolman, N. K. Egilmez, E. Mathiowitz, N. Bailey, W. J. Chang and A. E. Chang (2004). "Intratumoral IL-12 and TNF-alpha-loaded microspheres lead to regression of breast cancer and systemic antitumor immunity." *Ann Surg Oncol* 11(2): 147-156.

Sadelain, M., I. Riviere and R. Brentjens (2003). "Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes." *Nat Rev Cancer* 3(1): 35-45.

Sahin, U. and C. P. Blobel (2007). "Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM17." *FEBS Lett* 581(1): 41-44.

Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig and C. P. Blobel (2004). "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands." *J Cell Biol* 164(5): 769-779.

Saji, H., M. Koike, T. Yamori, S. Saji, M. Seiki, K. Matsushima and M. Toi (2001). "Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma." *Cancer* 92(5): 1085-1091.

Savas, P., R. Salgado, C. Denkert, C. Sotiriou, P. K. Darcy, M. J. Smyth and S. Loi (2016). "Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic." *Nat Rev Clin Oncol* 13(4): 228-241.

Schmid, P., S. Adams, H. S. Rugo, A. Schneeweiss, C. H. Barrios, H. Iwata, V. Dieras, R. Hegg, S. A. Im, G. Shaw Wright, V. Henschel, L. Molinero, S. Y. Chui, R. Funke, A. Husain, E. P. Winer, S. Loi, L. A. Emens and I. M. T. Investigators (2018). "Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer." *N Engl J Med* 379(22): 2108-2121.

Scotton, C. J., J. L. Wilson, D. Milliken, G. Stamp and F. R. Balkwill (2001). "Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors?" *Cancer Res* 61(13): 4961-4965.

Seliger, B., S. Hammers, A. Hohne, R. Zeidler, A. Knuth, C. D. Gerharz and C. Huber (1997). "IFN-gamma-mediated coordinated transcriptional regulation of the human TAP-1 and LMP-2 genes in human renal cell carcinoma." *Clin Cancer Res* 3(4): 573-578.

Sgadari, C., A. L. Angiolillo and G. Tosato (1996). "Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10." *Blood* 87(9): 3877-3882.

Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber (2001). "IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* 410(6832): 1107-1111.

Sharma, P. and J. P. Allison (2015). "Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential." *Cell* 161(2): 205-214.

Sharpe, R. J., H. R. Byers, C. F. Scott, S. I. Bauer and T. E. Maione (1990). "Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4." *J Natl Cancer Inst* 82(10): 848-853.

Shen, H., L. Li, S. Zhou, D. Yu, S. Yang, X. Chen, D. Wang, S. Zhong, J. Zhao and J. Tang (2016). "The role of ADAM17 in tumorigenesis and progression of breast cancer." *Tumour Biol*.

Shen, W. H., J. H. Zhou, S. R. Broussard, G. G. Freund, R. Dantzer and K. W. Kelley (2002). "Proinflammatory cytokines block growth of breast cancer cells by impairing signals from a growth factor receptor." *Cancer Res* 62(16): 4746-4756.

Slamon, D. J., W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich and et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science* 244(4905): 707-712.

Smith, I. E. and M. Dowsett (2003). "Aromatase inhibitors in breast cancer." *N Engl J Med* 348(24): 2431-2442.

Smyth, M. J., D. I. Godfrey and J. A. Trapani (2001). "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy." *Nat Immunol* 2(4): 293-299.

Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, E. Cretney, J. A. Trapani, M. Taniguchi, T. Kawano, S. B. Pelikan, N. Y. Crowe and D. I. Godfrey (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." *J Exp Med* 191(4): 661-668.

Soria, G., M. Ofri-Shahak, I. Haas, N. Yaal-Hahoshen, L. Leider-Trejo, T. Leibovich-Rivkin, P. Weitzenfeld, T. Meshel, E. Shabtai, M. Gutman and A. Ben-Baruch (2011). "Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNFalpha & IL-1beta with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition." *BMC Cancer* 11: 130.

Specht, K., N. Harbeck, J. Smida, K. Annecke, U. Reich, J. Naehrig, R. Langer, J. Mages, R. Busch, E. Kruse, L. Klein-Hitpass, M. Schmitt, M. Kiechle and H. Hoefler (2009). "Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy." *Breast Cancer Res Treat* 118(1): 45-56.

Stagg, J., S. Loi, U. Divisekera, S. F. Ngiow, H. Duret, H. Yagita, M. W. Teng and M. J. Smyth (2011). "Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17): 7142-7147.

Strieter, R. M., P. J. Polverini, D. A. Arenberg, A. Walz, G. Opdenakker, J. Van Damme and S. L. Kunkel (1995). "Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer." *J Leukoc Biol* 57(5): 752-762.

Strieter, R. M., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, D. Marriott and et al. (1995). "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." *J Biol Chem* 270(45): 27348-27357.

Sukkar, M. B., R. Issa, S. Xie, U. Oltmanns, R. Newton and K. F. Chung (2004). "Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN-gamma and TNF-alpha and regulation by TGF-beta and corticosteroids." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(6): L1230-1240.

Sun, L. M., Y. C. Liu, W. Li, S. Liu, H. X. Liu, L. W. Li and R. Ma (2017). "Nivolumab effectively inhibit platinum-resistant ovarian cancer cells via induction of cell apoptosis and inhibition of ADAM17 expression." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21(6): 1198-1205.

Taga, K., A. Yamauchi and E. T. Bloom (1999). "Target cell-induced apoptosis in IL-2-activated human natural killer cells." *Leuk Lymphoma* 32(5-6): 451-458.

Tardaguila, M., E. Mira, M. A. Garcia-Cabezas, A. M. Feijoo, M. Quintela-Fandino, I. Azcoitia, S. A. Lira and S. Manes (2013). "CX3CL1 promotes breast cancer via transactivation of the EGF pathway." *Cancer Res* 73(14): 4461-4473.

Thompson, C. B. and J. P. Allison (1997). "The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator." *Immunity* 7(4): 445-450.

Trabert, B., N. Wentzensen, H. P. Yang, M. E. Sherman, A. Hollenbeck, K. N. Danforth, Y. Park and L. A. Brinton (2012). "Ovarian cancer and menopausal hormone therapy in the NIH-AARP diet and health study." *Br J Cancer* 107(7): 1181-1187.

Tripsianis, G., E. Papadopoulou, K. Anagnostopoulos, S. Botaitis, M. Katotomichelakis, K. Romanidis, E. Kontomanolis, I. Tentes and A. Kortsaris (2014). "Coexpression of IL-6 and TNF-alpha: prognostic significance on breast cancer outcome." *Neoplasma* 61(2): 205-212.

Trzonkowski, P., E. Szmit, J. Mysliwska, A. Dobyszuk and A. Mysliwski (2004). "CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction." *Clin Immunol* 112(3): 258-267.

Tsang, J. Y., Y. B. Ni, S. K. Chan, M. M. Shao, Y. K. Kwok, K. W. Chan, P. H. Tan and G. M. Tse (2013). "CX3CL1 expression is associated with poor outcome in breast cancer patients." *Breast Cancer Res Treat* 140(3): 495-504.

Tsou, C. L., C. A. Haskell and I. F. Charo (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine." *J Biol Chem* 276(48): 44622-44626.

Ueno, T., M. Toi, H. Saji, M. Muta, H. Bando, K. Kuroi, M. Koike, H. Inadera and K. Matsushima (2000). "Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer." *Clin Cancer Res* 6(8): 3282-3289.

Umehara, H., E. T. Bloom, T. Okazaki, Y. Nagano, O. Yoshie and T. Imai (2004). "Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(1): 34-40.

Valdivia-Silva, J. E., J. Franco-Barraza, A. L. Silva, G. D. Pont, G. Soldevila, I. Meza and E. A. Garcia-Zepeda (2009). "Effect of pro-inflammatory cytokine stimulation on human breast cancer: implications of chemokine receptor expression in cancer metastasis." *Cancer Lett* 283(2): 176-185.

Vandercappellen, J., J. Van Damme and S. Struyf (2008). "The role of CXC chemokines and their receptors in cancer." *Cancer Lett* 267(2): 226-244.

Varfolomeev, E. E. and A. Ashkenazi (2004). "Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie?" *Cell* 116(4): 491-497.

Verleye, L., P. B. Ottevanger and I. Vergote (2009). "Surgical program building in advanced ovarian cancer: European perspective." *Gynecol Oncol* 114(2 Suppl): S10-14.

Vitale, S., B. Cambien, B. F. Karimjee, R. Barthel, P. Staccini, C. Luci, V. Breittmayer, F. Anjuere, A. Schmid-Alliana and H. Schmid-Antomarchi (2007). "Tissue-specific differential antitumour effect of molecular forms of fractalkine in a mouse model of metastatic colon cancer." *Gut* 56(3): 365-372.

von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." *Nat Immunol* 6(4): 338-344.

Vonderheide, R. H., P. M. LoRusso, M. Khalil, E. M. Gartner, D. Khaira, D. Soulieres, P. Dorazio, J. A. Trosko, J. Ruter, G. L. Mariani, T. Usari and S. M. Domchek (2010). "Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells." *Clin Cancer Res* 16(13): 3485-3494.

Weber, C. (2003). "Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules." *J Mol Med (Berl)* 81(1): 4-19.

Wendel, M., I. E. Galani, E. Suri-Payer and A. Cerwenka (2008). "Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands." *Cancer Res* 68(20): 8437-8445.

Weng, Y., S. J. Siciliano, K. E. Waldburger, A. Sirotina-Meisher, M. J. Staruch, B. L. Daugherty, S. L. Gould, M. S. Springer and J. A. DeMartino (1998). "Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors." *J Biol Chem* 273(29): 18288-18291.

Wernicke, M. (1975). "Quantitative morphologic assessment of immunoreactivity in regional lymph nodes of patients with carcinoma of the breast." *Surg Gynecol Obstet* 140(6): 919-924.

White, G. E. and D. R. Greaves (2009). "Fractalkine: one chemokine, many functions." *Blood* 113(4): 767-768.

Wimberger, P., N. Lehmann, R. Kimmig, A. Burges, W. Meier, A. Du Bois and G. Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study (2007). "Prognostic factors for complete debulking in advanced ovarian cancer and its impact on survival. An exploratory analysis of a prospectively randomized phase III study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group (AGO-OVAR)." *Gynecol Oncol* 106(1): 69-74.

Xin, H., T. Kikuchi, S. Andarini, S. Ohkouchi, T. Suzuki, T. Nukiwa, Huqun, K. Hagiwara, T. Honjo and Y. Saijo (2005). "Antitumor immune response by CX3CL1 fractalkine gene transfer depends on both NK and T cells." *Eur J Immunol* 35(5): 1371-1380.

Xu, X., X. Y. Fu, J. Plate and A. S. Chong (1998). "IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression." *Cancer Res* 58(13): 2832-2837.

Yajima, N., T. Kasama, T. Isozaki, T. Odai, M. Matsunawa, M. Negishi, H. Ide, Y. Kameoka, S. Hirohata and M. Adachi (2005). "Elevated levels of soluble fractalkine in active systemic lupus

erythematosus: potential involvement in neuropsychiatric manifestations." *Arthritis Rheum* 52(6): 1670-1675.

Yang, X., Y. Chu, Y. Wang, R. Zhang and S. Xiong (2006). "Targeted in vivo expression of IFN-gamma-inducible protein 10 induces specific antitumor activity." *J Leukoc Biol* 80(6): 1434-1444.

Yoneda, O., T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara (2000). "Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells." *J Immunol* 164(8): 4055-4062.

Zhang, L., J. R. Conejo-Garcia, D. Katsaros, P. A. Gimotty, M. Massobrio, G. Regnani, A. Makrigiannakis, H. Gray, K. Schlienger, M. N. Liebman, S. C. Rubin and G. Coukos (2003). "Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer." *N Engl J Med* 348(3): 203-213.

Zheng, X., F. Jiang, M. Katakowski, Z. G. Zhang, Q. E. Lu and M. Chopp (2009). "ADAM17 promotes breast cancer cell malignant phenotype through EGFR-PI3K-AKT activation." *Cancer Biol Ther* 8(11): 1045-1054.

Zhou, B., C. Sun, N. Li, W. Shan, H. Lu, L. Guo, E. Guo, M. Xia, D. Weng, L. Meng, J. Hu, D. Ma and G. Chen (2016). "Cisplatin-induced CCL5 secretion from CAFs promotes cisplatin-resistance in ovarian cancer via regulation of the STAT3 and PI3K/Akt signaling pathways." *Int J Oncol* 48(5): 2087-2097.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." *Immunity* 12(2): 121-127.

Zou, W. (2005). "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance." *Nat Rev Cancer* 5(4): 263-274.

Weitere Quellenangaben:

- *Statistisches Bundesamt:*

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html>

09.10.2017

<https://www->

[genesis.destatis.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=2&levelid=1601047233218&levelid=1601047195918&step=1#abreadcrumb](https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=previous&levelindex=2&levelid=1601047233218&levelid=1601047195918&step=1#abreadcrumb)

25.09.2020

<http://www.gbe-bund.de/oowa921->

[install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_2&OPINDEX=2&HANDLER=_XWD_CUBE.SETPGS&DATACUBE=_XWD_30&D.001=1000001&D.002=1000002&D.003=43&D.022=9993&D.007=9215](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_2&OPINDEX=2&HANDLER=_XWD_CUBE.SETPGS&DATACUBE=_XWD_30&D.001=1000001&D.002=1000002&D.003=43&D.022=9993&D.007=9215)

09.10.2017

- *Robert Koch Institut:*

http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html

08.03.16

http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Ovarialkrebs/ovarialkrebs_node.html

08.03.16

- *BMG Labtech:*

https://www.bmglabtech.com/fileadmin/06_Support/Download_Documents/Application_Notes/AN192.pdf

19.12.2018

8 Abkürzungen

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase=TACE
AI	Aromataseinhibitor
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
BSA	bovines Serumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DFS	Disease-free survival (krankheitsfreies Überleben)
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor (=epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Östrogenrezeptor
Eu	Europium
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OS	Overall survival (=Gesamtüberleben)
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitoren
PFS	Progression-free survival (=Progressionsfreies Überleben)
PR	Progesteron- Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RT	Raumtemperatur
s.	Siehe
s.a.	Siehe auch
s.o.	Siehe oben
TACE	TNF- α converting enzyme

TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TIL	Tumorerfiltrierende Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNMK	Triple-negatives Mammakarzinom
Ü.N.	Über Nacht
VEGF	Vascular endothelial growth factor (= vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Viktor Magdolen sowie auch dem verstorbenen Prof. Manfred Schmitt danke ich für die Möglichkeit, in ihrem Arbeitskreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen.

Vor allem möchte ich meinem Betreuer Herrn PD Dr. Holger Bronger danken für die anspruchsvolle und interessante Promotions-Thematik, seine stete Hilfsbereitschaft und kameradschaftliche Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe sowie für seine hervorragende Betreuung während der gesamten Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Tobias Dreyer für die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit. Seine unzähligen Bemühungen, aufbauenden Worte und unermüdliche Hilfsbereitschaft in allen kleinen und großen Fragen, die sich bei der Bearbeitung des Themas aufgetan haben, haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich bei Claudia Windmüller, Anke Bengge, Joachim Hornung, Daniela Zech-Bielwaski und Sabine Kuhn bedanken, die mich während meiner Arbeit im Labor mit vielen technischen Ratschlägen und lieben Worten begleitet haben.

Frau Dr. Daniela Schilling aus der Forschergruppe der Klinik für Strahlentherapie (TU München) danke ich für die freundliche Bereitstellung der in den Lyseassay verwendeten natürlichen Killerzellen, sowie für die Einführung in den Eu-Assay, die mir ermöglicht hat, diesen in unserem Labor selbst mit zu etablieren.

Ein besonderer Dank möchte ich auch meinen Eltern, Robert Jelsma und Marie-France Jelsma-Freistroffer aussprechen, die mir dieses Studium erst ermöglicht und mich in allen Lebenslagen immer unterstützt und zur Durchführung dieser Arbeit ermutigt haben.

Auch meinem Lebenspartner Ben Schram gebührt ein großer Dank für seine stete Geduld, unermüdlichen Zusprüche und Unterstützung während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation.

Für viele fruchtbare Gespräche und Anregungen möchte ich meinen Freunden aus dem Studium danken. Wir haben uns gegenseitig während dieser intensiven Zeit stets unterstützt.

Nicht zuletzt möchte ich jedem Menschen, der hier nicht namentlich erwähnt wird, und dennoch einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat, meinen großen Dank aussprechen.