

Christine Loebel  
Dr. med.

## **Charakterisierung humaner Mammakarzinomzellen hinsichtlich ihres Potenzials zur Sekretion proinflammatorisch aktiver Zytokine**

Geboren am 14.01.1984 in Darmstadt  
Staatsexamen am 22.11.2010 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Frauenheilkunde  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Eichbaum

### **Hintergrund:**

Das Mammakarzinom ist mit jährlich 57.000 neu erkrankten Frauen sowohl die häufigste Krebserkrankung als auch die am häufigsten zum Tode führende Krebsart bei Frauen in der Bundesrepublik Deutschland. Die Metastasierung des Mammakarzinoms erfolgt auf lymphogenem und hämatogenem Weg. Eine besonders schwierige Behandlungssituation ergibt sich insbesondere nach gesicherter Fernmetastasierung. Die mediane Lebenserwartung nach Auftritt von hepatischen Filiae beträgt 14 Monate.

Neuere Erkenntnisse weisen auf Parallelen zwischen der Pathophysiologie inflammatorischer Prozesse und der malignen Progression solider Tumoren hin. Insbesondere durch die Induktion eines proinflammatorischen zytokinhaltigen Mikromilieus soll die Metastasierung von Tumoren begünstigt werden. Eine Schlüsselrolle scheint hierbei ortsständigen und/oder tumor-assoziierten Makrophagen zuzukommen, die durch die Sekretion von *TNF- $\alpha$*  die Expression des endothelialen Adhäsionsmoleküls E-Selektin induzieren. E-Selektin vermittelt die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelien und leistet damit einen entscheidenden Beitrag zur Extravasation in distantes Gewebe.

Von Interesse ist, welche Zytokine Mammakarzinomzellen sezernieren und ob die Anwesenheit von Mammakarzinomzellen die *TNF- $\alpha$* -Sekretion durch Makrophagen induzieren kann.

### **Wissenschaftliche Fragestellung/Zielsetzungen:**

1. Stimulierung von ANA-I Makrophagen mit Überständen von Mammakarzinomzelllinien: Beeinflussen die Überstände der Tumorzellen die Produktion des proinflammatorischen Zytokins *TNF- $\alpha$*  in ANA-I Makrophagen?
2. Charakterisierung des Sekretionsmusters proinflammatorischer Zytokine durch Mammakarzinomzellen: Gibt es ein bestimmtes Zytokinsekretionsmuster oder bestimmte Zytokine, die von allen drei Zelllinien sezerniert werden bzw. gibt es wesentliche Unterschiede im Sekretionsmuster?
3. Quantitativer Vergleich der Sekretion ausgewählter proinflammatorischer Zytokine durch Mammakarzinomzellen: Gibt es quantitative Unterschiede hinsichtlich einzelner, stark sezernierter Zytokine zwischen den drei Tumorzelllinien?
4. Lassen sich Aussagen über die Korrelation der durch die Tumorzellen sezernierten Zytokine und die Produktion von *TNF- $\alpha$*  durch die stimulierten Makrophagen treffen?

## Materialien und Methoden:

Drei Mammakarzinomzelllinien mit unterschiedlichem metastatischem Potential (ZE, KM22, 1590) sowie eine humane Mammaepithelzelle (HMEC) wurden unter standardisierten Bedingungen in Kultur genommen und vier Tage lang bei 37,5°C inkubiert. ANA-I-Makrophagen wurden in einer 6-Lochplatte bei 37°C inkubiert. Konditionierte Medien der kultivierten Tumorzellen wurden zu einer Suspension von ANA I-Makrophagen gegeben. Mittels ELISA (R&D Systems, UK) wurde die Konzentration an TNF- $\alpha$  im Zellüberstand vor Zugabe der konditionierten Medien, sowie jeweils 6h, 8h und 12 h danach gemessen. Anschließend wurde für die Tumorzellen sowie die Humane Mammaepithelzelle mittels eines Human Cytokine Antibody Arrays (RayBio®, USA), das den Nachweis von 42 verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen in Zellüberständen erlaubt, ein semiquantitatives Zytokinsekretionsprofil erstellt. Besonders stark exprimierte Zytokine (*MCP-1*, *IL-6*, *RANTES*) wurden mittels ELISA (RayBio®, USA) quantifiziert.

## Ergebnisse:

1. Die basale durch unstimulierte ANA-I-Makrophagen produzierte TNF- $\alpha$ -Konzentration im eingesetzten Modell lag bei durchschnittlich 0,03 ng/ml. Nach Inkubation der ANA-I-Makrophagen mit konditionierten Medien der drei Tumorzelllinien war nach 8h ein deutlicher Anstieg der basalen TNF- $\alpha$  Konzentration zu messen (ZE: 1,9fach; 1590: 4,9fach; KM22 1,9fach).
2. Zwischen den Tumorzellen 1590, KM22 und ZE ergaben sich deutliche Unterschiede bezüglich des Zytokinsekretionsmusters. Semiquantitativ zeigte sich bei allen drei Tumorzelllinien eine unterschiedlich starke Sekretion der an entzündlichen Prozessen beteiligten Zytokine *MCP-1*, *IL-8*, *EGF*, *VEGF* und *M-CSF*. Zudem wies die Zelle 1590 eine starke Sekretion von vor allem *RANTES* und *GRO* auf. Die Zelle KM22 sezernierte überdurchschnittlich stark *GRO*, *IL-6*, *ENA-78*, *GRO- $\alpha$* , *GM-CSF* und *Leptin*.
3. Im Gegensatz zu den Tumorzellen zeigte sich bei der semiquantitativen Untersuchung der humanen Mammaepithelzelle die Sekretion von *GRO*, *EGF*, *IL-8*, *GRO- $\alpha$* , *RANTES* und eine schwache Sekretion von *VEGF*.
4. Die Quantifizierung ausgewählter Zytokine zeigte deutliche Konzentrationsunterschiede zwischen den Tumorzellen und der Humanen Mammaepithelzelle:

*MCP-1*: 237,6 pg/ml (1590), 80,7 pg/ml (KM22), 28,5 pg/ml (ZE),  
0 pg/ml (HMEC)

*IL-6*: 44,66pg/ml (1590), 21384pg/ml (KM22), 0 pg/ml (ZE), 0pg/ml (HMEC)

*RANTES*: 797 pg/ml (1590), 18,715 pg/ml (KM22), 48,44pg/ml (ZE),  
9,698 pg/ml (HMEC)

## Schlussfolgerung:

1. Tumorzellen stimulieren die TNF- $\alpha$  Sekretion durch Makrophagen
2. Humane Mammakarzinomzellen sezernieren proinflammatorische Zytokine in unterschiedlichen Pattern und induzieren dadurch ein spezifisches proinflammatorisches Mikromilieu; Mammaepithelzellen hingegen sezernieren nur wenige Zytokine
3. Die Ergebnisse stützen die Hypothese, dass das von Mammakarzinomzellen induzierte proinflammatorische Mikromilieu durch die Stimulation der TNF- $\alpha$ -Sekretion aus Makrophagen die Expression des endothelialen Adhäsionsmoleküls E-Selektin fördert. Weitere Untersuchungen müssen klären, inwieweit die jeweiligen lokal sezernierten Zytokine die Metastasierung von Mammakarzinomzellen direkt promovieren. Dies könnte interessante neue Ansätze für zielgerichtete Therapiestrategien darstellen.