

Anne Sophie Meyer
Dr. med.

Untersuchungen zur Hemmung der E-Selectin-vermittelten Adhäsion von Mammakarzinomzellen am HUVEC-Monolayer-Modell

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

Das metastasierte Mammakarzinom gilt nach wie vor als unheilbar. Das Auftreten von Lebermetastasen eines Mammakarzinoms ist mit einer signifikanten Verschlechterung der Prognose der Patientin assoziiert, das mediane Überleben liegt bei 14 Monaten.

Für das im Rahmen von Entzündungen aktive endotheliale Adhäsionsmolekül E-Selectin wird eine zentrale Funktion im Rahmen der hämatogenen Metastasierung verschiedener Karzinome diskutiert. Die Interaktion im Blut zirkulierender Tumorzellen mit endotheliale E-Selectin ist möglicherweise ein wichtiger Schritt im Rahmen der hämatogenen, insbesondere der hepatischen Metastasierung. Zum Mammakarzinom sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen nur unzureichend geklärt. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass das Antihistaminikum Cimetidin die Adhäsion von Kolonkarzinomzellen an E-Selectin hemmen und zu einer Reduktion von Lebermetastasen führen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, an einem selbst etablierten HUVEC-Monolayermodell die Wirkung von Anti-E-Selectin-Antikörper sowie von Cimetidin auf das Adhäsionsverhalten der eingesetzten Mammakarzinomzellen an Endothelzellen zu untersuchen.

Eingesetzt wurden drei aus Tumorbiopsaten entwickelte, charakterisierte Zelllinien (ZE, 1590, KM22). Diese wurden zunächst mittels monoklonaler Antikörper in Hinblick auf die Expression der E-Selectin-Liganden Sialyl-Lewis^a und Sialyl-Lewis^x immunhistochemisch charakterisiert.

Zur Etablierung eines Monolayermodells wurden humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVECs) bis zum Erreichen der Subkonfluenz in Lab Tek II Chamber slides kultiviert. Nach variierender Stimulation der Endothelzellen mit TNF- α wurde zunächst die E-Selectin-Expression an der Oberfläche der Endothelzellen immunhistochemisch überprüft. Anschließend wurde das Adhäsionsverhalten der eingesetzten Tumorzelllinien an aktivierten Endothelzellen untersucht. Zur Beurteilung der Adhäsion wurden diese mit dem *Cell tracker* CMFDA fluoreszenzmarkiert.

In einem nächsten Ansatz wurden die aktivierten Endothelzellen zur selektiven Blockade des exprimierten E-Selectins mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert und anschließend die Adhäsion der eingesetzten Tumorzellen über Messung der Fluoreszenzintensität quantifiziert. Durch vorherige Behandlung der Endothelzellen mit dem Antihistaminikum Cimetidin in nicht-zytotoxischen Konzentrationen (10^{-5} M und 10^{-6} M) wurde dessen Wirkung auf die E-Selectin-Expression und auf das Adhäsionsverhalten der eingesetzten Tumorzellen untersucht. Auch hier wurde die Adhäsion über die Messung der Fluoreszenzintensität quantifiziert.

Auf allen eingesetzten Mammakarzinomzelllinien waren Sialyl-Lewis^a-Gruppen erkennbar. Auf den Zelllinien KM22 und ZE ließen sich immunhistochemisch auch Sialyl-Lewis^x-Gruppen nachweisen. Die maximale E-Selectin-Expression an der Oberfläche der Endothelzellen wurde nach zweistündiger Inkubation mit 5 ng/ml TNF- α beobachtet. Alle drei untersuchten Mammakarzinomzelllinien zeigten nach zweistündiger Inkubation mit 5 ng/ml TNF- α eine deutliche Adhäsion am Endothel.

Durch Inkubation der Endothelzellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen E-Selectin ließ sich die Adhäsion von allen drei Zelllinien deutlich reduzieren. Neben der Verringerung der Adhäsion um durchschnittlich 61,5% bei der Zelllinie 1590 und um 67,9% bei der Zelllinie KM22 konnte die Adhäsion der ZE-Tumorzellen sogar um durchschnittlich 78,9% reduziert werden.

Auch die Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem Antihistaminikum Cimetidin konnte sowohl eine Verringerung der E-Selectin-Expression als auch eine Reduktion der Adhäsion bei allen drei Zelllinien beobachtet werden. So wurde die Adhäsion der Zelllinie 1590 durch 10^{-6} M Cimetidin um 15,8% reduziert. Eine Reduktion der Adhäsion von 42,5% durch 10^{-5} M und von 39,7% durch 10^{-6} M konnte bei der Zelllinie ZE gemessen werden. Bei der Zelllinie KM22 zeigte sich sogar eine Verringerung der Adhäsion um 43,6% durch 10^{-5} M und um 40,3% durch 10^{-6} M Cimetidin.

Das Adhäsionsmolekül E-Selectin vermittelt die Adhäsion von Mammakarzinomzellen an Endothelzellen. Dieser Prozeß ist wirksam durch spezifische Antikörper blockierbar. Durch das Antihistaminikum Cimetidin kann sowohl die E-Selectin-Expression auf Endothelzellen als auch die Adhäsion von Mammakarzinomzellen an diesen reduziert werden. Möglicherweise ließe sich auf diese Weise eine Limitierung maligner Progression und distanter Metastasierung erreichen. Ob sich hieraus tatsächlich ein therapeutisch nutzbares Prinzip ableiten lässt, muß in weiteren Studien untersucht werden.