

Stefanie Zell
Dr. sc. hum

Verminderung der Komplementresistenz von Tumorzellen nach gezielter Expressionshemmung der membranständigen Komplementregulatoren (mCRPs) durch DNA Antisense-Oligonukleotide und siRNA

Geboren am 31.05.69 in Siegen
Diplom der Fachrichtung Humanbiologie am 22.09.98 an der Universität Marburg

Promotionsfach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. Michael Kirschfink

Neue Therapieansätze zur Behandlung von Tumorerkrankungen basieren auf der Gabe von tumorspezifischen, monoklonalen Antikörpern. Trotz ermutigender Ergebnisse wurde deutlich, dass die Wirksamkeit dieser Antikörper-Therapien durch verschiedene „immune-escape“-Mechanismen der Tumorzellen limitiert wird.

Zu diesen Mechanismen gehört die Komplementresistenz der entarteten Zellen, die eine zur Zellzerstörung führende Aktivierung des humoralen Kaskadensystems verhindert.

Normale Körperzellen exprimieren membrangebundene Komplementregulatoren (mCRPs: CD55, CD46 und CD59) zum Schutz gegenüber „zufälligen“ Komplementangriffen. Bei einer neoplastischen Zelltransformation kommt es häufig, möglicherweise auf Grund eines entsprechenden Selektionsdrucks, zu einer Überexpression von einem oder mehreren dieser Komplementregulatoren. Aus diesem Grund weisen Tumorzellen in der Regel eine ausgeprägte Komplementresistenz auf.

In der Vergangenheit wurde vielfach gezeigt, dass neoplastische Zellen durch Neutralisierung von CD55, CD46 und/oder CD59 gegenüber Komplement sensibilisiert werden können. Dies wurde durch unterschiedliche Methoden demonstriert, wie beispielsweise durch blockierende Antikörper, durch enzymatische Entfernung der Regulatorproteine oder durch Zytokin-induzierte Verminderung der mCRP Expression.

Antisense-Technologien stellen eine weitere, bis heute nur in wenigen Studien beschriebene Alternative dar, Tumorzellen durch gezielte Expressionshemmung der einzelnen Komplementregulatoren gegenüber Komplement zu sensibilisieren. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde daher die seit 1978 bekannte DNA-Antisense-Technologie und die erst seit 2001 etablierte siRNA-Technologie angewendet, um die Synthese von CD55, CD46 und/oder CD59 in Tumorzellen wirkungsvoll zu inhibieren.

Zunächst wurde eine Vielzahl von möglichen Antisense-Molekülen auf ihre inhibitorische Aktivität hin überprüft. Dabei konnten potente DNA-Antisense-Oligonukleotide zur

Synthesehemmung von CD55 und CD46 und siRNAs zur Synthesehemmung von CD55, CD46 und CD59 etabliert werden.

Real Time RT-PCR Analysen zeigten, dass alle aktiven Antisense-Moleküle die Degradierung ihrer jeweils komplementären mRNA induzieren, d.h. die Hemmung der Zielprotein-Expression resultiert aus einer verminderten Anzahl der entsprechenden mRNA-Transkripte und ist nicht die Folge einer sterischen Blockade der Protein-Translation. Dies deutet bei DNA-Antisense-Oligonukleotiden auf einen RNaseH-abhängigen Wirkungsmechanismus hin und bei siRNA auf eine mRNA-Degradierung durch den sogenannten „RISC“-Komplex.

Beim Vergleich der beiden Antisense-Technologien wurde deutlich, dass siRNAs möglicherweise Vorteile gegenüber DNA-Antisense-Oligonukleotiden aufweisen. 1) Die Erfolgsquote beim screening potentiell aktiver Antisense-Moleküle lag bei siRNA wesentlich höher. 2) Weniger als 1/10 der benötigten DNA-Oligonukleotid-Konzentration war bei siRNA ausreichend, um eine vergleichbare Hemmung der Zielprotein-Synthese zu erreichen. 3) Die Transfektion von siRNA bewirkte im Gegensatz zu DNA-Antisense-Oligonukleotiden kaum toxische und proliferationshemmende Effekte.

Die funktionelle Relevanz der mCRP Hemmung auf Tumorzellen durch DNA-Antisense-Oligonukleotide bzw. siRNAs wurde durch Messung der Komplement-abhängigen Zytolyse und C3-Bindungsstudien bewertet. Dabei zeigten sich starke individuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Tumorzelllinien, aber insgesamt bewirkte die Synthesehemmung der einzelnen Komplementregulatoren eine deutliche Verminderung der tumorspezifischen Komplementresistenz. Durch kombinierte Expressionshemmung der Regulatorproteine konnten additive Effekte erzielt werden.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass beide Antisense-Technologien eine effektive Methode darstellen, um durch Expressionshemmung der membrangebundenen Komplementregulatoren, Tumorzellen gegenüber Komplement zu sensibilisieren. Da sowohl DNA-Antisense-Oligonukleotide als auch siRNAs in vivo angewendet werden können, bietet die dargestellte Antisense-Strategie eine mögliche Alternative, um die Effizienz einer Antikörper- und Komplement-basierten Immuntherapie von Tumoren zu verbessern.