Marc Leonhard Cinci

Spezifisches „Targeting“ von Tumorzellen:
Zielgerichtete Expressionshemmung humaner membranständiger Komplement-regulatoren (mCRP) zur Überwindung der Komplementresistenz von CD71 hoch-exprimierenden Tumorzellen

Promotionsfach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. Michael Kirschfink

Komplement als hochkomplexes Proteinkaskadensystem ist ein wesentlicher Bestandteil der humoralen Immunsystems. Es kann sehr effizient Entzündungsreaktionen hervorrufen sowie eine zytotoxische Immunantwort einleiten. Körpereigene Zellen besitzen deshalb verschiedene Faktoren und Mechanismen, um sich vor der zerstörerischen Kraft einer unkontrollierten Komplementaktivierung zu schützen. Dazu gehören neben membranständigen auch lösliche Komplementregulatoren, wie zum Beispiel C1-Inhibitor, Faktor H, Faktor I, Vitronektin oder Clusterin.
Maligne Tumore entwickeln im Laufe ihrer Entstehung zahlreiche „Escape-Mechanismen“, um sich einer Zerstörung durch das Immunsystem zu entziehen. Ein wesentlicher Resistenzmechanismus gegen eine Komplement-vermittelte Zerstörung ist die (Über-) Expression membranständiger Komplement-Regulatorproteine (mCRPs; CD46, CD55 und CD59) von Tumorzellen. Hierbei scheint vor allem der hohe Selektionsdruck während der neoplastischen Transformation zu deren Überexpression zu führen.
Die Bedeutung dieser Resistenz zeigt sich vor allem bei der therapeutischen Behandlung maligner Tumore mit tumorspezifischen, monoklonalen Antikörpern. Diese Immuntherapie hat sich im Laufe der Zeit in die Reihe der Standardtherapien von Tumorerkrankungen eingegliedert. Tumorgerichtete Antikörper führen zu einer Aktivierung sowohl von zellulären als auch humoralen Effektorfunktionen des Immunsystems und besitzen dadurch ein beträchtliches zerstörerisches bzw. therapeutisches Potential. Jedoch limitieren diverse Resistenzmechanismen, insbesondere die Überexpression der Komplement-Regulatorproteine, die klinischen Möglichkeiten und Erfolge dieses Behandlungskonzeptes.
In den vergangenen Jahren konnte durch die Blockade der membranständigen Komplementregulatoren eine Sensibilisierung maligner Zellen gegenüber einer Komplementattacke herbeigeführt werden.
Ziel der vorliegenden Dissertation war es, durch die Verwendung modifizierter siRNA-Moleküle eine effektive Expressionshemmung der membranständigen Komplement-regulatoren CD46, CD55 und CD59 auf Tumorzellen herbeizuführen, um damit die Suszeptibilität der Tumorzellen gegenüber einer Komplement-vermittelter Zytolyse zu erhöhen.
In verschiedenen Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Geweben (Kolon-, Prostata-, Brust-karzinom und myelozytische Leukämie-Zellen) führte der Einsatz von siRNA zu einer Reduktion von CD46 um bis zu 96%, von CD55 um bis zu 93% und von CD59 um bis zu 90%. Anschließende funktionelle Analysen belegten sowohl eine deutlich gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber der Komplement-vermittelten Zytolyse als auch eine vermehrte Opsonisierung durch die Bindung von C3-Spaltprodukten auf deren Zelloberfläche.
Das Hauptaugenmerk dieser Dissertation lag auf der Entwicklung eines effektiven Transportsystems für das spezifische „Targeting“ von Tumorzellen mit siRNA-Molekülen. Dies ist notwendig, da eine systemische Applikation von siRNA-Molekülen gegen Komplementregulatoren ebenfalls gesunde Zellen gegenüber einer Komplement-vermittelten Zytolyse sensibilisieren. Ausgangsmaterial für dieses Transportsystem waren kationische

Lipoplex-Strukturen, an die sich negativ geladenen siRNA-Moleküle durch elektrostatische Wechselwirkungen effizient anlagern. Aufgrund ihrer kationischen Nettoladung kam es zwar zu einer effizienten, aber unspezifischen Bindung und Internalisierung der siRNA-Liposomen an die Tumorzellen. Durch Inkubation mit EDTA gelang es die kationischen Lipid-Ladungen zu neutralisieren, wodurch die unspezifische Bindung nahezu vollkommen aufgehoben wurde. Um ein zellspezifisches „Targeting“ zu erreichen, wurde Transferrin als Ligand für den auf Tumorzellen hochexprimierten Transferrinrezeptor (CD71) an die siRNA-Liposomen gebunden.
Mit Hilfe dieser liposomalen „Targeting“-Konstrukte konnten die Regulator-spezifischen siRNA-Moleküle zielgerichtet in verschiedene CD71 hochexprimierende Tumorzelllinien eingeschleust werden. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen konnte die Expression der Komplementregulatoren um bis zu 57% stärker gehemmt werden.
In den funktionellen Analysen der mCRP-defizienten Tumorzellen zeigte sich sowohl eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der Komplement-vermittelten Zytolyse (bis zu 63% gesteigerte CDC), als auch eine vermehrte Opsonisierung durch die Ablagerung von C3-Spaltprodukten auf deren Zelloberfläche (CD46: +163%, CD55: +235%). Aufgrund der deutlich niedrigeren Bindung der neutralen Transferrin-siRNA-Liposomen an die Kontrollzellen werden diese weitgehend geschützt.
Mit diesem *in vitro* Modell konnte die Spezifität und Effektivität von siRNA-beladenen Tranferrin-Lipsomen zur zielgerichteten Tumorlyse und Opsonisierung eindrücklich dargestellt werden. Die zielgerichtete Hemmung von Komplementregulatoren ausschließlich in Tumorzellen eröffnet die Möglichkeit einer adjuvanten Therapie zur Verbesserung der Antikörper-basierten Tumor-Immuntherapie in der Klinik.