



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Über den Nachweis funktioneller Antikörper aus Tumor-assoziierten Makrophagen

Autor: Lukas Ries
Institut: Institut für klinische Chemie
Doktorvater: Prof. Dr. M. Neumaier

Einleitung

Untersuchungen in Entzündungsherden haben kürzlich gezeigt, dass Subpopulationen von Granulozyten und Makrophagen in der Lage sind, rearrangierte variable Immunrezeptoren zu exprimieren. Aktuelle Vorarbeiten zeigen, dass derartige myeloide Zellen auch in Tumoren vorkommen. Aufgabe dieser Arbeit war die Identifikation und Sequenzierung korrespondierender Schwer- und Leichtketten mithilfe einer Single-Cell-PCR in einzelnen TAM als Voraussetzung für eine spätere rekombinante Expression.

Material und Methoden

Im ersten Schritt wurden aus verschiedenen Tumorgeweben eine hoch-selektive Zellvereinzelung vorgenommen. Dies geschah u.a. mittels MACS von CD14 positiven Zellen mit anschließender Zellvereinzelung unter dem Mikroskop einzelner markierter Zellen.

Diese Zellen wurden dann im zweiten Schritt einer Single-Cell-PCR zugeführt und bei entsprechender Expression wurde die Sequenzierung durchgeführt.

Ebenso wurde eine Primeranalyse mittels MALDI-TOF durchgeführt.

Ergebnisse

Insgesamt konnten nach extensiver methodischer Validierung 106 einzelne Zellen verschiedener Tumor-Entitäten so untersucht werden. Dabei konnten 9 Schwerekettensequenzen und 2 Leichtkettensequenzen erfolgreich sequenziert werden. Die Sequenzierung eines vollständigen Antikörpers (Schwer- und Leichtkette einer einzelnen Zelle) gelang nicht. Es erfolgte eine umfassende Analyse der erhaltenen Sequenzen u.a. auf deren phylogenetisches Alter, Lokalisation auf dem entsprechenden chromosomalen Locus und Häufigkeit der genutzten Gene.

Diskussion

Die Ergebnisse können im Rahmen der methodischen Validierung von Einzelzellanalysen zur Klonierung/Sequenzierung von Antikörperexpression, die für die Verbesserung der Robustheit der erforderlichen molekularen Verfahren eingesetzt werden. Daneben erbringt die Arbeit einen weiteren Beleg für die Expression variabler Immunrezeptoren (hier Antikörper) in nicht-lymphatischen Zellen. Es konnte die Expression von funktionellen Immunglobulin Schwer- und Leichtketten in Tumor-assoziierten Makrophagen gezeigt werden. Die Sequenzierung von sowohl Schwer- als auch Leichtkette aus einem einzelnen Tumor-assoziierten Makrophagen und damit der Nachweis eines vollständigen Antikörpers war jedoch nicht möglich.

In den hier vorgestellten Sequenzdaten von neun Schwerekettensequenzen aus Tumor-assoziierten Makrophagen eines Hepatozellulären Karzinoms und zwei Leichtkettensequenzen aus einem Kolonkarzinom zeigte sich ein eingeschränktes Repertoire der rekombinierten V-Gene. Die Ursache dieser Einschränkung bleibt unklar, jedoch scheint unter anderem weder die chromosomale Lage noch das phylogenetische Alter der V-Gene eine Rolle bei deren Auswahl zu spielen.

Um nicht nur die Ursache des eingeschränkten Repertoires und die funktionelle Bedeutung dieser Antikörper zu klären, sondern auch um diese Subpopulation der myeloiden Zellreihe besser zu charakterisieren, sind weitere Untersuchungen an größeren Zellzahlen nötig.