

Helena Garcia-Huttenlocher
Dr. med.

Einfluss von Zytokinen auf die Komplementresistenz von Mammakarzinomzellen

Geboren am 09.12.1974 in Valencia
Staatsexamen am 19.11.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. vet. M. Kirschfink

In den letzten Jahren hat uns die Forschung durch moderne Technologien, die auf die Quantifizierung von Komplementspaltprodukten oder Proteinkomplexen zielen, einen verständlichen Einblick in die verschiedenen Aktivierungsstadien und Wirkungsweisen des Komplementsystems verschafft. Seit langem ist bekannt, dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle in der zytotoxischen Immunreaktion spielt und durch ein komplexes System von aktivierenden und hemmenden Substanzen im Gleichgewicht gehalten wird. Die Rolle dieser Regulatoren bei der Immunantwort gegen Tumoren und der Sensibilisierung von Tumorzellen gegen das Immunsystem wird zurzeit untersucht. Um eine effektive Anti-Tumor-Therapie entwickeln zu können, sind genauere Kenntnisse über die Rolle der Komplementregulatoren auf Tumorgewebe notwendig. Die meisten Tumoren sind mit Immunkomplexen und Komplementaktivierungsprodukten infiltriert. Die Tumorzellen scheinen jedoch durch verschiedene Strategien eine Resistenz gegenüber dem homologen Komplementsystem entwickelt zu haben. Diese Strategien werden in zwei Kategorien eingeteilt: basale und induzierte Mechanismen. Die basalen Mechanismen werden spontan von Zellen exprimiert, ohne eine vorangegangene Aktivierung, während induzierte Mechanismen in Zellen entstehen, die einer Modulation ausgesetzt wurden, z.B. Zytokinen, Medikamenten oder sublytischen Komplement und anderen Porenbildnern.

Gegenstand dieser Arbeit waren die membranassoziierten Komplementregulatoren (mCRPs) CD55 (Decay-Accelerating Factor), CD46 (Membrane Cofactor Protein) und CD59 (Protectin), die einen wichtigen basalen Schutzmechanismus der Tumorzellen darstellen und autologe Zellen unempfindlich gegenüber dem Angriff durch das Komplementsystem machen. Diese Komplementregulatoren scheinen auf Tumorzellen, im Vergleich zum Normalgewebe, überexprimiert zu werden.

Mittels zytofluorometrischer Analyse wurde die Expression der o.g. Proteine auf den zwei Mammakarzinom-Zelllinien BT474 und T47D im Grundzustand und deren Regulation durch die Zytokine IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ , TGF- β und TNF- α untersucht. Dazu wurde die komplementabhängige Lyse in einem nichtradioaktiven Zytotoxizitäts-Test, dem Europium-Test, sowie die mCRP-Expression gemessen. Zusätzlich zu den Zytokinen wurde auch der Effekt des Proteinkinase-C-Aktivators PMA und des Proteinkinase-C-Inhibitors Calphostin C auf die komplementabhängige Lyse untersucht.

Wir konnten auf beiden Zelllinien die Expression von CD59, CD55 und CD46 nachweisen. Die Inkubation mit den oben genannten Zytokinen bewirkte, mit Ausnahme von IFN- γ , eine signifikante Abnahme der komplementvermittelten Lyse auf beiden Zelllinien. Bei den T47D-Zellen war diese erhöhte Resistenz gegen die komplementvermittelte Lyse häufiger mit einer signifikanten Erhöhung der Expression einer oder mehrerer mCRPs verbunden als bei den BT474-Zellen. Dies deutet auf das Vorhandensein weiterer Mechanismen der Immunresistenz hin. Unsere Ergebnisse haben nun auch für Mammakarzinomzellen bestätigt, dass sie ebenfalls Mechanismen zum Lyseschutz nutzen und dass diese durch Zytokine reguliert werden können. Es ist zu erwarten, dass in der begleitenden Entzündungsreaktion um das Tumorgewebe erhöhte Zytokinkonzentrationen herrschen. Manche Tumoren exprimieren

diese Zytokine selbst und unterhalten damit evtl. diese Entzündungsreaktion, die zu einem verstärkten Schutz vor der komplementvermittelten Lyse führt.

Die Stimulation mit PMA führte bei den T47D-Zellen zu einer Lysesenkung, bei den BT474-Zellen hatte sie keinen Effekt. Die Blockierung der Proteinkinase C (PKC) hatte bei beiden Zelllinien eine Steigerung der komplementvermittelten Lyse zur Folge. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Rolle der PKC-basierten Signaltransduktionswege für die Immunresistenz von Tumoren.

Das unterschiedliche Verhalten der zwei Zelllinien in allen Versuchsreihen, trotz gleicher histologischer Herkunft, hat die Notwendigkeit genauer Topologisierung von Karzinomgewebe vor der Entscheidung zu einer Immuntherapie verdeutlicht. Auch sollte in zukünftigen Studien zu Immuntherapien neben den bisher bekannten Oberflächenfaktoren (z.B. Hormonrezeptoren, Her-2-neu) die Bestimmung von mCRPs erwogen werden, da man hierdurch besonders günstige Subgruppen selektieren könnte. Zusätzlich werden weitere Versuchsreihen mit Zytokin- und Antikörperkombinationen im Zell- bzw. Tiermodell notwendig sein, um die besten und therapeutisch vielversprechendsten Kombinationen zu finden.