# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Prof. Dr. med. Stefan W. Schneider

# Die Wechselwirkung zwischen Melanomzellen und dem Komplementsystem

# Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Martha Katharina Hähnle aus Hamburg

Hamburg 2023

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.04.2024

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

### Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. med. Leticia Oliveira-Ferrer

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** Prof. Dr. med. Christopher Gebhardt

# Inhaltsverzeichnis

1.Einleitung	4
1.1 Das maligne Melanom	4
1.2 Das Komplement-System	
1.2.1 Faktor H	
1.3 Die Glykokalyx	
1.4 Komplementsystem in der Tumorentstehung	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit	23
2. Material und Methoden	
2.1 Material	25
2.2 Methoden	
3.Ergebnisse	
3.1 C3b/iC3b Färbung	
3.2 Ablauf der weiteren Komplementkaskade: Ergebnisse C5a-Elisa	42
3.3 Expression von C3b und C5a Rezeptoren	43
3.4 Faktor H Färbung	45
3.5 Inkubation mit Glykokalyxinhibitoren	
3.6 WGA Färbung	50
4. Diskussion	
4.1 MV3-Zellen aktivieren das Komplement in vitro	52
4.2 Melanomzellen zeigen kaum Expression von Komplementrezeptoren	54
4.3 Faktor H-Bindung korreliert negativ mit der Komplementaktivierung	54
4.4 Manipulation der Glykokalyx hat Einfluss auf die Bindung von C3b	55
5. Zusammenfassung	61
6. Abbildungsverzeichnis	63
7. Abkürzungsverzeichnis	64
8. Tabellenverzeichnis	66
9. LITERATURVERZEICHNIS	67
10. DANKSAGUNG	83
11. LEBENSLAUF	
12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	

#### 1.Einleitung

#### 1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist eine bösartige Tumorerkrankung, die ihren Ursprung in den melanozytären Zellen der Epidermis hat. Die Melanozyten liegen im Stratum basale der Epidermis und produzieren den Farbstoff Melanin, welcher die Epithelzellen vor DNA-Schäden durch UV-Einstrahlungen schützen soll. Das Melanom hat eine ungünstige Prognose bedingt durch die frühzeitige Tendenz zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung, es ist für mehr als 90% aller Todesfälle aufgrund von Hauttumoren verantwortlich. (Pflugfelder et al. 2013) Das maligne Melanom ist ein häufiger Tumor: Das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch Institutes verzeichnete für das Jahr 2018 22.890 Fälle des malignen Melanoms der Haut, darunter 10.880 bei Frauen. Insgesamt rangiert das maligne Melanom auf Platz 4 der häufigsten Tumorneuerkrankungen der Frauen und auf Platz 5 bei den Männern. Zudem hat das maligne Melanom ein vergleichsweise junges Manifestationsalter: Frauen erkranken im Mittel mit 62 Jahren, Männer vier Jahre später mit 68 Jahren. In der Altersgruppe der 25- bis 34- jährigen ist das maligne Melanom bei Männern die vierthäufigste und bei Frauen sogar die zweithäufigste Krebsart. (Erdmann et al. 2021) Dazu kommt, dass sich die Inzidenzrate seit 1970 bei beiden Geschlechtern mehr als verfünffacht hat. Mit einer weiteren Steigerung in den kommenden Dekaden ist laut Kaatsch et al. zu rechnen. (Kaatsch et al. 2015) Bei keinem anderen soliden Tumor, mit Ausnahme epithelialer Hauttumore, ist eine vergleichbare Steigerung der Inzidenzrate zu sehen, (Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. [AWMF] Deutsche Krebsgesellschaft e.V. [DKG] & Deutsche Krebshilfe [DKH], 2020). Die ist vor allem auf veränderte Urlaubs- und Freizeitgestaltung zurückzuführen: Der wichtigste exogene Risikofaktor bei der Entstehung eines Melanoms ist die UV-Strahlung. Dabei verlaufen UV-Exposition und Entartung nicht direkt proportional zueinander, vor allem eine kurzzeitige, intensive UV-Belastung (in Form von Sonnenbränden) führt zu Mutationen in Onko- und Tumorsuppressorgenen. (Pal et al. 2016) (Armstrong and Cust 2017) Die häufigste Mutation betrifft die Serin/Threonin-Protein Kinase BRAF und das N-RAS-Onkogen, welche die Tumorpromotion induzieren. Mutationen in der Phosphatase PTEN sowie eine p53-Protein, beide Tumorsuppressoren treten ebenfalls häufig auf. (Nalcaci et al. 2016) Zu den endogenen Risikofaktoren gehört ein heller Hauttyp (I-II nach Fitzpatrick), was unter anderem eine Erklärung für das deutliche Nord-Südgefälle der Melanom Prävalenz ist. Die höchsten Inzidenzraten treten in Australien und Neuseeland auf. Ein weiterer endogener Risikofaktor sind besonders große atypische kongenitale Nävi sowie multiple Nävuszellnävi, wobei sich etwa 30-40% der Melanome aus bevorstehenden Läsionen entwickeln und der größere Teil de novo entsteht. (Garbe et al. 1994) Zudem haben Menschen mit positiver Familien- oder Eigenanamnese eine höhere Wahrscheinlichkeit ein malignes Melanom zu entwickeln. (Grob et al. 1990, Holly et al. 1987) Auch Immunsuppression wie z.B. durch das HI-Virus oder Organtransplantationen spielt eine Rolle bei der Entstehung von malignen Melanomen (Robbins et al. 2015) Das maligne Melanom lässt sich in verschiedene histopathologische Subtypen unterteilen, welche die Prognose maßgeblich mitbestimmen. Der häufigste histopathologische Subtyp ist das superfiziell-spreitende Melanom, welches in etwa 55% der Fälle vorliegt. Dieser Subtypus geht aufgrund seiner primär horizontalen Ausbreitungstendenz mit einer vergleichsweise guten Prognose einher. Klinisch präsentiert er sich als asymmetrische, makulöse Pigmentläsion, welche scharf, aber unregelmäßig begrenzt ist, typisch ist eine inhomogene Kolorierung. Der zweithäufigste Subtypus ist das noduläre Melanom, welches in 20% der Fälle vorliegt. Aufgrund einer primär nach vertikal gerichteten Größenprogredienz geht dieser Subtypus mit einer schlechten Prognose einher. Er präsentiert sich als knotiger, exophytisch wachsender, intermittierend blutender Tumor. Bei ca. 10% der Subtypen handelt es sich um ein Lentigo-maligna-Melanom, welches in der Regel aus einer Lentigo maligna (Melanoma in situ) hervorgeht und daher fast ausschließlich an sonnenexponierten Hautarealen bei älteren Patienten vorkommt. Klinisch handelt es sich ebenfalls um eine unscharf begrenzte makulöse Hautläsion mit inhomogener Pigmentierung. Das akrolentiginöse Melanom liegt eher selten vor und kommt überwiegend palmo-plantar und subungual Melanome präsentieren sich häufig vor. Die subungualen als streifige Pigmentierungen oder bräunliche Flecken im Nagelbett. Weitere seltene Melanom Formen sind das Aderhautmelanom, das Schleimhautmelanom, das amelanotische maligne Melanom sowie die unklassifizierbaren malignen Melanome (Garbe und Schaumburg-Lever 1997, Moll et. al 2016).

#### 1.1 Systemische Therapie

Wie zuvor beschrieben, handelt es sich beim malignen Melanom um einen sehr aggressiven Tumor, mit hoher Inzidenz und hoher Mortalität bei jungem Manifestationsalter. Stadium gibt Im metastasierten es verschiedene Systemtherapien, die zum Einsatz kommen können. In der Vergangenheit kam hauptsächlich Chemotherapie zum Einsatz, diese war durch fehlende Verlängerung des Gesamtüberlebens des Patientenkollektivs bei erheblichen Nebenwirkungen gekennzeichnet. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv an neuen Behandlungsmethoden geforscht, wobei bahnbrechende und richtungsweisende Erfolge verzeichnet werden konnten. Seit der Einführung von Immuncheckpoint-Therapien und zielgerichteter Therapie konnte das Gesamtüberleben des Patientenkollektivs signifikant verlängert werden: Neben der Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens ist die Reduzierung der Tumorlast, sowie die Reduktion der tumorbedingten Symptome und damit einhergehend das Erreichen einer gesteigerten Lebensqualität eins der wesentlichen Ziele der systemischen Therapie. (Garbe et al., 2019) Mittlerweile sind die zielgerichtete Therapie und die Immuncheckpointtherapie nicht nur im metastasierten Stadium zugelassen, sondern auch zur Verlängerung des rezidivfreien Überlebens bei lokal-fortgeschrittenen, nicht fern-metastasierten Melanom. Chemotherapie wird heute als Behandlung der letzten Wahl betrachtet und kommt dann zum Einsatz, wenn Resistenzen gegen Immuntherapie oder zielgerichteter Therapie auftreten. Dacarbazin ist das am längsten etablierte Chemotherapeutikum beim malignen Melanom. (Garbe et al., 2019)

#### 1.1.1 Zielgerichtete Therapie

Die BRAF-Kinase ist ein Schlüsselenzym des zellulären mitogen-activated Protein-Kinase-Signalwegs, welcher unter anderem die Proliferation und Differenzierung der Tumorzellen steuert. Er verläuft nach Aktivierung von NRAS-GTP über drei enzymatische Zwischenstufen BRAF, MEK und ERK. Das aktivierte ERK dimerisiert und transloziert in den Nucleus, wo es an der mRNA-Verarbeitung und Translation sowie an der DNA-Reparatur und dem Kerntransport beteiligt ist. (Wan et al. 2004, Wellbrock et al. 2004) In Melanomen ist die Mutation der BRAF- Kinase die häufigste (40-60 %), dicht gefolgt von Mutationen im NRAS Protoonkogen (15-20 %) (Cheung et al. 2018) (Curtin et al. 2005). In einem Tumor lässt sich jeweils nur eine dieser Mutationen nachweisen. (Van Allen et al. 2014) Die Mehrheit der Mutationen im BRAF Gen befindet sich im Kodon 600 und ist meist eine Transversion von Thymin zu Adenin, welche zu einem Austausch von Valin durch Glutaminsäure führt. Dies resultiert in einer BRAF V600E Mutation(Cheung et al. 2018). Im Vergleich zu BRAF Wildtyp Melanomen weisen Tumore mit einer BRAF V600E Mutation häufig eine aggressivere Verlaufsform auf. (Hugdahl et al. 2016) Patient:innen mit BRAF Mutation sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose jünger, es kommt häufiger zu zerebraler Metastasierung und das Gesamtüberleben im Stadium IV ist deutlich reduziert. (Cheung et al., 2018) Zum aktuellen Zeitpunkt sind die BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib sowie Inhibitoren, des in der Signalkaskade nachgeschalteten Protein Mitogen-activated-Kinase (MEK), Cobimetinib und Trametinib, zugelassen. (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020) Sowohl BRAF- als auch MEK-Inhibitoren sind in der Lage die progressionsfreie Zeit sowie das Gesamtüberleben zu verlängern, bei ca. 60-70% der Patient:innen spricht die Therapie zunächst an. (Ahmed and Kelly 2016) (Luke and Hodi 2013, Mackiewicz and Mackiewicz 2018) Das Therapieansprechen der BRAF-Inhibitoren ist aber aufgrund von Resistenzen meist auf einen kurzen Zeitraum beschränkt. Zur Verringerung der Resistenzentstehung werden sie mit MEK-Inhibitoren in Kombination eingesetzt, (Eroglu and Ribas 2016, Flaherty et al. 2012) wodurch ein längeres Therapieansprechen erzielt werden kann. (Livingstone et al. 2015)

#### 1.1.2 Immuncheckpointinhibitortherapie

Die Immuncheckpointtherapie zielt auf den Tumorimmunzyklus ab. Dieser Zyklus läuft so ab : Tumorzellen setzten im Rahmen der Apoptose Tumorantigen frei, dieses wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) aufgenommen. Die APC wandern in Lymphknoten und präsentieren das Antigen den T-Zellen, die so aktiviert werden. Dies ist die Priming-Phase. Anschließend gelangt die T-Zelle über den Blutstrom zurück zum Tumor, dieser wird über den T-Zell-Rezeptor von der T-Zelle erkannt und die Tumorzelle kann von der T-Zelle zerstört werden. Dies ist die Effektorphase. (Chen and Mellman, 2013, Füreder, 2017) Bisher gibt es zwei verschiedene Ansatzpunkte in der Immuntherapie: Zytotoxische T-Lymphozyten Antigen-4-Antikörper (CTLA-4-AK) wirken in der Priming-Phase und programmed-death ligand 1-Antikörper (PD-L1-AK) wirken hauptsächlich in der Effektorphase. Ipilimumab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher sich gegen CTLA-4 richtet. CTLA-4 ist ein Oberflächenprotein, das auf aktivierten und regulatorischen T-Zellen exprimiert wird und bei Malignität hochreguliert wird. (Peggs et al., 2006, Frydecka et al., 2004) Zur T-Zell Aktivierung benötigt es neben der Bindung eines Antigens an den T-Zell-Rezeptor ein weiteres Signal. Die Kostimulation erfolgt durch das Binden eines weiteren spezifischen Oberflächenmoleküls (B7) der antigenpräsentierenden Zelle an CD28 der T-Zelle. CTLA-4 wirkt in diesem Prozess als negativer Regulator der T-Zell-Funktion, da es B7 mit höherer Affinität bindet. (Chambers et al., 2001, Collins et al., 2002) (McCoy et al. 1997) (Camacho 2015) Ziel der CTLA-4-Blockade ist die Überwindung, der vom Melanom geschaffenen Immuntoleranz, um einen tumorspezifischen Immunangriff zu ermöglichen. Durch die CTLA-4-Blockade werden auch gesunde Körperzellen angegriffen, diese Blockade präsentiert sich klinisch oft als Nebenwirkung des Magen-Darm-Trakts, der Haut oder der endokrinen Drüsen. (Fecher et al., 2013) Ipilimumab wurde 2011 zugelassen und ist die erste Immuntherapie, die eine Verbesserung des Gesamtüberlebens beim metastasierten Melanom gezeigt hat. (Hodi et al., 2010) Ein weiterer Mechanismus über den die Melanomzellen eine Immuntoleranz schaffen, ist die Expression von PD-L1/2. Über diesen binden sie sich an den PD-1 Rezeptor der T-Zelle. (Hargadon et al. 2018) PD-1 ist ein kostimulierender Rezeptor, der die T-Zell-Aktivierung reguliert, indem er sich an den Liganden PD-L1 und PD-L2 bindet. Ähnlich wie bei der CTLA-4-Signalübertragung wird durch die Aktivierung von PD-1 die T-Zell-Proliferation unterdrückt. Es hemmt auch TNF-α, IFN-γ und IL-2 und fördert die Apoptose der T-Zelle (Keir et al., 2008). Hinzu kommt, dass der PD-1 Rezeptor der T-Zellen bei Melanom-Patient:innen stärker exprimiert wird als in gesunden Individuen, dies verstärkt die immunologische Überlegenheit der Melanomzellen. Ähnliches ist bei chronischen Infektionen oder anderen Malignomen beobachtet worden. (Buchbinder and Desai, 2016). PD-1-Liganden werden hauptsächlich in peripherem Gewebe exprimiert und interagieren dort mit dem PD-1-Rezeptor, um die Toleranz im infiltrierten Gewebe aufrechtzuerhalten. (Fife and Bluestone, 2008) Aktuell sind die PD-1 Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab für die Behandlung des malignen Melanoms ab Stadium IIIA zugelassen. (Garbe et al., 2019) Nivolumab und Pembrolizumab werden als Mono- oder Kombinationstherapie eingesetzt, während Ipilimumab nur noch in Kombination mit Nivolumab eingesetzt wird. (Larkin et al. 2019) Dies ist vor allem in der besseren Wirksamkeit bezüglich der objektiven Ansprechrate, der progressionsfreien Zeit sowie des Gesamtüberlebens begründet. (Jacquelot et al. 2017, Schachter et al. 2017, Wolchok et al. 2017) Inzwischen gibt es einige klinische

Studien, die das Ansprechen und die Wirkung der Immuncheckpointtherapie untersucht haben. 2019 untersuchte die Keynote-006-Studie die Pembrolizumab Monotherapie und zeigte, dass das mediane Gesamtüberleben bei Pembrolizumab bei 32,7 Monaten und bei Ipilimumab bei 15,9 Monaten lag. (Robert et al., 2019b) Die Checkmate-067-Studie zeigte, dass das mediane progressionsfreie Überleben bei Therapie mit Nivolumab/Ipilimumab 11,5 Monate, 6,9 Monate bei Nivolumab und 2,9 Monate bei Ipilimumab betrug. (Wolchok et al. 2022) Der therapeutischen Anwendungen sind vor allem durch Nebenwirkungen Grenzen gesetzt. Die Nebenwirkungen treten üblicherweise innerhalb der ersten Wochen oder Monate nach Therapiebeginn auf. Die häufigsten unerwünschten Wirkungen von CTLA-4-Antikörpern und PD-1-Antikörpern treten auf der Haut mit Exanthemen oder Pruritus auf. Diarrhöen sind häufiger mit CTLA-4-Antikörpern verbunden, während pulmonale Symptome und Funktionsstörungen der Schilddrüse häufiger mit PD-1-Antikörpern assoziiert sind. Eine Entzündung der Hypophyse tritt bei etwa 3% der Patienten unter Ipilimumab auf, aber nur bei weniger als 1% der Patienten unter PD-1-Blockade. (Hodi et al., 2010) Dies kann auf die ektopische Expression von CTLA-4 in der Hypophyse zurückgeführt werden, die durch die Blockade zu einer Entzündung führt. (Iwama et 2014) Trotz des bahnbrechenden Erfolges sind der Behandlung mit al., Immuncheckpoint-Inhibitoren also derzeit noch Grenzen gesetzt: Mehr als die Hälfte aller Krebspatienten:innen sprechen nicht auf die PD-1-Signalblockade an, was möglicherweise auf die Komplexität des immunregulatorischen Netzwerks und die Heterogenität von Tumor und Wirt zurückzuführen ist. (Hamid et al. 2019) Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Veränderungen in der Tumormikroumgebung sowie der adaptive Verlust der Immunogenität das Ansprechen auf Immuncheckpoint-Inhibitoren negativ beeinflussen könnte. (Karasarides et al. 2022) Dazu sind bis zu 96% der Patient:innen von immunvermittelten Nebenwirkungen betroffen, welche die Fortsetzung der Therapie verhindern können. (Wolchok et al. 2017) Daher ist die Erforschung möglicher Mechanismen, die die therapeutische Effizienz der Immuncheckpointinhibitoren erweitern, erforderlich. Aktuell wird die Komplementaktivierung bei antikörperbasierter Therapie untersucht. Am Mausmodell konnte bereits Kombination gezeigt werden, dass eine von Immuncheckpointinhibitoren in Kombination mit einem C5aR-Antagonisten effizienter ist als die Monotherapie mit Immuncheckpointinhibitoren.(Zha et al. 2017)

9

#### 1.2 Das Komplement-System

Das Komplementsystem ist Teil des spezifischen Immunsystems und besteht aus mehr als 50 Proteinen, welche sowohl im Plasma als auch membranständig vorliegen und bei Aktivierung kaskadenartig miteinander reagieren. Die Komplementproteine werden in den Hepatozyten gebildet und liegen als inaktive Vorstufen im Plasma oder im Extrazellularraum vor. Bei Ablauf der Komplementkaskade werden die Vorstufen in ihre funktionell aktiven Spaltprodukte prozessiert.(Walport 2001) Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei unterschiedliche Wege erfolgen: Dem klassischen, dem Lektin Weg sowie dem alternativen Weg, welche gemeinsam in einer terminalen Strecke münden. Die Hauptfunktionen des Komplementsystems sind die direkte Abwehr von Pathogenen durch den Membranangriffskomplex, die Opsonierung von Pathogenen und die Verstärkung der Entzündungsreaktion durch Chemotaxis sowie der Steigerung der Gefäßpermeabilität. (Walport 2001) Die Aktivierung des klassischen Weges erfolgt über Antikörperbindung. Die C1q-Untereinheit des C1-Komplexes, bestehend aus einem C1q-Molekül sowie jeweils zwei C1s und C1r Untereinheiten, bindet an mindestens 2 Fc-Teile von IgM oder IgG Antikörpern (Markiewski and Lambris 2007) Diese Bindung führt zu einer Konformationsänderung und der autokatalytischen Aktivierung der Serinproteasen C1s und C1r. Die Serinproteasen bewirken wiederum eine Spaltung von C4 in die aktiven Spaltprodukte C4a und C4b. C4b, ebenfalls eine Serinprotease, bewirkt die proteolytische Spaltung von C2 in C2a und C2b, sofern dieses ebenfalls an die Zelloberfläche gebunden ist. C4b und C2a bilden C4b2a, die sogenannte "C3-Konvertase des klassischen Weges", welche bis zu 1000 C3-Moleküle in C3a und C3b spalten kann. (Gasque 2004) Der Lektin Weg wird über die Bindung des Mannosebindenden Lektins (MBL) an Mannose oder D-Acetylglucosamin aktiviert. Diese Zucker sind auf vielen pathogenen Oberflächen zu finden und beispielsweise Teil des bakteriellen Peptidoglykan. Durch diese Bindung wird die MBL-assoziierte Serinprotease MASP-13 aktiviert, diese vermittelt die Spaltung der Faktoren C2 in C2a und C2b, C4 in C4a sowie C4b. Daraus resultiert die Entstehung von C4bC2a-Heterodimeren, welche analog zum klassischen Weg als C3-Konvertase agieren. (Walport 2001) Der alternative Weg nimmt eine Sonderstellung ein. Die Aktivierung erfolgt kontinuierlich durch die spontane Hydrolyse der Thioesthergruppe von C3 zu C3(H2O). (Thurman and Holers 2006) C3(H2O) bindet an Faktor B. Diese Bindung induziert eine Konformationsänderung von Faktor B und ermöglicht damit die Spaltung durch Faktor D in Ba und Bb. Durch Anlagerung von Bb an C3(H2O) entsteht die initiale C3-Konvertase des alternativen Weges C3(H2O)Bb (Lachmann 2009). Diese spaltet nun weitere C3-Moleküle in C3b und C3a. Die neu entstandenen C3b-Moleküle exponieren wieder die hochaktive Thioesthergruppe, welche kovalent an Amino-und Hydroxygruppen von Zelloberflächen bindet. Das an der Zelloberfläche gebundene C3b interagiert ebenfalls mit Faktor D und B, sodass die eigentliche, membranständige C3-Konvertase des alternativen Weges C3bBb entsteht. Die alternative C3-Konvertase ist instabil und benötigt die Bindung von Faktor P (Properdin) zum dauerhaften Bestehen. (Reis et al. 2018) Auf diese Weise entsteht die Amplifikationsschleife des alternativen Weges, diese sorgt dafür, dass 80 - 90 % der Komplementaktivierung unabhängig von der initialen Aktivierung durch die alternative C3-Konvertase entsteht. Zudem resultiert die Aktivierung der Amplifikationsschleife in einer raschen und effektiven Opsonierung von Zelloberflächen mit C3b. (Harboe et al. 2009, Harboe et al. 2004) Alle drei Aktivierungswege konvergieren in der Bildung von C3a und C3b und der Einleitung der gemeinsamen Endstrecke. Die auf diese Weise generierten C3b-Moleküle beteiligen sich entweder an der beschriebenen Amplifikationsschleife oder sie binden an eine bereits bestehende C3-Konvertase (sowohl klassisch als auch alternativ) und bilden einen trimolekularen Komplex C4b2a3b oder "C3bBb3b + Properdin", welcher nun substratspezifisch C5 in C5a und C5b spaltet und als "C5-Konvertasen des klassischen bzw. alternativen Weges" bezeichnet wird. C5b lagert sich an die Zielzelle an und rekrutiert die Faktoren C6, C7 und C8. Der so entstandene C5b678-Komplex leitet die Polymerisierung von C9 ein, es entsteht der ringförmige C5b-9- Komplex, welcher auch Membranangriffskomplex (MAC) genannt wird. Der MAC bildet einen transmembranen Kanal in der Zielzelle und zerstört damit die Semipermeabilität der Zellmembran, was zur Zytolyse und zum Tod der Zelle führt. (Bohana-Kashtan et al. 2004)



Abbildung 1:Das Komplementsystem Das Komplementsystem ist eine Kaskade aus enzymatisch katalysierten Plasmaproteinen, die Teil des angeborenen Immunsystems ist. Das Komplementsystem kann über drei verschiedene Wege aktiviert werden: Im klassischen Weg führt die Bindung von mindestens 2 Fc-Teilen zu einer Aktivierung von C1g und der autokatalytsichen Aktivierung der Serinproteasen C1s und C1r. Diese bewirken eine Spaltung von C4 in C4a und C4b. C4b bewirkt die proteolytische Spaltung von C2 in C2a und C2b, sofern dieses ebenfalls an die Zelloberfläche gebunden ist. C4b und C2a bilden C4b2a, die sogenannte "C3-Konvertase des klassischen Weges". Die Aktivierung des Lektinweges erfolgt durch die Bindung von Mannose an das Mannose-bindende Lektin. Dieser Komplex aktiviert MASP-13, diese vermitteln die Spaltung der Faktoren C2 in C2a und C2b, C4 in C4a sowie C4b. Die dadurch produzierten C4bC2a-Heterodimeren agieren analog zum klassischen Weg als C3-Konvertase. Der alternative Weg wird durch spontane Hydrolyse der Thioestherbindung von C3 aktiviert, es entsteht C3(H<sub>2</sub>O). C3(H<sub>2</sub>O) bindet den Faktor B, wodurch die Spaltung und Aktivierung durch Faktor D vermittelt wird. Es entsteht die C3-Konvertase des alternativen Wegs (C3bBb). Diese spaltet weitere C3-Moleküle, welche ebenfalls mit Faktor D und B interagieren, sodass die eigentliche C3-Konvertase C3bBb entsteht. Dies ist die "Amplifikationsschleife des alternativen Weges". Die Bildung der C3-Konvertase leitet die gemeinsame Endstrecke ein: Die C3-Konvertase spaltet C3 zu C3a und C3b, durch Bindung von C3b an die bestehenden C3-Konvertasen entstehen die C5-Konvertasen des klassischen und Lektinweges C4bC2bC3b sowie C3b2Bb. Die C5-Konvertase spaltet C5 in C5a und C5b. C5b rekrutiert die Faktoren C6-C9 und assembliert zum Membranangriffskomplex (MAC). Die Zellwand des Pathogens, an das die initialen Stoffe (C1, C3b, MbL) gebunden haben, wird durch den Komplex perforiert. Dies führt zur Zelllyse und Zelltod. Graphik kreiert mit BioRender.com.

Die deutlich kleineren Spaltprodukte C3a und C5a verstärken als sog. Anaphylatoxine die lokale Entzündungsreaktion und bilden durch die Aktivierung von Komplementrezeptoren C3aR, C5aR1 und C5aR2 auf Granulozyten, Endothelzellen, Monozyten, Eosinophilen und Mastzellen das Bindeglied zwischen angeborener und

adaptiver Immunabwehr. (Erdei et al. 1997) (Fayyazi et al. 2000, Werfel et al. 1992) Sie haben multiple Effektorfunktionen wie die Steigerung der vaskulären Permeabilität, die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie z.B. Histamin, die Anregung der Produktion von Cytokinen, die Chemotaxis von Granulozyten, Monozyten und Mastzellen, sowie die Stimulation von Granulozyten zur Produktion und Freisetzung von Sauerstoffmetaboliten (ROS, "Oxidative Burst"). C3aR, C5aR1 und C5aR2 gehören zu der Rhodopsin-Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren: Diese besitzen eine Struktur von sieben hydrophoben transmembranen Domänen, die durch hydrophile extra- und intrazelluläre Loops miteinander verbunden sind. Die Rezeptoren werden nicht nur auf Immunzellen sondern auch auf einer Vielzahl von nicht-Immunzellen wie glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Alveolarzellen und Mesangialzellen exprimiert. (Erdei et al. 1997) (Fayyazi et al. 2000, Werfel et al. 1992) Darüber hinaus exprimieren verschiedene mesenchymale und hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen C3aR und C5aR (Ratajczak et al. 2004, Reca et al. 2003, Schraufstatter et al. 2009) C3a hat eine geringere biologische Aktivität als C5a, dies kann aber über die weitaus höhere Serumkonzentration von C3a ausgeglichen werden. C4a ist C5a und C3a in Sequenz und Struktur recht ähnlich, eine anaphylatoxe Funktion konnte im Menschen aber bisher noch nicht nachgewiesen werden. (Barnum 2015)

#### 1.2.1 Faktor H

Eine strenge Regulation der Aktivierung des Komplementsystems ist unabdingbar, da die reaktive Thioestergruppe des C3b-Moleküls unwillkürlich mit allen Zelloberflächen interagiert und dabei nicht zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen diskriminiert. Regulation findet auf allen Ebenen des Komplementsystems statt, der wichtigste Ansatzpunkt ist allerdings C3 sowie die Aktivierung des alternativen Weges. C3 ist das zentrale Element der Komplementkaskade, alle drei Aktivierungswege resultieren in C3b-Generierung, im alternativen Weg wird zusätzlich weiteres C3b durch die positive Rückkopplung generiert. Wie fatal eine unregulierte Aktivierung des alternativen Weges sein kann, veranschaulicht das Krankheitsbild des atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms (aHUS). (Michael et al. 2022) Der wichtigste Regulator des alternativen Weges ist der kompetitive Inhibitor Faktor H. Dieser wird hauptsächlich in der Leber gebildet und liegt dann im Plasma vor. Er ist 155 kDA groß und besteht aus 20 homologen Domänen (short consensus repeats, SCRs). Die ersten

vier N-terminalen Domänen bilden die Bindungsstellen für C3b. (Lachmann 2009, Walport 2001)



Abbildung 2: Schematische Darstellung von Faktor H Fakor H ist ein monomeres Protein, welches aus 20 homologen Domänen, den sog. Shortconsenus repeats, SCRs besteht. Die ersten N-terminalen Domänen sind hierbei für die regulatorische Aktivität zuständig und binden C3b, während die C-terminalen Domänen 19-20 für die Wirtserkennung zuständig sind und Glykosaminoglykane und Sialinsäurespezifische Bindungstellen sind. (Clark et al. 2013)

Faktor H hat eine 100 mal stärkere Affinität an C3b zu binden als Properdin (Fearon, Austen 1977) und inhibiert damit die Bildung der alternativen C5-Konvertase C3Bb kompetitiv durch Bindung an C3b. Zusätzlich beschleunigt die Anwesenheit von Faktor H ihren Zerfall und agiert als Cofaktor für Faktor I beim Abbau von C3b zur inaktiven Form C3bi (Pangburn et al. 1977) (Weiler et al. 1976) (Whaley and Ruddy 1976). Faktor H kann auch mit der klassischen C3-Konvertase interferieren, indem er gemeinsam mit Faktor I die Spaltung von C4b zu C4c und C4d katalysiert. (Zipfel and Skerka 2009) Die Spezifität von Faktor H für körpereigene Zellen kommt durch spezielle Bindestellen für Polyanionen wie Sialinsäure und Glykosaminoglykanen (GAGs) zustande. (Pangburn 2000) Diese Bindestellen befinden sich an der Domäne 19-20 am C-terminalen Ende. Sowohl Domäne 19 als auch 20 haben eine höhere Affinität zu Heparansulfat als zu anderen GAGs und unterscheiden sich in ihrer relativen Affinität zu unterschiedlichen (de-)sulfatierten Formen von Heparin (Clark et al. 2013) Durch die Bindung an GAGs oder Sialinsäure wird eine Konformationsänderung induziert, welche zu höherer Aktivität führt. Die Konformation mit geringer Aktivität liegt im Plasma vor, die aktivere Konformation entsteht, wenn Faktor H an Glykosaminoglykane (GAGs) oder Sialinsäuren bindet, die in der Regel auf Wirtszellen, nicht aber auf Erregeroberflächen vorhanden sind, so dass die eigenen Oberflächen geschützt sind, während die Komplementkaskade auf fremden Oberflächen dadurch ungehindert ablaufen kann. (Herbert et al. 2015, Pangburn 2000, Rodriguez de Cordoba et al. 2004)



Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Faktor H Faktor H ist der wichtigste Komplementregulator des alternativen Wegs: Faktor H konkurriert mit Faktor B um die Bindung an C3b und verhindert damit die Bildung der C3-Konvertase des alternativen Weges C3bBb und beschleunigt den Zerfall der Konvertase. Außerdem agiert Faktor H als Cofaktor bei der proteolytischen Spaltung von C3b zu C3bi. Faktor H bindet über spezifische SCRs (s. Abb 2) an Sialinsäure und GAGs und an C3b wodurch eine Konformationsänderung induziert wird und die Affinität zu C3b verstärkt wird. Graphik kreiert mit BioRender.com.

#### 1.3 Die Glykokalyx

Das wichtigste Komplementkontrollprotein des alternativen Weges ist Faktor H. Faktor H unterscheidet zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen, durch die Bindung an bestimmte Strukturen auf der Zelloberfläche. Die Bindungsstellen sind dabei spezifisch für Glykosaminoglykane und Sialinsäure, beides Bestandteile der Glykokalyx. Die Glykokalyx ist ein, mit der Plasmamembran eukaryotischer Zellen verknüpftes, funktionelles System, welches auf allen endothelialen Zellen und vielen epithelialen Zellen nachgewiesen werden konnte. Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens hat die Glykokalyx multiple, lokalisationsadaptierte Funktionen. Neben der Mitwirkung an der Regulation der Komplementaktivierung spielt sie eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen, der Signalübertragung und der Selbsterkennung. Ferner bildet sie eine Schutzbarriere gegenüber Pathogenen und reguliert Entzündung und Reparatur. (Laubli and Varki 2020)

Das Grundgerüst der Glykokalyx setzt sich aus membrangebundenen Proteoglykanen und Glykoproteinen zusammen, diese sind über die Seitenketten der Proteoglykane miteinander verwoben und bilden eine dreidimensionale Struktur. (Chappell et al., 2008a).



**Abbildung 4: Die Glykokalyx** Die Glykokalyx ist eine 0,5 nm messende Schicht an der Außenseite aller eukaryotischer Zellen. Sie besteht aus Kohlenhydraten, welche an Membranproteine oder Membranlipide gebunden sind. Die Membranproteine sind entweder die kurzen unverzweigten Glykoproteine oder die größeren, vielfedrigen Proteoglykane. An die Proteoglykane sind die Glykosaminoglykane (GAGs), Heperansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat oder Keratansulfat, gebunden. Auf diese Weise entstehen bspw. die Heperansulfatproteoglykane Syndecan oder Glypican. Die Glykoproteine bestehen aus einem zentralen Protein und kovalent gebundenden, repetitiven Disaccharideinheiten bspw. der Sialinsäure. Hyaluronsäure ist mithilfe eines GPI-Ankers (Glycosylphosphatidylinositol-Anker) in der Lipiddoppelschicht befestigt. Graphik kreiert mit BioRender.com.

Glykoproteine sind Makromoleküle, welche aus einem zentralen Protein und in ihrer Anzahl variierender, kurzer verzweigter Saccharidresten bestehen. (Pries et al. 2000, Reitsma et al. 2007) (Ushiyama et al. 2016) Durch ihre kleine Größe (10-20 nm) sind sie in die tieferen, zellnahen Schichten der Glykokalyx eingebettet. (Ushiyama et al. 2016) In humanen Glykoproteinen kommen acht verschiedene Saccharidreste vor: Fucose, Galactose, Mannose, Glucose, Xylose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin und N-Acetylneuraminsäure, die sog. Sialinsäure. (Hossler et al. 2007) Die Glykosylierung der Proteine findet post- bzw. cotranslational statt. Man unterschiedet dabei zwischen N- und O-Glykosylierung der Glykoproteine: Die Nglykosylierten Glykoproteine entstehen durch die kovalente Bindung eines Zuckerrestes an die Säureamidgruppe eines Asparagins, dies findet im Endoplasmatischen Retikulum statt. Die O-Glykosylierung im Golgi-Apparat entsteht durch Bindung an die Hydroxygruppe von Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin. (Kornfeld and Kornfeld 1985, Zauner et al. 2012) Neben Glykoproteinen sind die größeren, verzweigteren Proteoglykane Teil der Glykokalyx: Proteoglykane bestehen aus einem membrangebundenen Kernprotein, an das Glykosaminoglykane als Seitenketten kovalent gebunden sind. (Reitsma et al. 2007) Die Glykosaminoglykan-Seitenketten sind lineare Disaccharidpolymere, die aus

hunderten bis zu tausenden von Disacchariduntereinheiten aufgebaut sein können. (Tarbell and Cancel 2016) Je nach Disaccharid ergeben sich Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Hyaluronsäure, die je nach Art des Gewebes eine andere Häufigkeitsverteilung besitzen. (Reitsma et al. 2007) Sulfatierung, Carboxylierung und eine Reihe weiterer Modifikationen bei der Polymerisation der Glykosaminoglykane führen zu einer Fülle potenzieller Proteinbindungsstellen. So entsteht eine Vielfalt aus strukturell und funktionell heterogenen Glykosaminoglykanen und ein dreidimensionales, viel verzweigtes Netzwerk. Hyaluronsäure nimmt eine Sonderstellung ein: Es ist die einzige Glykosaminoglykan-Seitenkette, die nicht über ein Kernprotein, sondern über den CD-44 Rezeptor (GPI-Anker) mit der Zellmembran verbunden ist. (Becker et al. 2015) Außerdem verfügt sie über weniger Proteinbindungsstellen aufgrund fehlender Sulfatierung. Trotzdem trägt Hyaluronsäure durch ihre Moleküllänge von bis zu mehreren Mikrometern und durch seine enorme Wasserbindungsfähigkeit maßgeblich zur Stabilisierung und Quervernetzung der Glykokalyx bei. (Van Teeffelen et al. 2007)(Broekhuizen et al. 2009)

#### 1.3.1 Heparansulfat

Das mit Heparin verwandte, aber weniger stärk sulfatierte Heparansulfat kann bis zu 90% der Glykosaminoglykan-Seitenketten ausmachen. (Pries et al. 2000) Es ist aufgrund seiner Carboxyl- und Sulfatgruppen negativ geladen und reich an Proteinbindungsstellen. (Van Teeffelen et al. 2007) Aufgrund seines komplexen Aufbaus sind eine große Anzahl von Enzymen an der Synthese beteiligt: Das Kohlenhydratgerüst besteht aus 100-200 repetitiven Einheiten des Disaccharids Glucuronsäure-N-Acetylglucosamin (GlcA-GlcNAc), dieses wird durch die Wirkung der Exostosin 1/Exostosin 2 (EXT1/2)-Copolymerase gebildet. Anschließend ersetzen N-Deacetylase/N-Sulfotransferasen (NDSTs) Acetylgruppen der GlcNAc-Reste durch Sulfate, dies ist die erste einer Reihe von verschiedenen Sulfatmodifikationen. Glucuronsäure (GlcA) kann durch Glucuronsäure-Epimerase (GLCE) in Iduronsäure (IdoA) umgewandelt werden, wodurch zusätzliche strukturelle Variabilität entsteht. (Reitsma et al. 2007) Dann werden Sulfat Modifikationen durch verschiedene Sulfotransferasen (HS2STs, HS3STs und HS6STs) an der 2-O-Position von GlcA/IdoA und den 3-O- bzw. 6-O-Positionen von GlcNAc/GlcNS vorgenommen. Die Anzahl der strukturellen Möglichkeiten innerhalb einer Heparansulfat-Kette ist durch diese Prozesse sehr hoch und hauptsächlich durch unterschiedliche Sulfatierungsmuster bestimmt. Dies erklärt, warum Heparansulfat in der Lage ist, die spezifische Bindung und Funktion einer Vielzahl von Proteinen einschließlich Komplementproteinen zu vermitteln. (Heinrich et al. 2014, Weinbaum et al. 2007)



**Abbildung 5: Strukturelle Darstellung von Heparansulfat** rot markiert sind die negativ geladenen Gruppen. Heparansulfat besteht aus langen Ketten von Disacchariden, welche aus D-Glucosamin-Einheiten kombiniert mit D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure bestehen.

Faktor H verfügt über verschiedene Proteinbindestellen (CCPs), welche Affinität zu Polyanionen und C3-Fragmente besitzen, die CCPs 6-8 und 18-20 sind spezifisch für Heparansulfat. (Hu and Weinbaum 1999). Auf diese Weise reichert sich Faktor H in der Mikroumgebung von Wirtszellen an und kann dort seine hemmende Wirkung entfalten.

## 1.3.2 Sialinsäure

Die Sialinsäure ist einer der acht endständigen Zucker, die an Glykoproteine gekoppelt sein können. Sialinsäuren sind negativ geladene alpha-Ketosäuren, welche aus neun Kohlenstoff-Atomen bestehen und die am C1-Atom eine kovalent-gebundene Carboxylgruppe und am C2-Atom eine kovalente Ketogruppe haben. Die molekulare Basis stellt ein Neuraminsäuregerüst (Neu, 5-Amino-3,5- Dideoxy-D-Glycero-D-Galacto-non-2-ulosonsäure) dar. N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N-Glykolylneraminsäure (Neu5Gc) sind die im Menschen am häufigsten vorkommenden Sialinsäuren. (Brinkman-Van der Linden et al. 2000, Varki 2001) Darüber hinaus wurden in der Natur bisher etwa 50 strukturell verschiedene Sialinsäuren identifiziert. Die strukturelle Vielfalt kommt durch Variationen am C5-Atom und an den Hydroxylgruppen der C-Atome 4,7,8,9 zu stande. Diese können acetyliert, lactyliert, sulfatiert, phosphoryliert oder methyliert sein. Die Bildung intra- und intermolekularer Lactone schafft weitere Variationsmöglichkeiten. In Lösung nehmen Sialinsäuren eine C5-Sesselkonformation an. Freie Sialinsäuren befinden sich in der Regel in  $\beta$ anomerer Ringstruktur. (Maggioni et al. 2013)



Abbildung 6: Strukturelle Darstellung der Sialinsäuren Darstellung von häufig vorkommenden Sialinsäuren *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und *N*-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) in  $\beta$ -anomerer Ringstruktur

Wie auch Heparansulfat kann die endständige Sialinsäure durch ihre negative Ladung die Aktivität von Faktor H beeinflussen und damit die Aktivierung des alternativen Pathways regulieren. Wie oben beschrieben verfügt Faktor H über verschiedene Bindungsdomänen (CCPs), welche Polyanionen und C3-Fragmente binden. CCP 20 ist die einzige bisher bekannte Stelle, die für Sialinsäure spezifisch ist (Blaum et al. 2015) Die Affinität von FH zu C3b ist in Gegenwart von Wirtssialinsäure um das 10-fache erhöht (Merle et al. 2015, Mulivor and Lipowsky 2004, Schmidt et al. 2012)

## 1.4 Komplementsystem in der Tumorentstehung

Bis vor Kurzem stand das adaptive Immunsystem, speziell die Beeinflussung von Funktion und Anzahl der zytotoxischen T-Zellen, im Fokus der wissenschaftlichen Forschung bezüglich der antitumoralen Behandlung. Da angeborenes und adaptives Immunsystem eng miteinander verbunden sind und die Komplementaktivierung die adaptive Immunantwort sowie die T-Zellreaktion reguliert, lag es nahe, auch die Rolle des Komplementsystems bei Tumorentstehung und Progression zu untersuchen. Zunächst konnte festgestellt werden. dass die Konzentration von Komplementproteinen in malignen Zellen und Tumoren erhöht ist. Dies haben verschiedene Studien für unterschiedliche Tumorentitäten nachweisen können. (Afshar-Kharghan 2017) Es produzieren sowohl Tumor- als auch Stromazellen in der Tumormikroumgebung Komplementproteine. Zudem gibt es zahlreiche Belege für eine lokale und systemische Aktivierung des Komplementsystems bei Krebserkrankungen.

(Cho et al. 2014, Piao et al. 2015) Die Frage, ob die Komplementaktivierung im Sinne eines Abwehrmechanismus gegen die Tumorentstehung und Progression agiert oder die lokale Komplementaktivierung das Tumorwachstum fördert, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Vermutlich hängt die Rolle der Komplementaktivierung auch von der Tumorentität ab. Ferner haben verschiedene Komplementfaktoren auch komplementunabhängige Funktionen, welche das Tumorwachstum beeinflussen. Roumenina et al. teilten die verschiedenen Tumorentitäten bezüglich der Auswirkung der Komplementaktivierung in vier Gruppen ein:

- Krebserkrankungen mit protektiver Wirkung des Komplementsystems, d.h. gleichzeitiges Auftreten einer günstigeren Prognose und Komplementaktivierung.
- 2. Krebserkrankungen mit protektiven C3, d.h. eine günstige Prognose nur bei hoher C3-Expression nicht bei anderen Komplementgenen.
- Krebserkrankungen mit negativer Wirkung des Komplementsystems, d.h. Auftreten einer schlechten Prognose im Zusammenhang mit einer hohen Expression von Komplementgenen.
- 4. Krebserkrankungen, die bezüglich ihrer Komplementaktivierung keiner Gruppe zugeordnet werden konnten. (Roumenina et al. 2019)

## 1.4.1 Antitumorale Wirkung des Komplementsystems

Zunächst ging man von einer rein antitumoralen Wirkung einer Aktivierung des Komplementsystems aus. Dies wurde hauptsächlich von der Erkenntnis gestützt, dass der Mechanismus Immun-checkpoint-Inhibitoren nicht der nur auf der antikörpervermittelteten Zytotoxizität (ADC), sondern auch auf der komplementabhängigen Zytotoxiziät (CDC) basiert. (Taylor and Lindorfer 2016) (Derer et al. 2014) Diese erfolgt je nach Ausmaß der Komplementreaktion auf der Zielzelle über den klassischen Weg und die MAC-Assemblierung mit direkter Zelllyse oder durch die Rekrutierung von Makrophagen. Diese erkennen die opsonierten Tumorzellen und nehmen diese durch die Erkennung der opsonierenden Fragmente durch die Komplementrezeptoren CR1, CR3, CR4 oder CRIg12 auf. Ferner erkennen die Makrophagen den Fc-Teil der tumorspezifischen monoklonalen Antikörper (mAbs), sodass eine synergistische Elimination von Tumorzellen durch C3R und die FcyRabhängige Aufnahme erfolgt. (Derer et al. 2014) Zudem verstärkt die Freisetzung der Anaphylatoxine (C5a, C3a) die zytolytische Aktivität von mAbs, indem sie die Rekrutierung phagozytischer Zellen fördert und die relative Expression von aktivierenden und hemmenden FcyRs auf Neutrophilen und Makrophagen verschiebt. (Karsten and Kohl 2012) Aber auch abseits der mAB-vermittelten Tumorzelllyse ist das Komplementsystem an zahlreichen immunmodulatorischen Mechanismen mit antitumoraler Wirkung beteiligt. (Carroll and Isenman 2012, Schmudde et al. 2013) Komplementproteine sind an grundlegenden immunologischen Prozessen wie der Präsentation von Tumorantigenen durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs), der Aktivierung von B-Zellen, sowie der Differenzierung von T-Zellen und T-Effektorzellen beteiligt. (Freeley et al. 2016, Liszewski et al. 2013) So konnte die Expression von Komplementproteinen- und Rezeptoren auf dendritischen Zellen (DCs), hochspezifischen antigenpräsentierende Zellen, nachgewiesen werden. (Li et al. 2011) Zudem konnte ein C3-Mangel bei APCs mit einer verminderten Antigenpräsentation in Verbindung gebracht werden. (Reis et al. 2008) Reis et al zeigten, dass lokal produzierte Anaphylatoxine C5a und C3a mit ihren Rezeptoren C5aR1 und C3aR auf APC und T-Zellen interagieren und dabei wesentlich an der T-Zellproliferation und Differenzierung beteiligt sind. Das Wegfallen dieser Interaktion führte zu einer deutlich verminderten T-Zellreaktion.(Reis et al. 2008) Auch das Überleben von CD4+T-Zellen wird durch das Ausschalten einer C3aR oder C5aR1-Stimulation verringert (Strainic et al. 2008). Diese Ausschaltung konnte zudem mit der Induktion eines immunsupprimierenden Phänotyps der CD4+Zelle (iTreg-Zelle) in Verbindung gebracht werden. (Strainic et al. 2008)

#### 1.4.2 Protumorale Wirkung von Komplement

Mittlerweile hat sich die Erkenntnis durchgesetzt, dass Komplementaktivierung auch eine protumerale Wirkung haben kann. 2008 wurde die erste Studie veröffentlicht, in der C3-, C4- und C5ar1- defiziente Mäuse ein langsameres Tumorwachstum zeigten als der Wildtyp. Es folgten eine Bandbreite von Studien, welche ähnliche Ergebnisse für eine Varietät an Tumorentitäten zeigte. (Vadrevu et al. 2014) (Contractor et al. 2016, Piao et al. 2015, Riihila et al. 2017). Inzwischen wurde eine tumorfördernde Wirkung der Komplementaktivierung bereits explizit für das Melanom gezeigt. 2022 beobachteten Liu et al., dass Melanom Patient:innen eine Aktivierung der Komplementkaskade aufweisen. Diese hatten erniedrigte Spiegel von C3 bei gleichzeitig erhöhtem Spiegel von C3a, C3b und C5a. Das wurde aber nur bei

Individuen mit weiter fortgeschrittenem Melanom beobachtet (Stadium 3-4 versus Stadium 1-2), was für die prometastatische Wirkung der Komplementaktivierung spricht. (Liu et al. 2022) Der Rezeptor für C3a C3aR wurde darüber hinaus spezifisch mit der Bildung von zerebralen Metastasen, d.h. mit der Überschreitung der Blut-Liquor Schranke in Verbindung gebracht. (Boire et al. 2017) Der Beitrag des Komplementsystems zum Tumorwachstum und Metastasierung scheint auf verschiedene Weise zu erfolgen. Hierzu ist die Rolle der Anaphylatoxine (C3a, C5a) gut untersucht worden: In einem Melanommodell konnte bei C3aR-defizienten Mäusen ebenfalls ein milderer Krankheitsverlauf mit weniger Tumorwachstum als im Wildtyp nachgewiesen werden. In dem Modell wurde eine geringere Entzündungsreaktion in C3aR-defizienten Mäusen mit mehr Neutrophilen und weniger Makrophagen in der Tumormikroumgebung beobachtet. (Nabizadeh et al. 2016) Der C5aR-Signalweg führt zu einer Einwanderung von myeloiden Suppressorzellen (MDSCS) in die Tumormikroumgebung. MDSC sind unreife, myeloische Zellen, welche die Proliferation von CD8+ T-Zellen reduzieren und zusätzlich durch Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Apoptose in CD8+ T-Zellen induzieren. Auf diese Weise führt die C5aR zur T-Zell-Depletion und damit zur Immunsuppression. (Kusmartsev et al. 2004) Außerdem wurde die Gefäßinvasion in verschiedenen Tumorentitäten mit einer Überexpression von C5aR1 assoziiert. (Corrales et al. 2012, Kaida et al. 2016, Nitta et al. 2013) Diese Invasivität basiert vermutlich auf der C5ainduzierten Sekretion von Metalloproteinasen, welche die extrazelluläre Matrix (ECM) abbauen können. (Nitta et al. 2014) Allerdings ist auch bekannt, dass Krebszellen durch membrangebundende Serinproteasen C5 spalten können. Gegebenfalls könnte dies ein Mechanismus der Selbstaktivierung von C5aR-exprimierenden Krebszellen sein, um die Invasivität zu erhöhen und die Rekrutierung von MDS und die Neovaskularisierung zu induzieren und damit eine, für den Tumor günstige Mikroumgebung, zu schaffen.(Nitta et al. 2014) So konnte gezeigt werden, dass Komplement C5a in der Mikroumgebung eines Tumors das Tumorwachstum durch Unterdrückung der antitumoralen CD8+ T-Zellen-Antwort erheblich steigert. Dieser Prozess wurde mit der Rekrutierung von myeloid-abgeleiteten Suppressorzellen und der Verstärkung ihrer antitumoralen T-Zell-Suppressionsfähigkeit in Verbindung gebracht. (Markiewski et al. 2008, Markiewski and Lambris 2009) Außerdem fördert C5a die tumorale Angiogenese durch Aktivierung von endothelialen Zellen, welche wiederum die Expression von proangiogenen Genen anstoßen. (Albrecht et al. 2004) Auch der C3-Aktivierung wird erhöhte Invasivität und eine Rolle in der epithelialmesenchymalen Transition durch Verringerung der Expression von E-Cadherin auf der Zelloberfläche zugeschrieben. (Cho et al. 2016) Die Komplementrezeptoren C3aR und C5aR1 auf Tumorzellen wirken aber nicht nur durch Erzeugung eines entzündlichen und immunsupprimierenden Milieus tumorfördernd, sondern haben auch eine direkte autokrine Wirkung. C5aR und C3aR können den Phosphoinositid-3- PI3K/AKT-Signalweg in der Tumorzelle aktivieren, welcher an der Proliferation von Tumorzellen beteiligt ist. (Cho et al. 2014) Sublytische Mengen des MACs (C5b-C9), welche sich auf Tumorzellen ablagern, induzieren ebenfalls diesen Signalweg und agieren damit ebenfalls als Treiber der Proliferation. (Towner et al. 2016, Vlaicu et al. 2013) Es gibt bereits Untersuchungen zum therapeutischen Nutzen einer Anaphylatoxin-Rezeptor Blockade. Die Ergebnisse zweier Studien, welche Modelle für Melanom und Bronchialkarzinom verwendet haben, konnten feststellen, dass eine kombinierte Blockade von C5aR und PDL-1 das Tumorwachstum wirksamer zu hemmen, scheint als eine Monotherapie. (Ajona et al. 2017, Wang et al. 2016) Auch für die restlichen Bestandteile des Komplementsystems gibt es Hinweise für eine protumerale Wirkung: C1q-defiziente Mäuse zeigten ein langsameres Tumorwachstum und ein längeres Gesamtüberleben im Vergleich zum Wildtyp - aber auch im Vergleich zu C3 oder C5 defizienten Mäusen. Der Vergleich mit C3- und C5 defizienten Mäusen legt eine tumorfördernde Wirkung unabhängig von der Komplementaktivierung nahe. In der Studie konnte zudem kein Unterschied in der immunologischen Zusammensetzung der Tumormikroumgebung festgestellt werden, aber eine frühere Ablagerung von C1g sowie eine erhöhte Angiogenese. (Bulla et al. 2016) Die Komplementaktivierung ist also mit Förderung von Proliferation, Angiogenese und Metastasierung assoziiert.

#### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Komplementsystem, eine Kaskade aufeinanderfolgender Proteasen, gehört zur angeborenen Immunität und ist damit Teil der grundlegenden Pathogenabwehr (Merle et al. 2015). Die Hinweise darauf, dass die Komplementkaskade auch in Tumoren aktiviert wird, mehren sich. (Aykut et al. 2019, Medler et al. 2018, Reis et al. 2018, Roumenina et al. 2019). Die Wirkung des Komplementsystems ist multifaktoriell und seine explizite Rolle während der Tumorprogression hängt von der Tumorentität, dem Stadium und der Therapie ab. (Daugan et al. 2021, Daugan et al. 2021, Fishelson and Kirschfink 2019) Zur Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen ist eine strikte Regulation der Komplementaktivierung nötig. Dies wird durch Komplementkontrollproteine wie Faktor H gewährleistet. Faktor H bindet an Polyanionen auf Zelloberflächen und erfährt auf diese Weise eine Konformationsänderung. Faktor Н hat spezifische Bindungsdomänen für Heperansulfat und Sialinsäure, beides Bestandteile der Glykokalyx. (Clark et al. 2013) Man weiß, dass Veränderungen in der Glykosyslierung der tumorösen Zellen eines der Hauptmerkmale von Malignität ist. (Pinho and Reis 2015, Varki et al. 2015)

Das maligne Melanom ist ein Tumor, der in komplexer wechselseitiger Interaktion mit dem Immunsystem steht. Hauptinidikator dafür ist die Wirksamkeit der Immuncheckpointtherapie basierend auf der Antikörpervermittelten Zytotoxizität Es mehren sich die Hinweise, dass zudem das Komplementsystem bei der Entwicklung und dem Fortschreiten des Melanoms eine große Rolle spielt. (Liu et al. 2022, Ralli et al. 2020) In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwiefern Melanomzellen mit dem Komplementsystem interagieren oder dieses sogar aktivieren und auf welche Weise dies prozessiert wird. Dabei soll spezifisch auf folgende Fragen eingegangen werden:

- Findet eine Komplementaktivierung auf Melanomzellen bzw. in ihrer Tumormikroumgebung statt? Zur Beantwortung dieser Frage wird die Bindung von C3b, als Schlüsselprotein der Komplementkaskade, auf Melanomzellen untersucht. Zudem wird das Vorkommen von C5a, als Downstream-Protein der Komplementkaskade, in der unmittelbaren N\u00e4he der Melanomzellen untersucht.
- 2. Unterscheiden sich unterschiedliche Melanomzelllinien in der Intensität der Komplementaktivierung?
- 3. Über welche Bindungsmechanismen werden Komplementproteine auf der Zelloberfläche von Melanomzellen gebunden?
- 4. Wird die Komplementaktivierung auf Melanomzellen durch das Komplementkontrollprotein Faktor H reguliert?
- 5. Wird die Faktor H-Bindung auf Melanomzellen durch Bestandteile der Glykokalyx wie z.B. Heperansulfat oder Sialinsäure vermittelt?

Die hier untersuchte Hypothese ist, dass Melanomzellen in der Lage sind die Komplementkaskade zu aktivieren. Dieser Aktivierung könnte eine veränderte Tumorglykokalyx zugrunde liegen. Die Tumorglykokalyx wäre hypothetisch in ihrer Zusammensetzung so verändert, dass die durch Polyanionen-vermittelte Bindung von Faktor H nicht mehr zustande kommen kann. Durch diesen Umstand könnte die Komplementkaskade ungehemmt ihre Funktionen ausüben und zu Tumorwachstum und Tumorprogress beitragen.

Material und Methoden
 1 Material
 1.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometrie	BD FACS Canto II Flow Cytometry San Jose,
	CA, USA
Eismaschine	FM-150KE, Hoshizaki Denki K.K, Toyake, Japan
Fluoreszenz Mikroskop	Z1 AxioObserver inverted fluorescence
	microscope, Carl Zeiss AG; Oberkochen,
	Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus CH-2 binokulares Mikroskop, Olympus
	Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Mikroplatten-Leser	NanoDrop 2000/2000c Spectrophometer.
	Thermo Fischer Scientific Waltham. USA
Werkbänke	The Heraeus® HERAsafe Safety Cabinet HS18 Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG
Kühlschränke	+4°C/-10°C Bioline. Gram
	+4°C Liebherr
	-80°C Ultra low, Sanyo
CO2-Inkubator	Thermo Heraeus BBD 6220 CO2-Inkubator
	Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG
qPCR-Gerät	LightCycler 96 System. Roche Life Sciences,
	Mannheim, Deutschland
Schüttler	IKA Schüttler, ROCKER 3D basic, 0004000000
	IKA- Werke GmbH&C0. KG; Staufen,
	Deutschland
Thermocycler	UNO-Thermoblock Biometra Göttingen
	T100, Bio Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Vortexer	Vortex Genie 2, Scientifix Industries, Inc. NY,
	USA
	Genius 3, IKA- Werke GmbH&C0. KG; Staufen,
	Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Biofuge fresco 40273085 Kendro
	Laboratory Products Osterode, Deutschland

## Tabelle 1: Laborgeräte

# 2.1.2.Substanzen und Reagenzien

Substanz	Produktreferenz

Chondroitinase	Chondroitinase ABC from proteus vulgaris,
	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg,
	Germany
Hyalorunidase	Hyaluronidase from bovine testes H3884 LOT
	SLCG4762 Sigma-Aldrich Biochemie GmbH,
	Hamburg, Germany
Heparanase	Heparinase Sigma-Aldrich Biochemie GmbH,
	Hamburg, Germany
H2So4	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg,
	Germany
Tunicamycin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg,
	Germany

## Tabelle 2: Reagenzien und Substanzen

# 2.1.3.Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Produktzusammensetzung
Bovines Serum Albumin (BSA)	1% BSA in PBS
EDTA	250 mM in PBS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 6,5 mM Na2HPO4;
	1,5 mM KH2PO4.
Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween	0,1% Tween® 20 in PBS

#### Tabelle 3: Puffer und Lösungen

# 2.1.4.Kits

Kit	Produktreferenzen
RNA Isolations-Kit	RNeasy Mini kit, Qiagen N.v.; Hilden, Germany
C5a-Elisa Kit	Human Complement Component C5a DuoSet,
	R&D Systems, Minneapolis, USA
cDNA Synthese Kit	Maxima first strand cDNA Synthesis Kit for RT-
	qPCR, Fa. Fermentras K1642
	Thermo Fischer Scientific Waltham, USA

#### Tabelle 4: Verwendete Kits

# 2.1.5. Antikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit, Temperatur	Produktreferenz
Mouse- Anti-Human	1:50	2 Stunden, RT	
C3b/iC3b IgG			
goat poly anti human	1:100	2 Stunden, RT	
Factor H			

Verdünnung	Inkubation, Temperatur	Produktreferenz
1:1000	1 Stunde, RT	
1:1000	1 Stunde, RT	
	Verdünnung 1:1000 1:1000	VerdünnungInkubation, Temperatur1:10001 Stunde, RT1:10001 Stunde, RT

#### Tabelle 5: Verwendete Antikörper

## 2.1.6. Primer

Alle Primer wurden von Eurofins Genomics, D-85560 Ebersberg bezogen.

Primer	Sequenz (5'-3')
CR2-Hu-FP	CCATGAACGGAAACAAGTCTGT
CR2-Hu-RP	TGTGGATCATAGGAAGTGCTGG
CR2-M-FP	TTGCTGCCAAAGTATTCTTTTGC
CR2-M-RP	TGGAGGTTTCTAAGCAGGTGATA
CR3-Hu-FP	GCCTTGACCTTATGTCATGGG
CR3-Hu-RP	TCCCCATTCACGTCTCCCA
CR3-M-FP	ATGGACGCTGATGGCAATACC
CR3-M-RP	TCCCCATTCACGTCTCCCA
CR4-Hu-FP	AGAGCTGTGATAAGCCAGTTCC
CR4-Hu-RP	AATTCCTCGAAAGTGAAGTGTGT
CR4-M-FP	CTGGATAGCCTTTCTTCTGCTG
CR4-M-RP	GCACACTGTGTCCGAACTCA
C3aR1-Hu-FP	AAGCCAATCTGGTGTCAGAATC
C3aR1-Hu-RP	CAGGAATGCACATCACAAAAGC
C3aR1-M-FP	TCGATGCTGACACCAATTCAA
C3aR1-M-RP	TCCCAATAGACAAGTGAGACCAA
C5aR1-Hu-FP	TCCTTCAATTATACCACCCCTGA
C5aR1-Hu-RP	ACGCAGCGTGTTAGAAGTTTTAT
C5aR1-M-FP	ATGGACCCCATAGATAACAGCA
C5aR1-M-RP	GAGTAGATGATAAGGGCTGCAAC

#### Tabelle 6: Verwendete Primer

# 2.1.6 Gebrauchsmaterialien

Material	Produktreferenz

Deckgläser 24x60mm	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-
	Königshofen, Deutschland
ELISA-Microplate (96 Wells)	Nunc MaxiSorp, Affymetrix, Inc.; Santa Clara,
	USA
Objektträger 25 x 75 x 1mm3	Superfrost Plus®, R. Langenbrinck GmbH,
	Emmendingen, Deutschland
Safe lock Tubes 1,5 und 2 ml	Eppendorf Research® Plus, Eppendorf AG;
	Hamburg, Deutschland
Pipetten 10 μl ,200 μl,1000 μl	Reference 2, Eppendorf AG; Hamburg,
	Deutschland
Pipettenspitzen 2,5, 10, 20, 200, 1000 µl	epTIPs Dualfilter, Eppendord Research plus,
	Eppendorf AG; Hamburg, Germany
	1

#### Tabelle 7: Gebrauchsmaterialien

## 2.1.7. Zellkulturmaterial

Material	Produktreferenz
12-Well Platte mit Deckel	Becton, Dickinson and Co. (BD), NJ, USA
6-Well Platte mit Deckel	Becton, Dickinson and Co. (BD), NJ, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Merck&Co., Inc. New Jersey
Fetal Bovine Serum (FBS)	Boehringer Mannheim, Mannheim Germany
Neubaur Zählkammer	Neubaur bright line, Paul Marienfeld GmbH&Co.
	KG, Lauda-Königshofen, Germany
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg,
	Germany
Trypsin EDTA	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg,
	Germany
Zellkulturflasche T25	Becton, Dickinson and Co. (BD), NJ, USA
Zellkulturflasche T75	Becton, Dickinson and Co. (BD), NJ, USA

Nährmedium	Zusammensetzung	Artikelnummer	Hersteller
DMEM		E15-009	PAA lab. GmbH
RPMI	RPMI	R0883	Sigma- Aldrich

+10% FCS (fetales calf serum)	A15-151	PAA Lab.GmbH
+1% Penicillin/Streptomycin	P11-010	PAA Lab. GmbH
+1%I-Glutamin 200 mM	M11-004	PAA Lab.GmbH
+1% nicht-essentielle	M11-0033	PAA Lab. GmbH
Aminosäuren		

#### Tabelle 8: verwendete Zellkulturmaterialien und Nährmedien

#### 2.1.8. Software

Software	Produktreferenz
BDS DIVA Software	Becton, Dickinson and Company, Franklin
	Lakes, USA
GraphPAd Prism	GraphPad Software, Inc. USA
Light Cycler 96 Software 1.1	Light Cycler 96 Software 1.1 Roche Life
	Sciences, Mannheim, Germany
Microsoft Office	Microsoft Cooperation, Washington, USA
Nano Drop 2000	Thermo Fischer Scientific Waltham, USA
Zeiss Zen Microscope Software	Zeiss, Jena, Germany

#### Tabelle 9: Verwendete Software

#### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.2 Kulturbedingungen

Die verwendeten Zellen (siehe Tabelle) wurden in 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (BD Falcon) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank kultiviert. Alle Arbeiten mit vitalen Zellen wurden in aseptischer Technik an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage bei Konfluenz passagiert. Zur Passagierung wurde zunächst Medium und Trypsin vor der Applikation in einem Inkubator auf 37°C erwärmt. Die adhärenten Zellen wurden anschließend mit Phosphat gepufferter Salzlösung (Phosphate buffered saline= PBS) gespült und mittels Trypsins vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach drei Minuten wurde die Reaktion durch neues Medium gestoppt, die Zellen wurden samt Medium in 15 ml Falcon Tubes überführt und bei 11250 rpm zentrifugiert und in neu vorbereitete Flaschen überführt.

Um Zellen zur Lagerung bei -80°C einzufrieren, wurde das jeweilige Medium zur besseren Konservierung durch FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) ersetzt. Beim Auftauen wurden die Zellen abzentrifugiert und in frisches Medium gegeben.

## 2.2.1.3 Verwendete Zelllinien

Verwendete Zelllinien und Kulturmedien. Es handelt sich um humane und murine Melanomzelllinien.

Zelllinie	Medium
MV3	RPMI-1640 (SIGMA Catalog No. R0883) mit 10% FCS + 1% L-Glutamin Zusatz
BLM	RPMI-1640 (SIGMA Catalog No. R0883) mit 10% FCS + 1% L-Glutamin Zusatz
IGR-37	DMEM (SIGMA Catalog No. D0422) mit 10% FCS + 1% L-Glutamin Zusatz
SBCL-2	RPMI-1640 (SIGMA Catalog No. R0883) mit 10% FCS + 1% L-Glutamin Zusatz
MEI-6	RPMI-1640 (SIGMA Catalog No. R0883) mit 10% FCS + 1% L-Glutamin Zusatz
G361	RPMI-1640 (SIGMA Catalog No. R0883) mit 10% FCS + 1% L-Glutamin Zusatz
B16	DMEM (SIGMA Catalog No. D0422) mit 10% FCS + 1% L-Glutamin Zusatz
RET	RPMI-1640 (SIGMA Catalog No. R0883) mit 10% FCS + 1% L-Glutamin Zusatz

#### Tabelle 10: Verwendete Zelllinien, verwendetes Medium

## 2.2.1.4 Inkubation mit Glykokalyxinhibitoren

Um zu analysieren, welche Rolle die Glykokalyx bei der Bindung von Komplementfaktor C3b an der Zelloberfläche spielt, wurden die MV3-Zellen mit verschiedenen Substanzen behandelt, welche Einfluss auf die Beschaffenheit der einzelnen Komponenten der Glykokalyx haben. Es wurden die Enzyme Heparinase, Hyaluronidase und Chondroitinase, das Methylderrivat 4-methylumbelliferon des Umbelliferons sowie das Gemisch aus verschiedenen homologen Nukleosidantibiotika Tunicamycin verwendet.

Enzym/Substanz	Funktion	Lagerkonz.	Arbeitzskonz.	Volumen	Puffer	Zeit

Heparinase	Spaltung von Heparansulfatketten	25U/ml (50*) DMSO	500 mU/ml	20µl in ml	0,1% BSA in PBS++	3 h
Hyaluronidase	Spaltung von Hyaluronsäure	150mg/ml (100*) PBS	1,5 mg/ml	10µl in in1 ml	0,1% BSA in PBS	3 h
Chondroitinase ABC	Spaltung von Chondroitinsulfat	10 U/ml (200*)1%BSA	500 mU/ml	5µl in 1 ml	0,1% BSA in PBS++	3 h
+4-Mu (Ha) (4- methylumbelliferon)	Inhibitor der Hyaluronsäuresythese	1m (1000*) DMSO	1mM	1µl in 1 ml	Zellmedium	8- 12 h
Tunicamycin	Blockiert N- Glykosylierung	10mg/ml (500*) DMSO	20µg/ml	5µl in 1 ml	Zellmedium	20- 24 h

 Tabelle 11: Verwendete Glykokalyxinhibitoren Funktion, Lagerkonzentration, Arbeitskonzentration,

 Volumen, Puffer, Inkubationszeit

Die Zellen wurden zur Inkubation mit den Inhibitoren aus den Zellkulturflaschen herausgelöst und in 6-Well-Platten überführt, das Medium wurde durch einen adäquaten Puffer ersetzt (siehe Tabelle). Dauer der Inkubation, Konzentration des Inhibitors (siehe ebenfalls Tabelle). Die inkubierten Zellen wurden im Anschluss für die Durchflusszytometrie und Immunofluoreszenz vorbereitet. (siehe Abschnitt 2.2.3.)

## 2.2.2 RNA-Aufbereitung und qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, pcr) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA, die 1985 entwickelt wurde. (Mullis et al. 1986) Die Echtzeit quantitative Polymerase Kettenreaktion (rt-q-PCR) ist eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens, welches durch die Verwendung von fluoreszierenden Molekülen eine zeitnahe Quantifizierung der vervielfältigten Genabschnitten ermöglicht. (Bieche et al. 1998)

## 2.2.2.1 RNA-Extraktion aus Kulturzellen

Für die Durchführung der qPCR benötigt man DNA und Primer. Um die DNA der zu untersuchenden Zellen zu erhalten, muss man zunächst einmal die RNA extrahieren. Hierzu wurde das RNA-Isolations-Kit "RNeasy Mini kit" von Quiagen (siehe Abschnitt Material) benutzt. Da Nukleasen, welche sowohl RNA als auch DNA abbauen können, ubiquitär vorkommen, ist es wichtig, alle Arbeitsmaterialen sowie den Arbeitsplatz vorher mit RNaseZAP zu behandeln und 5 Minuten Einwirkzeit zu gewährleisten. Es wurde RNA aus Zellen der humanen Melanom Zelllinien MV3, BLM, MEI-6, SBCL-2, G361, IGR37 sowie der murinen Melanomzellen RET, B16 extrahiert. Die Zellen, welche sich in T25 Zellkulturflaschen befanden, wurden zunächst in eine 6-Well Platte überführt und nach 24-stündiger Inkubationszeit zweimalig mit PBS-Puffer Well 300 1% gewaschen. Daraufhin wurde jedem μl des Mercaptoethanolhaltigen RLT-Puffer (Quiagen) zur Zelllyse hinzugefügt. Mithilfe des Zellschabers wurden die Zellen abgelöst und in die Shredder-Säule überführt und bei 13.000 U/min zentrifugiert, dieser Vorgang dient der Homogenisierung des Zelllysats. Dem Zentrifugat wurden dann 300 µl Ethanol hinzugefügt und mit einer Pipette sorgfältig vermischt. Das Ethanol vermittelt die Bindung der RNA an die Membran der RNAeasy-Mini-Spin-Säule, in die die Probe als nächstes überführt wurde. Um die überflüssigen Zellbestandteile zu entfernen, wurde für 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert, anschließend mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen, und noch einmal für 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die RNA ist derweil an die Membran im Inneren der Spinsäule gebunden, während das Zentrifugat sich im äußeren Tube sammelt, was nach jedem Schritt ausgewechselt wird.

Um mögliche DNA-Überreste zu eliminieren, wurde jeweils 80 µl DNAse-Lösung (12,5% DNase Stammlösung in RNase-freiem Wasser) auf die Membran der Spin-Säule gegeben und hat für 15 Minuten bei Raumtemperatur eingewirkt.

Als nächstes folgten drei Waschschritte mit RW1 Puffer: Als erstes 350 µl RW1- Puffer mit anschließender Zentrifugierung bei 10.000 U/min für 15 Sekunden, danach mit 500 µl RW1-Puffer und anschließender Zentrifugierung für 15 Sekunden. Der letzte Waschschritt wurde mit 500 µl RPE-Puffer durchgeführt. Dies ist ein milder Waschpuffer, der ebenfalls im RNaeasy Kit enthalten ist, dessen Hauptaufgabe das Herauswaschen von verschiedenen Salzen ist, die in den anderen Puffern enthalten sind. Anschließend wurde noch einmal für 2 Minuten bei 10.000 U/min zentrifugiert. Zum vollständigen Trocknen wurde erneut bei 14.000 U/min 60 Sekunden zentrifugiert. Die Spin-Säule wurde dann in ein Collection-Tube gesteckt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Hinzufügen von 50 µl Nukleasefreien Wasser wurde noch einmal für 1 Minute bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die RNA wurde durch diesen Schritt von der Membran der Spin-Säule in das Zentrifugat gelöst, die Spin-Säule wurde verworfen, die Collection-Tubes sofort auf Eis gelegt. Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte anschließend mithilfe des Nanodrop Zunächst wurde ein Leerwert mit RNAse-freiem Wasser Spektrophotometers. ermittelt, dann wurden hintereinander die Proben aufgetragen und jeweils Konzentration, Reinheitsfaktor (A260/A280) sowie das Verhältnis der Wellenlängen bei Absorption 260 nm zu 230 nm berechnet.

# 2.2.2.2 Reverse Transskription der RNA in cDNA

Die cDNA-Gewinnung erfolgte gleich im Anschluss der RNA-Isolierung.

Zur dDNA-Herstellung wurde das Maxima first strand cDNA Synthesis kit for RT-qPCR der Firma Thermo Fischer benutzt (siehe 2. Materialien). Benutzt wurden ebenfalls nur RNAse freie Arbeitsmaterialen. Zunächst wurden der Reaction Mix, Enzyme Mix und das Nuklease-freie Wasser auf Eis aufgetaut.

Dann wurde folgender Ansatz pipettiert:

Total Volume	40 µl
Reaction Mix	8 µl
Enzyme Mix	4 µl
Nuklease-freies H20	x μl auf 40 μl auffüllen (abhängig vom Volumen
	der 2µg RNA)
RNA	2 µg

### Tabelle 12: Pipettierschema cDNA Synthese

Als erstes wurden die Proben hinzugefügt, dann der Reaction- und Enzyme Mix und als letztes das Nuklease-freie Wasser. Die Proben wurden gevortext und anzentrifugiert. Anschließend wurden sie in dem Bio Rad T100 Thermal Cycler nach folgendem Schema inkubiert:

Zeit	Temperatur
10 min	25°C
30 min	50°C
5 min	85°C

 Tabelle 13: Inkubationsschema des Thermal Cyclers

Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Die vorher gewonnene cDNA wurde für die Durchführung der qPCR 1:25 mit Nukleasefreiem Wasser verdünnt. Die eingesetzten Primer wurden mit der im Data Sheet angegebenen Menge an Nuklease-freiem Wasser verdünnt, anschließend wurden der reverse und der forward Primer jeweils 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und zusammenpipettiert. Daraufhin wurde die 96- Well Plate mit Primer, cDNA, und Mastermix befüllt.

Substanz	Menge pro Well
Primer	1 µl
cDNA	4,5 µl
Mastermix	5 µl

Tabelle 14: qPCR-Ansatz pro Well

Anschließend wurde die 96-Well Plate mit einem Film versiegelt und 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die 96- Well Plate im LightCycler 96 inkubiert. Das Gerät wurde folgendermaßen eingestellt:

Program	Cycle	Step	Acquisition Mode
Preincubation	1	95°C for 30s	None
2 Step Amplification	55	95°C for 10s	None
		60°C for 30s	Single
Melting	1	95°C for 10s	None
		65°C for 60s	None
		97°C for 1s	Continuous

Tabelle 15: qPCR Programmeinstellungen LightCycler 96

2.2.3. Immunofluoreszenz und Durchflusszytometrie

Mithilfe der indirekten Immunofluoreszenz können Antigene auf Zellen und in Gewebe nachgewiesen werden. Der primäre Antikörper bindet an die Zielstruktur, während der sekundäre Antikörper an den primären Antikörper bindet und an ein Fluorochrom gekoppelt ist, welches anschließend mikroskopisch oder durchflusszytometrisch sichtbar ist. Die durchgeführten Färbungen hatten zum Ziel verschiedene Strukturen des Komplementsystems auf der Oberfläche von Melanomzellen nachzuweisen. Um die Bindung von Komplementfaktoren auf der Zelloberfläche zu prüfen, müssen die Zellen zunächst mit den Proteinen des Komplementsystems, welche unter anderem im Blut zirkulieren, in räumliche Nähe gebracht werden. Für die Färbung mit dem C3b/iC3b-Antikörper wurden die Zellen zunächst 20 Minuten mit Humanserum inkubiert, als Negativkontrolle dienten Proben, die mit Hitze-inaktivem Serum (HIS) oder RPMI (zellfreies Zellkulturmedium) inkubiert wurden. Das Hitze-inaktive Serum wurde zuvor für 30 Minuten auf 65°C erhitzt, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren.

Zur Inkubation wurden ein Teil der Zellen aus den Kulturflaschen in 200 µl Medium in 1,5ml Eppendorf Tubes überführt und 200 µl und 10 % NHS/HIS/RPMI hinzugefügt.

Nach der Inkubation wurden die Proben mit PBS gewaschen, zentrifugiert und der Zellüberstand verworfen. Zur Fixierung wurden den Proben jeweils 200 µl 4% Paraformaldehyd in PBS hinzugefügt. Nach 5 Minuten erfolgte ein weiter Wasch-und Zentrifugierungsschritt. Als Nächstes wurden 100 µl des primären Antikörpers aufgetragen und die Proben für zwei Stunden auf dem IKA Schüttler inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte ein Waschschritt mit PBS-T und das Auftragen von 200 µl des sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:1000.

Nach einer Stunde Inkubationszeit erfolgte ein Waschschritt mit PBS-T, anschließend wurden die Zellen mit 800 µl PBS versetzt.

Für die Färbung der Glykokalyxstrukturen wurde das wheat germ aggluttinin 1:2000 verdünnt und nach dem Blocken und Waschen wurde jeder Probe 850 µl hinzugefügt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur waren diese Proben bereit für die durchflusszytometrischen Untersuchungen.

#### Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der vorbereiteten Proben wurden anschließend mit dem Durchflusszytometer Canto II (BD, USA) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem zum System gehörigen Programm BD FACSDiva (Version 6.1.1). Zunächst wurde in einem DotBlot Vorwärtsstreulicht ("forward scatter", FSC) gegen Seitwärtsstreulicht ("side scatter", SSC) aufgetragen. Dort wurden alle Ereignisse markiert, mit Ausnahme des Bereiches mit niedrigen FSC und SSC-Werten, um tote Zellen und Zellfragmente von der Analyse auszuschließen. Die markierte Population wurde anschließend in einem Histogramm dargestellt, in dem die Anzahl der Ereignisse gegen die mittlere APC- Fluoreszenz pro Ereignis aufgetragen wurde. Um eine Vergleichbarkeit des Signals zu schaffen, wurden die verschiedenen Proben einer Messung jeweils ins Verhältnis zur Positiv- und
Negativkontrolle gesetzt. Diese Quantifizierung erfolgte anhand der Histogramme. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von GraphPad Prism.

## **Immunofluoreszenz**

Für die Immunofluoreszenz erfolgte zusätzlich eine Nukleusfärbung mit 100 µl DAPI in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein Waschschritt mit PBS, anschließend wurden die Zellen in 50 µl PBS gelöst. Zur Untersuchung der Proben wurden 10 µl auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas bedeckt und anschließend mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Ζ1 AxioObserver und dem dazugehörigen Computerprogramm ZEN (Version 2012) visualisiert. In der Fluoreszenzmikroskopie werden je nach Fluoreszenzfärbung verschiedene Anregungswellenlängen und Emissionsfilter verwendet. Das für die Kernfärbung benutze Fluorochrom DAPI wird bei 365 nm angeregt, die Emissionswellen werden bei 420-480 nm gefiltert. Alexa Fluor 555, das Fluorochrom des genutzten Sekundär-Antikörper, wird bei 550 nm erregt, das Fluoreszenzlicht wird bei 570-640 nm gefiltert. Zur Auswertung wurden 50 Zellen pro Probe ausgewählt, mit der Mikroskopkamera (AxioCam, Zeiss, Deutschland) in 40-facher Vergrößerung fotografiert und mithilfe des zum Mikroskop gehörigen Computerprogrammes wurde ihre mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt. Die anschließende statistische Berechnung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von Excel und GraphPad Prism.

# 2.2.4 Elisa

Ein Elisa (Enzyme-linked-Immunosorbent Assay) ist eine Methode, mit der man einen quantitativen Nachweis eines Antigens gewinnen kann. Die genaue Berechnung der Konzentration des Antigens wird anhand einer Standardkurve durchgeführt.

Der C5a Elisa wurde mithilfe des C5a R&D Systems DuoSet® ELISA-Kit durchgeführt. Vor Versuchsbeginn wurde eine 96-Well NUNC-Platte (Thermo Fisher, Kat.-Nr.: 243656) mit 100 µl des C5a "capture"-Antikörpers (Konzentration 100pg/ml) in einer Verdünnung von 1:180 in PBS beschichtet und für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte in 3 Schritten mit jeweils 300 µl PBS-T gründlich gewaschen und danach zum Blocken mit 300 µl 1% BSA in PBS behandelt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten noch einmal drei Waschschritte mit 300 µl PBS-T. Auf die so vorbereitete Platte wurden nun die Proben und der Standard aufgetragen. Pro Probe wurden jeweils 1x10<sup>6</sup> Zellen ausgezählt und in 300 µl RPMI in 1,5 ml Tubes überführt. Da Thrombin ebenfalls die Fähigkeit besitzt, C5 in C5a und C5b zu spalten, war es an dieser Stelle nötig, Hirudin-Plasma zur Inkubation der Proben zu verwenden, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Zur Inkubation wurden zu den Zellen jeweils 400 µl PBS++ und 300 µl Hirudin-Plasma hinzugefügt. Nach 0, 10 und 20 Minuten wurde jeweils 5 µl 250 mM EDTA hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen. Daraufhin wurden die Proben jeweils bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert, die Überstände gewonnen und jeweils 100 µl auf die Elisa-Platte aufgetragen. Der Standard wurde von 3000 pg/ml bis 150 pg/ml schrittweise in 1% BSA verdünnt und ebenfalls in 100 µl Portionen auf die 96-Well Platte aufgetragen. Die Platte wurde für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte im Anschluss nochmals der dreiteilige Waschschritt mit PBS-T, so dass 100 µl des "detection"-Antikörpers (Konz. 100 pg/ml) in einer 180-fachen Verdünnung in 1%BSA appliziert werden konnten. Nach zweistündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur in Dunkelheit erfolgte wieder der dreiteilige Waschschritt und anschließend die Befüllung der Wells mit 100 µl Streptavidin-HRP in einer 200-fachen Verdünnung zur Signalamplifikation. Nach drei letzten Waschschritten wurde den Proben jeweils 100 µl Substratlösung (1:1 Mischung aus Color Reagent A (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) hinzugefügt und für weitere 20 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde jeder Probe 50 µl Stop-Lösung (2N H2SO4) hinzugefügt.

Die optische Dichte der jeweiligen Wells wurde anschließend mithilfe eines ELISA microplate Readers bei 450 nm Wellenlänge gemessen. Die Auswertung erfolgte mithilfe von Excel. Zunächst wurde basierend auf den Messungen des Standards eine Standardkurve erstellt. Anhand dieser war die Berechnung der Protein-Konzentration der restlichen Proben möglich. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von Excel und GraphPad Prism.

# 3.Ergebnisse

#### 3.1 C3b/iC3b Färbung

Fragestellungen zur Rolle des Komplementsystems in der Tumorentstehung und Tumorprogression sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Während man im letzten Jahrhundert noch davon ausging, dass das Komplementsystem als Element der angeborenen Immunität ausschließlich der Krebsabwehr dient, weiß man inzwischen, dass sich eine Aktivierung des Komplementsystems auch zu Gunsten des Tumorwachstums auswirken kann. (Bonavita et al. 2015) Niculescu et al. konnten schon 1992 zeigen, dass sich C3 sowie andere Komplementfaktoren auf Brustkrebszellen ablagern (Niculescu et al. 1992), seitdem konnte in einer Vielzahl von verschiedenen Tumorentitäten ein erhöhter Spiegel an Komplementfaktoren oder Komplementregulatoren nachgewiesen werden. (Afshar-Kharghan 2017) Um herauszufinden, ob Melanomzellen auch die Fähigkeit besitzen, das in aktivieren, wurde Komplementsystem vitro zu die Ablagerung von Komplementfaktoren auf der Zelloberfläche untersucht. Da alle drei Aktivierungswege des Komplementsystems in der Generierung von Komplementfaktor C3b resultieren, welcher einerseits als Opsonin dient und andererseits die alternative C3-Konvertase auf der Zelloberfläche bildet (Law and Levine 1977, Rooijakkers et al. 2009), wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst C3b und seine direkten Abbauprodukte betrachtet. Hierzu wurden die vier humanen Melanomzelllinen MV3, BLM, IG37, G361 und die murine Melanomzellreihen B16F10 mit einem Ig-G Antikörper gegen C3b/iC3b gefärbt. mit dem C3b/iC3b-Antikörper gefärbten Melanomzellen wurden dann Die durchflusszytometrisch und anschließend zur Bestätigung der Ergebnisse fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Siehe dazu Abbildungen 7,8 und 9. Verglichen wurde die mittlere Fluoreszenz nach Inkubation mit NHS und HIS. MV3, welche mit NHS inkubiert wurden, zeigte sowohl in der Immunfluoreszenzfärbung als auch in der Durchflusszytometrie eine deutliche C3b-Ablagerung. Diese Ablagerungen waren signifikant höher (p-Wert=0,003) als nach Inkubation mit HIS. BLM, IG37, G361 und B16 wurden ebenfalls auf C3b-Ablagerungen untersucht. Im Vergleich zu den MV3-Zellen hatten alle anderen Zelllinien gemeinsam, dass ihr Bindungsvermögen deutlich unter dem der MV3-Zellen lag. Lediglich BLM und B16 zeigten ebenfalls nennenswerte C3b-Bindung, welche ebenfalls ausgeprägter nach der Inkubation mit NHS war als nach der Inkubation mit HIS.

39



Abbildung 7: Färbung der MV3-Zellen mit NHS (A) und HIS (B)



Abbildung 8: Färbung der BLM-Zellen mit NHS (A) und HIS (B)



**Abbildung 9: Analyse der C3b/iC3b Bindung MV3** a Analyse mittels Durchflusszytometrie, C3b/iC3b-Bindung nach Inkubation mit NHS (normal human serum) sowie HIS (heat-inactive serum). Nach Inkubation mit NHS weist MV3 signifikant mehr Bindung auf (p=0,0002). b Analyse der mit NHS und HIS inkubierten Zellen mittels Immunofluoreszenz Auch hier zeigt sich signifikant mehr C3b/iC3b Bindung bei den mit NHS inkubierten Zellen (p= <0,0001)



Abbildung 10: Übersicht der C3b/iC3b-Bindung der untersuchten Zellen nach Inkubation mit NHS a Analyse mittels Durchflusszytometrie b Analyse mittels Immunofluoreszenz. In beiden Darstellungen ist sichtbar, dass sich auf MV3 die meisten C3b/iC3b Ablagerungen finden.



Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der MV3-Zellen Inkubation mit NHS und Inkubation mit HIS. Im Histogramm zeigt sich ebenfalls deutliche C3b-Bindung nach der Inkubation mit NHS.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass MV3 fähig ist, den Komplementfaktor C3b in großen Mengen an der Oberfläche zu binden. Mit dieser Eigenschaft unterscheidet sich MV3 von allen anderen getesteten Zelllinien. Da C3b beziehungsweise iC3b der zentrale Bestandteil der Komplementkaskade ist, legt die Bindung an der Tumoroberfläche eine Aktivierung des Komplementsystems entweder durch die Melanomzelle selbst oder in ihrer unmittelbaren Umgebung nahe. Um eine definitive Komplementaktivierung in vitro zu bestätigen, wurde ein C5a Elisa durchgeführt.

#### 3.2 Ablauf der weiteren Komplementkaskade: Ergebnisse C5a-Elisa

Da eine C3b-Ablagerung auf der Zelloberfläche noch keine Aktivierung des Komplementsystems in vitro beweist, wurde zusätzlich ein Elisa durchgeführt, um C5a in den Überständen der Tumorzellen zu detektieren. C5a entsteht im nachfolgenden Schritt der Komplementkaskade durch die Anlagerung von C3b an die C3-Konvertase (C4b und C2a) und die auf diese Weise entstehende C5-Konvertase (C4b, C2a und C3b). Diese katalysiert die Spaltung von C5 in C5a und C5b, C5a ist ein potentes Anaphylatoxin während C5b den MAC-Komplex bildet. (Walport 2001)

Der Elisa wurde mit den Überständen von MV3 und BLM Zellen durchgeführt, welche zuvor in Hirudin-Plasma inkubiert wurden. Für ein unverfälschtes Ergebnis wurde in diesem Experiment Hirudin-Plasma verwendet. Hirudin ist ein direkter Inhibitor des Gerinnungsfaktors Thrombin, Thrombin ist ebenfalls in der Lage C5a zu generieren.
(Krisinger et al. 2012) Zusätzlich wurde der C5a Gehalt einer Probe ohne Zellgehalt gemessen, die aber ebenfalls mit Hirudinplasma inkubiert worden ist.
Es zeigte sich, dass die MV3 Zellen deutlich mehr C5a produzieren als die BLM-Zellen. Nach 10 Minuten Inkubationszeit um den Faktor 1,7, nach 20 Minuten um den Faktor 2,3 und nach 30 Minuten Inkubationszeit um den Faktor 2,0.



Abbildung 12: C5a Elisa mit MV3 und BLM Zellen und der Kontrolle (nur serumfreies Zellkulturmedium) nach Inkubation mit Hirudin-Plasma MV3 produziert deutlich mehr C5a-Elisa als die BLM. Nach 10 Minuten Inkubationszeit um den Faktor 1,7, nach 20 Minuten um den Faktor 2,3 und nach 30 Minuten Inkubationszeit um den Faktor 2,0. Hier dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis, der Versuch wurde mit vergleichbaren Ergebnissen dreimalig unabhängig voneinander wiederholt

Für weitere Experimente identifizierten wir also MV3 als humane Zellinie mit einem großen Komplementaktivierungspotential, BLM als Zellinie mit geringer Fähigkeit zur Komplementaktivierung. Um herauszufinden, ob die Ablagerung von C3b und die Bildung von C5a in Zusammenhang mit der Expression entsprechender Rezeptoren begründet ist, wurde wie nachfolgend beschrieben mittels qPCR die Expression von möglicher C3b und C5a Rezeptoren gemessen.

## 3.3 Expression von C3b und C5a Rezeptoren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MV3-Zellen mehr C3b an ihrer Oberfläche binden als andere Melanomzellen, wurde im nächsten Schritt der Bindungsmechanismus näher untersucht. Es sind verschiedene Komplementrezeptoren bekannt, die spezifisch für C3b sind oder dessen Abbauprodukte iC3b und C3bdg (produziert durch Faktor I) sowie C3bd, welches durch die Spaltung durch unspezifische Serasen entsteht. Komplementrezeptor 2 ist spezifisch für alle drei Spaltprodukte und ist hauptsächlich dafür da, die Aktivierung von B-Zellen durch die mit C3 opsonierten Antigene anzuregen (Carroll 2000, Fearon Komplementrezeptoren 3 und 4 binden iC3b und werden 1998). auf Gewebemakrophagen, mononukleären Phagozyten, polymorphkernigen Leukozyten und FDCs exprimiert.(Helmy et al. 2006). Die Komplementaktivierung steht in Verbindung mit der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) durch die Interaktion von zellgebundenem iC3b mit dem Komplementrezeptor-3 (CR3, CD11b/CD18) auf Immuneffektorzellen und ermöglicht so die komplement-abhängige zelluläre Zytotoxizität. (CDCC)(Elvington et al. 2012) Bei der Spaltung von C3 und C5 entstehen die proinflammatorischen Proteine C5a und C3a, welche an ihre spezifischen Anaphylatoxinrezeptoren C3a-Rezeptor (C3aR) sowie C5a-Rezeptor (C5aR) binden. C3aR ist weit verbreitet und wird unter anderem auf Neutrophilen, Monozyten/Makrophagen, Hepatozyten, Bronchial-Mastzellen. und Alveolarepithelzellen, vaskulärem Endothel und Astrozyten exprimiert. (Sacks 2010) C5a weist verschiedene proinflammatorische Eigenschaften auf, darunter die Chemotaxis von Leukozyten, die Aggregation von Neutrophilen und Thrombozyten, die Freisetzung von Mastzellenmediatoren und der Bildung von Leukotrienen, Zytokinen und reaktiven Sauerstoffmetaboliten.(Karsten and Kohl 2012)

Der C5a-Rezeptor wird von Granulozyten, Monozyten, Astrozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen exprimiert. (Monk et al. 2007)

C5a weist neben seinen proinflammatorischen Eigenschaften insbesondere tumorgenesefördernde Wirkung auf. (Ajona et al. 2019)

Um die Bindung von Komplementfaktor C3b auf der Melanomzelloberfläche näher zu charakterisieren, untersuchten wir die Zellreihen auf die Genexpression der verschiedenen Komplementrezeptoren C2, C3 und C4 sowie den Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR mittels gPCR. Dabei wurde wie in den vorherigen Experimenten MV3 als Zelllinie mit starker Komplementaktivierung sowie BLM, als Zelllinie mit weniger starker Komplementaktivierung untersucht. Die Expression der Rezeptoren wurde mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches durch seine Beteiligung am Grundstoffwechsel der Zelle, als Haushaltsgen fungiert, verglichen. Weder BLM noch MV3 zeigten eine detektierbare mRNA der Komplementrezeptoren C2, C3 Menge der und C4. Die

44

Anaphylatoxinrezeptoren C3a-Rezeptor und C5a-Rezeptor wurden von MV3 und BLM in sehr geringen Maßen exprimiert.



**Abbildung 13: Komplement-Rezeptorexpression MV3, BLM.** Die Rezeptorexpression wurde mittels qPCR analysiert. Die mRNA Expression wird im Vergleich zur Expression von GAPDH (Delta-CT) gezeigt. Sowohl die MV3-Zellen (a), als auch die BLM-Zellen (b) zeigen keine detektierbare Menge mRNA der Komplementrezeptoren C2, C3, und C4. Beide Zellreihen exprimieren die Anaphylatoxinrezeptoren C3a- und C5a-Rezeptor in sehr geringem Maße.

Die untersuchten Melanomzellen exprimieren die Komplementrezeptoren C2R, C3R und C4R gar nicht, die Anaphylatoxinrezeptoren C5aR und C3aR in nur sehr geringen Mengen. Dies deutet darauf hin, dass die vermehrte Ablagerung von C3b auf der Oberfläche der MV3 Zellen und eine nachgeschaltete Bildung von C5a unabhänging von Komplement und Anaphylatoxinrezeptoren abläuft. Um herauszufinden, ob ein Mangel vom komplementregulierenden Faktor H mit der erhöhten Komplementaktivierung durch MV3 Zellen zusammenhängt, wurde eine Faktor H-Färbung durchgeführt.

# 3.4 Faktor H Färbung

Faktor H inhibiert die Bildung der alternativen C3-Konvertase C3Bb kompetitiv durch Bindung an C3b, beschleunigt den Zerfall dieser und agiert als Cofaktor für Faktor I beim Abbau von C3b (Pangburn et al. 1977) (Weiler et al. 1976) (Whaley and Ruddy 1976). Dadurch unterbricht Faktor H einerseits den Amplification Loop und sorgt andererseits auch direkt für eine geringere C3b-Konzentration. Diese strikte Regulation auf C3b-Ebene ist wichtig, da C3b mit seiner Thioesterbindung ungesteuert an Amino- und Hydroxygruppen der Zielzellen bindet und dabei nicht zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen diskriminiert (Pangburn et al. 1980, Pangburn et al. 1977) Um zu überprüfen, ob die Komplementaktivierung auf den Melanomzellen durch Faktor H-Bindung reguliert werden kann, wurden sowohl die MV3 Zellen als auch die BLM Zellen mit einem Faktor H Antikörper gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellen wurden zuvor mit rekombinantem Faktor H inkubiert, die Kontrolle in serumfreien Zellkulturmedium (RPMI). Zunächst zeigte sich, dass die Inkubation mit rekombinantem Faktor H sich dieser an

der Zelloberfläche beider Melanomzelllinien ablagert.

Wenn man die Zelllinien miteinander vergleicht, sieht man, dass BLM im Vergleich zu den MV3-Zellen eine signifikant (p-Wert= 0,013) höhere Faktor H-Bindungskapazität aufweist.



**Abbildung 14: Faktor H Färbung MV3, BLM.** a repräsentative Durchflusszytometrie-Messung. In den Histogrammen ist sichtbar, dass die Bindung von Faktor H bei BLM höher ist als die von MV3. Außerdem ist sichtbar, dass die in Faktor H inkubierten Zellen mehr Faktor H Bindung aufweisen, als die in serumfreien Zellkulturmedium (RPMI) inkubierten Zellen. b Darstellung der durchflusszytometrischen Daten im Balkendiagramm. Auch hier zeigt BLM eine signifikant höhere Bindung als MV3. (p-Wert= 0,013)

Konsekutiv konnte also gezeigt werden, dass Komplementaktivierung und Faktor H Bindung bei den verwendeten Melanomzelllinien negativ miteinander korrelieren. Um herauszufinden, warum die eine Zelllinie so viel mehr Faktor H bindet als die andere, versuchten wir in den nachfolgenden Experimenten den Bindungscharakter von Faktor H und der Melanomzelle näher zu charakterisieren.

# 3.5 Inkubation mit Glykokalyxinhibitoren

Die Bindung von Faktor H an die Wirtszelle wird über Heparansulfat und Sialinsäure vermittelt (Travers P, Walport M, et al. 2001), die Bindung an Heparansulfat steuert durch Konformationsänderung außerdem die Aktivität von Faktor H.(Jozsi and Zipfel 2008) Beide Moleküle sind Bestandteile der Glykokalyx von körpereigenen Zellen, sowie von Tumorzellen, ebenso Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat. (Paszek et al. 2014) (Tarbell and Cancel 2016) Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der Glykokalyx einen Einfluss auf das Bindungsverhalten von C3b der Tumorzellen hat, wurden die Zellen mit verschiedenen Enzymen und Substanzen behandelt, welche die Glykokalyx modifizieren. Wir benutzten Heparinase, Chondroitinase ABC, Hyaluronidase, sowie 4-methylumbelliferone, ein Inhibitor der Hyaluronsäuresynthese. Zusätzlich Tunicamycin, welches von verschiedenen Streptomyces Bakterien produziert wird und in Eukaryoten die N-verknüpfte Glykosylierung von Proteinen blockiert. (Criscuolo and Krag 1982, Elbein 1984) Anschließend wurde erneut eine Färbung mit dem C3b/iC3b-Antikörper durchgeführt.

Die mit Tunicamycin-behandelte MV3-Zellen zeigten eine signifikante Steigerung der C3b/iC3b Bindung im Vergleich zu den unbehandelten MV3-Zellen. (p-Wert= 0,0128). Dies konnte sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in der Immunofluoreszenz gezeigt werden.



Abbildung 15: C3b/iC3b Bindung der MV3-Zellen nach Inkubation mit Tunicamycin im Vergleich zu Inkubation mit NHS a Analyse der durchflusszytometrischen Daten b Analyse mittels Immunofluoreszenz. In beiden Abbildungen sieht man eine signifikante Steigerung der C3b/iC3b Bindung nach Tunicamycin-Inkubation.

Die Behandlung mit Heparinase verursachte ebenfalls eine signifikante Steigerung der C3b/iC3b-Bindung (p-wert= 0,0313) im Vergleich zu den unbehandelten MV3-Zellen.



Abbildung 16: C3b/iC3b Bindung der MV3-Zellen nach Inkubation mit Heparinase im Vergleich zu Inkubation mit NHS a Analyse der durchflusszytometrischen Daten. b Analyse der Immunofluoreszenz. In beiden Darstellungen ist eine signifikante Steigerung der C3b/iC3b Bindung nach Inkubation mit Heparinase zu sehen.

Nach der Behandlung mit Chondroitinase ABC zeigt sich keine Veränderung des Bindungsverhalten von MV3, ebenso wie nach der Behandlung mit 4-Methylumbelliferon. Auch die Inkubation mit Hyaluronidase hatte keinen signifikanten Effekt auf die C3b/iC3b-Bindung.



Abbildung 17: C3b/iC3b Bindung nach Behandlung mit Chondroitinase ABC, Hyaluronidase und 4-Methylumbelliferon. a Inkubation mit Chondroitinase ABC hat keinen Effekt auf die C3b/iC3b Bindung b Nach Inkubation mit Hyaluronidase zeigt sich keine veränderte C3b/iC3b Bindung. c Inkubation mit 4-Methylumbelliferon hat keinen Effekt auf die C3b/iC3b Bindung

Als Ergebnis dieser Versuchsreihen kann man festhalten, dass die Behandlung der Melanomzellen mit Heparinase und Tunicamycin die Bindungskapazität an C3b/iC3b steigern. Die Behandlung von Chondroitinase ABC und Enzymen, die die Hyaluronsäure beeinflussen, hat keinen Einfluss auf die C3b/iC3b-Bindung.

## 3.6 WGA Färbung

Um den Effekt der verwendeten Substanzen auf die Glykokalyx von MV3-Zellen zu überprüfen, wurde eine Färbung mit Weizenkeimagluttinin (wheat germ agluttinin) durchgeführt. WGA ist ein Lektin, welches über drei Bindungsdomänen für N-Acetylglucosamin-Reste verfügt und über diesen Mechanismus spezifisch N-Acetylglucosamin-Oligomere, aber auch sialinsäurehaltige Oligomere anlagert. (Muraki et al. 2002, Wright 1980, Wright 1990) Die Zellen wurden wie in dem vorangegangenen Experiment mit den verschiedenen Inhibitoren behandelt und anschließend mit WGA gefärbt. Als Positivkontrolle dienten ungefärbte MV3-Zellen, als Negativkontrolle unbehandelte MV3-Zellen. Die mit Tunicamycin behandelten MV3-Zellen banden signifikant weniger WGA als die Kontrolle (p-Wert= 0,0198).



Abbildung 18: WGA-Färbung nach Behandlung mit Glykokalyxinhibitoren. Einzeldarstellung Tunicamyin. a Darstellung der Durchflusszytometrie nach der Behandlung mit verschiedenen Glykokalyxinhibitoren. b Die mit Tunicamycin behandelten MV3-Zellen zeigen signifikant weniger WGA-Anlagerung (p-Wert= 0,0198) als die Kontrolle.

Die mit Heparinase behandelten Zellen zeigten ebenfalls weniger WGA-Bindung als MV3-Zellen, allerdings war dieser Effekt nicht signifikant (p-Wert=0,12). Die mit Chondroitinase ABC und Hyaluronidase behandelten MV3 Zellen unterschieden sich nicht nennenswert von der Kontrolle.



Abbildung 19: WGA-Färbung nach Behandlung mit Chondroitinase ABC (a), Heparinase (b), Hyaluronidase (c). Die Behandlung mit Chondroitinase ABC, Heparinase und Hyaluronidase zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle.

#### 4. Diskussion

#### 4.1 MV3-Zellen aktivieren das Komplement in vitro

Das Komplementsystem wurde als Bestandteil des angeborenen Immunsystem lange Zeit ausschließlich als Instrument der körpereigenen Krebsabwehr gesehen. Seine tumorhemmende Wirkung entfaltet das Komplementsystem über direkte Lyse der malignen Zellen durch den MAC, durch C5a-induzierte Rekrutierung von Effektorzellen oder durch C3b-vermittelte Phagozytose. (Pio et al. 2013, Stover 2010). Auch die Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern gegen PD-1, PDL-1 und CTLA-4, die sich als Standardbehandlung für das Melanom und verschiedene andere Krebsentitäten etabliert hat, basiert auf den tumorhemmenden Mechanismen des Komplementsystems. al., (Weiner et 2010) Diese lösen neben der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität auch die komplementabhängige Zytotoxizität aus, welche sich gegen die Tumorzellen richtet.(Rutkowski et al. 2010, Sliwkowski and Mellman 2013) In den letzten zehn Jahren wurde ein Paradigmawechsel vollzogen: Es häuften sich Anzeichen dafür, dass die Komplementaktivierung in der Mikroumgebung des Tumors auch eine tumorfördernde Rolle spielen könnte. Liu et al beobachteten eine Komplementaktivierung in bereits metastasierten Melanomen.(Liu et al. 2022) Afshar-Kharghan stellte die Hypothese auf, dass die Anaphylatoxine C3a und C5a sowie niedrige, sublytische Konzentrationen von MAC für diesen tumorfördernden Prozess verantwortlich sein könnten (Afshar-Kharghan 2017) Dafür spricht, dass das Komplementsystem die lokale T-Zell-Immunsuppression, die Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung und die Begünstigung der tumorassoziierten Angiogenese bewirkt. (Bonavita et al. 2015, Markiewski et al. 2008, Pio et al. 2013, Vadrevu et al. 2014) Diverse vom Komplement abgeleitete Proteine und nachgeschaltete Signalpartner sind an Prozessen beteiligt, die von der Verankerung und Proliferation von Tumorzellen, dem Umbau der Matrix, der Migration, der Invasivität ins Gewebe und der Metastasierung reichen. (Mamidi et al. 2017, Pio et al. 2014). Die Rolle des Komplementsystems in der Krebspathophysiologie ist also weitaus komplexer als ursprünglich angenommen. Die Auswirkungen sind offenbar kontextabhängig und werden von vielen Faktoren beeinflusst, wie beispielsweise dem zellulären Ursprung des Tumors, seiner intrinsischen Fähigkeit Komplementproteine zu produzieren, dem Ausmaß der Komplementaktivierung sowie der Beschaffenheit der Tumormikroumgebung. (Reis et al. 2018) Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bestimmte Tumorzellen in vitro das Komplementsystem aktivieren. Ablagerungen von C3, C4 und C5b-9 wurden in Brustkrebsgewebe (Niculescu et al. 1992) sowie papillärem Schilddrüsenkarzinom (Lucas et al. 1996) festgestellt. Eine Komplementaktivierung wurde zudem bei Patienten mit Lungen-, Magen- und Gehirntumoren festgestellt.(Gminski et al. 1992), (Maness and Orengo 1977) (Matsutani et al. 1984) Sokoloff et al. wiesen C3b(i)-Ablagerungen auf der Oberfläche von Krebszellen nach und identifizierten dies als Zielantigen für eine auf monoklonalen Antikörpern basierenden Immuntherapie. (Sokoloff et al. 2000) In dieser Arbeit konnten große Mengen Ablagerung von Komplementfaktor C3b auf der Melanomzellreihe MV3 nachgewiesen werden. In dieser Eigenschaft unterscheiden sie sich von anderen getesteten humanen Melanomzelllinien, BLM IGR37, SBCL-2, G361 und der murinen Zelllinienreihe B16F10, welche keine oder nur kaum Ablagerungen von C3b gezeigt haben. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich noch keine Aussage darüber treffen, ob die Tumorzelle von diesen Ablagerungen profitiert, die Tumorzelle selbst das Komplement aktiviert bzw. produziert oder es sich um eine reine Opsonierung handelt. Hier sind noch weiterführende Untersuchungen notwendig. Das auf der Zelloberfläche gebundene C3b könnte man aber als weiteres Target für die Antikörpertherapie nutzen, wie schon von Sokoloff et al. postuliert. In der vorliegenden Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass in den Überständen der MV3 Zellen mehr C5a entsteht als im Umfeld der BLM Zellen. Die BLM Zellen zeigten bereits in den vorigen Experimenten wenig C3b Ablagerung (siehe Ergebnisse 3.1). Außerdem bewirkte die Inkubation beider Zellen mit Hirudinplasma mehr C5a-Generierung als in den Proben, in denen die Zellen nur mit Zellkulturmedium in Verbindung gebracht wurden. Dies weist daraufhin, dass die Tumorzelle eine entscheidende Rolle in der Komplementaktivierung spielt. Diese Erkenntnis stimmt mit dem Ergebnis von Liu et al überein. (Liu et al. 2022) Die Produktion von C5a stieg in den ersten 20 Minuten proportional zur Inkubationszeit mit Hirudinplasma, nach 30 Minuten fiel der C5a-Spiegel wieder. Dies ist erklärbar dadurch, dass das an der Zelloberfläche gebundene C3b durch die Bindung an Faktor В Bildung alternativen C3-Konvertase führt. zur der Der positive Rückkopplungsmechanismus ist gesättigt, sobald die Zelle mit ausreichend C3b besetzt ist. Dieser Mechanismus tritt bei allen drei Aktivierungswegen auf (Harboe et al. 2004) Der Umstand, dass MV3 sowohl mehr C3b bindet als auch mehr C5a generiert als BLM, lässt darauf schließen, dass es sich um eine echte Komplementaktivierung handelt und nicht nur um eine Opsonierung. Allerdings ist auch bekannt, dass Krebszellen durch membrangebundende Serinproteasen C5 spalten können. Dies könnte ein Mechanismus der Selbstaktivierung von C5aRexprimierenden Krebszellen sein, um die Invasivität zu erhöhen und die Rekrutierung von MDS und die Neovaskularisierung zu induzieren, um eine für den Tumor günstige Mikroumgebung zu schaffen.(Nitta et al. 2014)

# 4.2 Melanomzellen zeigen kaum Expression von Komplementrezeptoren

Die Melanomzellen wurden mittels qPCR auf ihre Rezeptorexpression untersucht und es zeigte sich, dass MV3 und BLM in geringem Maße die Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR exprimieren. Eine Komplementaktivierung erscheint aber im Zusammenspiel mit der C3b-Bindung trotzdem als wahrscheinlicher als eine Selbstinduktion der Tumorzellen. In vorherigen Studien die wurde Anaphylatoxinrezeptorexpression in verschiedenen anderen Krebserkrankungen nachgewiesen und sowohl der C3a-C3aR-Achse als auch der C5-C5aR-Achse werden protumeröse Eingenschaften zugeschrieben. (Habermann et al. 2006, Nitta et al. 2013, Suzuki et al. 2022) Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse fügen sich in diese Beobachtungen ein. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass weder MV3 noch BLM die für C3b und seine Abbauprodukte spezifischen Rezeptoren exprimieren. Diese Erkenntnis schließt eine Bindung von C3b auf der Zelloberfläche durch die Rezeptoren C2, C3 und C4 aus. Der Umstand, dass die Komplementrezeptoren nicht von den Tumorzellen selbst, sondern durch Immunzellen der Tumormikroumgebung z.B. Neutrophile, Mastzellen, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert werden und eine Komplementaktivierung durch diese Effektorzellen u.a. die Entzündungsreaktion verstärkt, findet sich auch so in der Literatur wieder. (Chenoweth and Goodman 1983, Dahinden et al. 1991, Elsner et al. 1994, Zwirner et al. 1998)

## 4.3 Faktor H-Bindung korreliert negativ mit der Komplementaktivierung

Faktor H ist ein wichtiger Komplementinhibitor, Faktor H inhibiert die Bildung der alternativen C3-Konvertase C3Bb kompetitiv durch Bindung an C3b, beschleunigt den Zerfall dieser und agiert als Cofaktor für Faktor I beim Abbau von C3b (Pangburn et al. 1977) (Weiler et al. 1976) (Whaley and Ruddy 1976). Dadurch unterbricht Faktor H einerseits die Amplifikationsschleife und sorgt andererseits auch direkt für eine geringere C3b-Konzentration. Diese strikte Regulation auf C3b-Ebene ist wichtig, da C3b mit seiner Thioesterbindung ungesteuert an Amino- und Hydroxygruppen der Zielzellen bindet und dabei nicht zwischen körpereigenen und körperfremden Zellen diskriminiert. (Pangburn et al. 1980, Pangburn et al. 1977) Die Expression von Faktor H konnte bereits in Ovarial- und Lungenkrebs nachgewiesen werden, Ajona et al. konnten dabei auch zeigen, dass Faktor H die Menge an abgelagerten C3 negativ beeinflusst. (Ajona et al. 2004, Junnikkala et al. 2002) In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Faktor H Ablagerungen sich vermehrt auf den Zellen finden, die geringe Mengen in situ Komplementaktivierung zeigen. BLM Zellen zeigten hingegen deutlich mehr Ablagerung von C3b als MV3-Zellen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass auf bestimmten Melanomzellen die Komplementaktivierung durch Faktor H unterdrückt wird. Faktor H kann dabei direkt auf den Abbau von C3b Einfluss nehmen und indirekt die Amplifikationsschleife des alternativen Weges unterbrechen. Die Aktivierung des alternativen Weges ist durch diese Amplifikationsschleife an 80% der Komplementaktivierung beteiligt. (Harboe et al. 2004) Was dies allerdings für Auswirkungen auf den Tumor und seine Mikroumgebung hat, bleibt unklar, solange die Auswirkungen der Komplementaktivierung in Melanomzellen noch nicht abschließend verstanden ist.

Faktor H kann die Tumormikroumgebung zusätzlich komplementunabhängig beeinflussen. Eine Studie von 2020 postuliert, dass Faktor H, der von Tumorzellen produziert wird, die Differenzierung von Makrophagen in einen immunsuppressiven Subtypus induziert. Diesem so entstandenen Subtypus ist eigen, dass er das Immunsystem über mehrere Mechanismen verändert. Kennzeichnend ist hier die Veränderung Zytokinfreisetzung und die T-Zellder Hemmung von Reaktionen. (Smolag et al. 2020) Diese immunsuppressiven Makrophagen korrelieren außerdem positiv mit der PD-1-Aktivität (Guo et al. 2020). PD-1/PD-L1-Immun-Checkpoint-Inhibitoren werden zur Therapie des malignen Melanoms eingesetzt und erzielen hervorragende Ergebnisse (Topalian et al. 2012) Anhand dieser Erkenntnisse kann man die Hypothese aufstellen, dass Faktor H exprimierende Melanome besser auf PD-1/PD-L1-Inhibitoren ansprechen könnten. Faktor H Exprimierung könnte ein zukünftiger Marker zur Prognosebestimmung sein.

## 4.4 Manipulation der Glykokalyx hat Einfluss auf die Bindung von C3b

Die Glykokalyx ist wie beschrieben an der Regulation der Komplementaktivierung, der Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen, der Signalübertragung, der Selbsterkennung sowie an der Abwehr von Pathogenen beteiligt. (Laubli and Varki 2020) Dies sind

Vorgänge bei denen beim Übergang in maligne Zellen grundlegende Veränderungen vollzogen werden. Eine veränderte Glykosylierung ist daher eines der Hauptkennzeichen von malignen Zellen und hat einen erheblichen Einfluss auf die Karzinogenese. (Silsirivanit 2019) (Boligan et al. 2015, Fuster and Esko 2005, Pinho and Reis 2015, Rabinovich and Croci 2012) In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, welche mit verschiedenen Glykokalyxinhibitoren behandelt wurden, mehr Komplementaktivierung in vitro zeigen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Faktor H Bindung negativ mit der Komplementaktivierung korreliert. Faktor H interagiert mit Sialinsäure und Glykosaminoglykanen. Veränderungen der Sialysierung der Glykokalyx werden häufig beobachtet. (Dobie and Skropeta 2021), in vielen Tumorentitäten kann eine Hypersialisierung beobachtet werden. (Bull et al. 2014). Es hat sich herausgestellt, dass die Expression einiger Sialinsäuretransferasen in bestimmten Krebsarten erhöht ist, für das maligne Melanom konnte das bereits vor 30 Jahren gezeigt werden. (Jun et al. 2012, Seales et al. 2005, Sell 1990, Wang et al. 2005) Die übermäßige Expression von bestimmten Sialyltransferasen führt zu schlechterer Überlebenswahrscheinlichkeit.(Schneider et al. 2001) Zusätzlich sind Sialinsäure-abbauende Enzyme wie zum Beispiel Neuraminidase1 in Tumoren herabreguliert. (Uemura et al., 2009) Die Hypersialisierung und die Veränderung der Zelloberfläche beeinflusst vor allem die Metastasierung und die Invasion von umliegenden Geweben. (Ranjan and Kalraiya 2013) Der stärkste Effekt auf die Komplementaktivierung konnte in dieser Arbeit mithilfe von Tunicamycin erzielt werden. Durch die Blockade der N-Glykosylierung verändert Tunicamycin die Glykokalyx erheblich. Auf die Sialisierung der Zelle hat dies Einfluss, weil Sialinsäure als endständiger Zucker als Basis entweder ein N-Glykan, dessen Synthese hier blockiert wurde, oder ein O-Glykan hat. Aus den Versuchsreihen kann abgeleitet werden, dass die Beschaffenheit der Glykokalyx einen Einfluss auf die Komplementaktivierung hat und dass dies in Zusammenhang mit N-glykosierten Strukturen sowie der endständigen Sialinsäure steht. Ein noch präziseres Bild von der Auswirkung der inhibierten Sialisierung könnte man in weiteren Untersuchungen durch die Behandlung der Tumorzellen mit sialinsäure-spezifischen Neuraminidasen (zum Beispiel der Neuraminidase 1) erhalten. Es gibt Hinweise darauf, dass Krebszellen empfindlicher auf die Deglykolisation durch Tunicamycin reagieren und durch eine Erhöhung des ER-Stresses Apoptose ausgelöst wird. Tunicamycin wird bereits in Studien eingesetzt, um Tumorzellen sensibler für Chemotherapie zu machen. Die

erhöhte Komplementaktivierung könnte durchaus auch die Folge von Zelltod und Opsonierung apoptotischer Zellen sein. (Wu et al. 2018)

Die beschriebene Hypersialisierung maligner Zellen ist antithetisch zur aufgestellten Hypothese, die von einer Hyposialisierung der Melanomzelle ausgegangen ist. Eine vermehrte Expression von Sialinsäure würde über die Regulation des alternativen Weges zur verminderten Komplementaktivierung führen. Sialinsäure bindet aber neben Faktor H auch an Sialinsäurebildende Glykane. Auf diese Weise findet neben der Komplementregulierung eine weitere Interaktion mit dem Immunsystem statt. (Macauley et al. 2014) Die Sialinsäure-Siglec-Achse wird seit einigen Jahren als therapeutisches Ziel untersucht und es befinden sich einige Ansätze in der präklinischen Phase. Siglecs (Sialic acid-binding-Ig-like-lectins) sind Sialinsäurebindende Lektine, die der Ig-Superfamilie angehören und die wichtigsten Immunrezeptoren für die Sialiansäure darstellen. Eine Bindung führt zur Modulation des Immunsystems. (Chu et al. 2016, Khatua et al. 2012, O'Reilly and Paulson 2009) Beim Menschen sind bisher 15 verschiedenen Siglecs bekannt, Siglec 9 ist das am häufigsten mit Tumorerkrankungen in Verbindung gebrachte Siglec, es wird unter anderem auf Monozyten, Neutrophile, dendritische Zellen, Makrophagen und einigen NK- und T-Zell-Untergruppen exprimiert. (Laubli et al. 2014, Smith and Bertozzi 2021) Eine Bindung führt zur Hemmung der Anti-Tumor-Immunität und hat damit tumorfördernden Wirkung. (Beatson et al. 2016, Haas et al. 2019, Jandus et al. 2014) Aus dieser Tatsache lässt sich ableiten, dass sich eine gleichzeitige Hypersialisierung der Tumorzelle und vermehrte Aktivierung des Komplementsystems nicht ausschließen, da die Siglecs als kompetitive Inhibitor für Faktor H agieren könnten. So könnte die protumorale Wirkung der Sia-Siglec-Achse synergistisch zur protumoralen Wirkung der Komplementaktivierung agieren. Dafür spricht auch, dass eine vollständige Desialysierung der Tumorzellen zur Zunahme des Tumorwachstums führt, wie eine 2019 durchgeführte Studie am Mausmodell mit transfizierten Kolorektalkarzinomzellen zeigen konnte. (Cornelissen et al. 2019)

In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass der Einsatz von Heparanase zu einer verstärkten Komplementaktivierung in den MV3-Zellen führt. Heparanase ist eine Endo-β-D-glukuronidase, die Heparansulfatin Fragmente von 10 bis 20 Zuckereinheiten von einer Größe von 5 bis 7 kDa spaltet. Faktor H verfügt über zwei Bindungsdomänen für GAGs, bei Bindung erfolgt die Transformation in die aktivere

57

Form. (Perkins et al. 2014) Beide Bindungsstellen (CCPs 6-8 und CCPs 19-20) haben eine höhere Affinität Heperansulfat-proteoglykane zu als zu anderen Glykosaminoglykanen. (Clark et al. 2013) Das könnte eine Erklärung für den stärkeren Effekt in den vorliegenden Experimenten sein. Es ist davon auszugehen, dass der Bindungsmechanismus durch Einwirken der Heparanase beeinträchtigt ist und die Faktor H- Heparansulfat Interaktion dadurch eingeschränkt ist. Dies wäre ein weiterer Beleg dafür, dass die Komplementaktivierung in Melanomzellen mithilfe von Faktor H reguliert wird. Heparanase selbst ist aber auch an tumorfördernden Prozessen beteiligt. Das Ausschalten des Heparanase-Gens in Melanomzellen führt zu reduziertem Tumorwachstum und weniger Lungenmetastasen, was mit verringerter Migration, Adhäsion und Invasion der Tumorzellen in Verbindung gebracht wurde. (Edovitsky et al. 2004, Liu et al. 2012, Liu et al. 2013) Der Frage ob die protumoralen Eigenschaften von tumoreigener Heparanase mit Komplementaktivierung in Verbindung gebracht werden können, gilt es noch weiter nachzugehen. Hyaluronase sowie 4-Methylumbelliferon hatten in vorliegender Arbeit keinen Einfluss auf die Komplementaktivierung. Der Grund dafür könnte sein, dass das Vorkommen von Hyaluronsäure in Melanomen allgemein gering ist und dieses geringe Vorkommen insbesondere im Zusammenhang mit Metastasierung steht. (Kosunen et al. 2004) (Karjalainen et al. 2000) Sowohl bei MV3 als auch bei BLM handelt es sich um aus Metastasen gewonnenen Melanomzellen. (Lockshin et al. 1985, van Muijen et al. 1991) Ein weiterer Faktor für den nicht vorhandenen Effekt könnte die bereits erwähnte geringere Affinität von Faktor H für Hyaluronsäure sein. Die Inkubation mit Chondroitinase ABC hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Komplementaktivierung der Melanomzellen, Chondroitinsulfat als Bestandteil der Tumorzell-Glykokalyx scheint also keinen Einfluss auf die Aktivierung des Komplementsystems auszuüben.

Da Faktor H der wichtigste Regulator des alternativen Weges ist, liegt die Annahme, dass die festgestellte Komplementaktivierung in Melanomzellen durch den alternativen Weg geschieht, nahe. Die Frage nach der Art der Aktivierung ist insbesondere in der Hinsicht auf mögliche therapeutische Ansätze von Bedeutung. Bisher haben verschiedene Studien aber gezeigt, dass die Komponenten des klassischen und alternativen Komplementwegs in der Mikroumgebung von Tumoren in höherer Konzentration vorhanden sind. (Pio et al. 2014) In Modellen von Bronchialkarzinom, Schilddrüsenkarzinom, Astrozytom, Lymphom, Leukämie oder Oropharynxkarzinom gibt es ebenfalls Hinweise auf eine Aktivierung des klassischen Weges, wie etwa erhöhte Plasmakonzentrationen des C4d-Fragments. (Ajona et al. 2013, Berraondo et al. 2016) Bei akuter lymphatischer Leukämie, Burkitt-Lymphom und multiplen Myelom gibt es Hinweise für einen deregulierten alternativen Weg, während bei T-Zell-Leukämie ein deregulierter Lektinweg gefunden wurde. (Ishida et al. 2008) Reis et al haben in einer Übersichtsarbeit die Genexpression der wichtigsten Komplementfaktoren in verschiedenen Tumorentitäten betrachtet und dabei herausgearbeitet, dass das für C3 kodierende Gen in allen Krebsarten stark exprimiert wird, ebenso wie die Gene der Komponenten des klassischen Weges. Im Gegensatz dazu werden die Gene, die die Bestandteile des Lektinwegs kodieren, in den meisten Tumorarten gering exprimiert (z.B. Mannose-bindendes Lektin 2 (MBL2), Mannosebindende Lektin-assoziierte Serinprotease 2 (MASP2) und Ficolin 2 (FCN2). (Reis et al. 2018) Die Komplementfaktoren B und D werden in den meisten Tumorarten stark exprimiert. Zusammen mit der hohen lokalen Expression von C3 deutet dies darauf hin, dass das Komplementsystem über den klassischen oder den alternativen Weg aktiviert werden könnte. Eine Aktivierung über den Lektinweg scheint nach dieser Analyse weniger wahrscheinlich. (Reis et al. 2018) Eine alternative Komplementaktivierung wie die hier vorliegenden Experimente nahelegen, fügt sich also gut in den aktuellen Stand der Forschung ein.

Abschließend kann man sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit eine Komplementaktivierung durch Melanomzellen in vitro zeigen. Diese Komplementaktivierung tritt nicht in allen Melanomzellen gleichermaßen auf, sondern am ausgeprägtesten in MV3 Zellen. Die Komplementregulation auf der Oberfläche von Melanomzellen wird vermutlich durch Faktor H reguliert, welcher durch Sialinsäure und Heparansulfat auf der Zelloberfläche gebunden und aktiviert wird. Das Ausmaß der Komplementaktivierung hängt also vom Status der Sialisierung und dem Anteil von Heparansulfat in der Glykokalyx ab. Dies sind interessante Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapiemöglichkeiten des Melanoms. Weitere Targets sind C5a und andere Bestandteile des Komplementsystems wie C3a oder Faktor H. Als vielversprechend könnte sich auch die therapeutische Beeinflussung der Sialisierung vonTumorzellen etwa durch Hemmung der an der Sialisierung beteiligten Enzyme oder der Sia-Siglec-Achse erweisen. Als nützliche prognostische Marker könnten sich zudem die Sialisierung und der Anteil von Heparansulfat der Glykokalyx eignen.

59

Hierzu ist es notwendig detailliertes Wissen über die kontextabhängigen Auswirkungen der Komplementaktivierung zu gewinnen. Wie initial erwähnt, hängt diese von vielen Faktoren ab, von denen die meisten noch nicht vollständig verstanden sind.

# 5. Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Verständnis von der Entstehung und des Fortschreitens von Krebserkrankungen grundlegend geändert. Man hat herausgefunden, dass das Immunsystem und Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle spielen. Ein wichtiger Durchbruch war dabei die Immun-Checkpoint-Therapie, die beim malignen Melanom angewandt wird. Trotz des bahnbrechenden Erfolges dieser neuen Therapieoption, bleibt das Melanom ein aggressiver Tumor, der vor allem in den Spätstadien schwer zu behandeln ist. Daher ist eine Weiterentwicklung dieses Therapiezweiges erforderlich.

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems und besteht aus einer Kaskade von enzymatisch katalysierten Plasmaproteinen. Verschiedene Studien konnten in den letzten zehn Jahren zeigen, dass tumoröse Erkrankungen mit einer veränderten Aktivierung des Komplementsystems und veränderten Konzentrationen der einzelnen Komplementfaktoren einhergehen. Es hat sich herausgestellt, dass Komplementaktivierung in einigen Krebsentitäten tumorfördernd wirkt, während es in anderen eher antitumoröse Wirkung hat. Ein wichtiger Regulator der Komplementaktivierung ist Faktor H. Um seine komplementregulatorische Funktion auszuüben, muss dieser an bestimmte Proteoglykane bzw. Sialoglykane binden.

Dabei ist schon lange bekannt, dass eine veränderte Zusammensetzung der Glykokalyx insbesondere der Sialisierung ein Merkmal maligner Zellen ist. Ob sich diese Veränderung aber auf die Aktivierung des Komplementsystems in malignen Zellen auswirkt, soll in dieser Arbeit anhand von Melanomzellen untersucht werden.

Zunächst wurde mittels Durchflusszytometrie, Immunofluorezenz und Elisa die Melanomzellreihe MV3 als solche Zelllinie identifiziert, die eine besonders hohe Komplementaktivierung zeigt. Es konnten sowohl C3b-Ablagerungen auf der Zelloberfläche gefunden als auch vermehrt C5a in den Zellüberständen nachgewiesen werden. Darin unterschied sich MV3 von den anderen melanotischen Zellen, die untersucht wurden. (BLM, B16, IG37, G361)

Um eine Bindung von Komplementfaktor C3b über seine spezifischen Komplementrezeptoren auszuschließen, wurden die Zellreihen mittels qPCR auf Expression dieser Rezeptoren und zusätzlich der Anaphylatoxinrezeptoren untersucht. Die C3b-Rezeptoren wurden nicht exprimiert, die Anaphylatoxinrezeptoren in geringen Maßen.

Um zu überprüfen, ob die Komplementaktivierung auf den Melanomzellen durch Faktor H reguliert werden kann, wurden sowohl MV3 als auch BLM Zellen auf ihre Kapazität Faktor H zu binden durchflusszytometrisch untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Komplementaktivierung und Faktor H Bindung bei den verwendeten Melanomzelllinien negativ miteinander korrelieren.

In den durchgeführten Versuchen wurden die MV3- Zellen mit Enzymen bzw. Substanzen behandelt, die die Zusammensetzung der Glykokalyx verändern. Anschließend wurde noch einmal das C3b-Bindungsvermögen untersucht. Bemerkenswert war, dass nach der Behandlung mit Heparanase und nach der Behandlung mit Tunicamycin, die C3b-Bindung signifikant erhöht war. Beide Substanzen reduzieren die Sialisierung bzw. den Anteil des Heparansulfat auf der Zelloberfläche, was darauf hinweist, dass die Faktor H Aktivierung weniger effizient abläuft und daher mehr Komplementaktivierung stattfinden kann.

Auch wenn weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Mechanismen genau zu verstehen, helfen die Ergebnisse dieser Arbeit, die Rolle der Komplementaktivierung in der Tumorphysiologie genauer zu verstehen und einzuordnen.

# Summary

In recent decades, the understanding of the development and progression of cancer has changed fundamentally. It has been discovered that the immune system and inflammatory responses play a crucial role. An important breakthrough in this regard was the immune checkpoint therapy used in malignant melanoma. Despite the breakthrough success of this new therapeutic option, melanoma remains an aggressive tumor that is difficult to treat, especially in the late stages. Therefore, further development of this therapeutic arm is needed.

The complement system is part of the innate immune system and consists of a cascade of enzymatically catalyzed plasma proteins. Various studies over the last decade have shown that tumorous diseases are associated with altered activation of the complement system and altered concentrations of the individual complement factors. Complement activation has been found to be tumor-promoting in some cancer entities, whereas it is more antitumor in others. An important regulator of complement activation is factor H. To exert its complement regulatory function, it must bind to specific proteoglycans or sialoglycans.

It has been known for a long time that an altered composition of the glycocalyx, especially of the sialization, is a characteristic of malignant cells.

However, whether this change affects the activation of the complement system in malignant cells will be investigated in this work using melanoma cells.

First, flow cytometry, immunofluorescence and Elisa were used to identify the melanoma cell series MV3 as such a cell line showing a particularly high complement activation. C3b deposits were found on the cell surface as well as increased C5a was detected in the cell supernatants. In this, MV3 differed from the other melanotic cells examined. (BLM, B16, IG37, G361)

To exclude binding of complement factor C3b via its specific complement receptors, the cell series were examined by qPCR for expression of these receptors and additionally the anaphylatoxin receptors. The C3b receptors were not expressed, and the anaphylatoxin receptors were expressed to low levels.

To test whether complement activation on melanoma cells can be regulated by factor H, both MV3 and BLM cells were examined for their capacity to bind factor H by flow cytometry. It was shown that complement activation and factor H binding were negatively correlated in the melanoma cell lines used.

In the experiments performed, MV3 cells were treated with enzymes or substances that alter the composition of the glycocalyx. Subsequently, the C3b binding capacity was examined again. Remarkably, after treatment with heparanase and after treatment with tunicamycin, C3b binding was significantly increased. Both substances reduce sialization or the amount of heparan sulfate on the cell surface, indicating that factor H activation is less efficient and therefore more complement activation can occur.

Although further studies are needed to understand the mechanisms in detail, the results of this work help to further understand and classify the role of complement activation in tumor physiology.

# 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das Komplementsystem	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung von Faktor H	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Faktor H	15
Abbildung 4: Die Glykokalyx	16
Abbildung 5: Strukturelle Darstellung von Heparansulfat	18
Abbildung 6: Strukturelle Darstellung der Sialinsäuren	19
Abbildung 7: Färbung der MV3-Zellen mit NHS (A) und HIS (B)	40
Abbildung 8: Färbung der BLM-Zellen mit NHS (A) und HIS (B)	40
Abbildung 9: Analyse der C3b/iC3b Bindung	41
Abbildung 10: Übersicht der C3b/iC3b-Bindung der untersuchten Zellen i	nach
Inkubation mit NHS	41
Abbildung 11: Gating-Strategie in der Durchflusszytometrie exemplarisch anhand	d der
MV3-Zellen	42
Abbildung 12: C5a Elisa von MV3 und BLM Zellen und der Kontrolle (nur serumfi	reies
Zellmedium) nach Inkubation mit Hirudin-Plasma	43
Abbildung 13: Komplement-Rezeptorexpression	45
Abbildung 14: Faktor H Färbung	47
Abbildung 15: C3b/iC3b Bindung der MV3-Zellen nach Inkubation mit Tunicamyc	in im
Vergleich zu Inkubation mit NHS	49
Abbildung 16: C3b/iC3b Bindung der MV3-Zellen nach Inkubation mit Heparinas	e im
Vergleich zu Inkubation mit NHS	49
Abbildung 17: C3b/iC3b Bindung nach Behandlung mit Chondroitinase A	ABC,
Hyaluronidase und 4-Methylumbelliferon	50
Abbildung 18: WGA-Färbung nach Behandlung mit Glykokalyxinhibit	oren
Einzeldarstellung Lunicamyin	51
Abbildung 19: WGA-Färbung nach Behandlung mit Chondroitinase ABC, Heparin	lase,
Hyaluronidase	51

# 7. Abkürzungsverzeichnis

	Beudetutung
Abkürzung	
Abb	Abbildung
ACD	Antikörper-abhängige zelluläre
	Zytotoxizität
AJCC	American Joint Commitee on Cancer
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BRAF	Serine/Threonine Kinase B-RAF
_C1q	Komplementfaktor C1q
<u>C2</u>	Komplementfaktor C2
<u>C3</u>	Komplementfaktor C3
C3aR	Komplementrezeptor C3a
_C4	Komplementfaktor C4
C5	Komplementfaktor C5
C5aR1	Komplementrezeptor C5a 1
C5aR2	Komplementrezeptor C5a 2
C6	Komplementfaktor C6
C7	Komplementfaktor C7
<u>C8</u>	Komplementfaktor C8
<u>C9</u>	Komplementfaktor C9
CDC	Antikörperabhängige
	komplementvermittelte Zytotoxizität
cDNA	Komlementäre Desoxyribonukleinsäure
CFB	Komplementfaktor B
CFH	Komplementfaktor H
CS	Chondroitinsulfat
CS	Chondroitinsulfat
Ct	Cycle threshold
CT	Computertomographie
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozytenantigen 4
DAPI	4`, 6 Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EMT	Epithelalie-mesenchymale-Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting,
	Durchflusszytometrie
FCN2	Ficolin-2
FCS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
GAG	Glykosaminoglykane
GPI-Anker	Glycosylphosphatidylinositol-Anker
HE	Hämatoxycilin-Eosin

HIVHumanes Immunodefizienz VirusHSHeparansulfatHSHeperansulfatIgImmunglobulineiTreg"induzierte" regulatorische T-ZelleLDHLactatdehydrogenaseMMetastasemABMonoklonale AntikörperMACMembranangriffskomplexMASPMBL-assoziierte SerinproteaseMELMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
HSHeparansulfatHSHeperansulfatIgImmunglobulineiTreg"induzierte" regulatorische T-ZelleLDHLactatdehydrogenaseMMetastasemABMonoklonale AntikörperMACMembranangriffskomplexMASPMBL-assoziierte SerinproteaseMBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
HSHeperansulfatIgImmunglobulineiTreg"induzierte" regulatorische T-ZelleLDHLactatdehydrogenaseMMetastasemABMonoklonale AntikörperMACMembranangriffskomplexMASPMBL-assoziierte SerinproteaseMBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNeEGCN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminisäureNHSNormal Human SerumNRASPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
IgImmunglobulineiTreg"induzierte" regulatorische T-ZelleLDHLactatdehydrogenaseMMetastasemABMonoklonale AntikörperMACMembranangriffskomplexMASPMBL-assoziierte SerinproteaseMBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNeEGCN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPBSPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
iTreg"induzierte" regulatorische T-ZelleLDHLactatdehydrogenaseMMetastasemABMonoklonale AntikörperMACMembranangriffskomplexMASPMBL-assoziierte SerinproteaseMBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
LDHLactatdehydrogenaseMMetastasemABMonoklonale AntikörperMACMembranangriffskomplexMASPMBL-assoziierte SerinproteaseMBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
MMetastasemABMonoklonale AntikörperMACMembranangriffskomplexMASPMBL-assoziierte SerinproteaseMBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPesphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
mABMonoklonale AntikörperMACMembranangriffskomplexMASPMBL-assoziierte SerinproteaseMBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
MACMembranangriffskomplexMASPMBL-assoziierte SerinproteaseMBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPesphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
MASPMBL-assoziierte SerinproteaseMBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
MBLMannosebindendes LectinMEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
MEKMitogen-activated protein kinase kinaseMEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASPBSPBS-TPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
MEKMitogen-aktivierte-Proteinkinase-KinaseMMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNHSNormal Human SerumNRASNeuroblastoma-RASPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
MMMalignes MelanommRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNeu5AcN-AcetylneuramininsäureNHSNormal Human SerumNRASPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
mRNAMessenger RNANNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNeu5AcN-AcetylneuramininsäureNHSNormal Human SerumNRASNeuroblastoma-RASPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
NNodus, LymphknotenNe5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNeu5AcN-AcetylneuramininsäureNHSNormal Human SerumNRASNeuroblastoma-RASPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
Ne5GcN-GlycolylneuraminsäureNETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNeu5AcN-AcetylneuramininsäureNHSNormal Human SerumNRASNeuroblastoma-RASPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
NETNeutrophil extracellular trapsNeu5AcN-AcetylneuraminsäureNeu5AcN-AcetylneuramininsäureNHSNormal Human SerumNRASNeuroblastoma-RASPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
Neu5AcN-AcetylneuraminsäureNeu5AcN-AcetylneuramininsäureNHSNormal Human SerumNRASNeuroblastoma-RASPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
Neu5AcN-AcetylneuramininsäureNHSNormal Human SerumNRASNeuroblastoma-RASPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
NHSNormal Human SerumNRASNeuroblastoma-RASPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
NRASNeuroblastoma-RASPBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
PBSPhosphat gepufferte SalzlösungPBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
PBS-TPhosphat gepufferte Salzlösung-TweenPCRPolymerase Ketten ReaktionPD-1Programmed Death 1
PCR     Polymerase Ketten Reaktion       PD-1     Programmed Death 1
PD-1 Programmed Death 1
PD-L1 Programmed Death Ligand 1
PTEN Phosphatase and Tensin Homolog
RNA Ribonukleinsäure
ROS Reaktive Sauerstoffspezies
RPM Rounds per minute
RPMI Roswell Park Memorial Institue
Zellkulturmedium
SCR short consensus repeats
Sia Sialinsäure
Siglec Sialinsäure-bindendes Lectin
SLND Sentinellymphknotendissektion
SSC Side Scatter
T Tumor
Tab Tabelle
U Ulzerationen
UV Ultraviolett
WGA Wheat germ agglutinin

# 8. Tabellenverzeichnis

.

Tabelle 1: Laborgeräte	26
Tabelle 2: Reagenzien und Substanzen	27
Tabelle 3: Puffer und Lösungen	27
Tabelle 4: Verwendete Kits	27
Tabelle 5: Verwendete Antikörper	
Tabelle 6: Verwendete Primer	28
Tabelle 7: Gebrauchsmaterialien	28
Tabelle 8: Verwendete Zellkulturmaterialien und Nährmedien	30
Tabelle 9: Verwendete Software	
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien, verwendetes Medium	31
Tabelle 11: Verwendete Glykokalyxinhibitoren	32
Tabelle 12: Pipettierschema cDNA Synthese	34
Tabelle 13: Inkubationsschema des Thermal Cyclers	34
Tabelle 14: gPCR-Ansatz pro Well	35
Tabelle 15: qPCR Programmeinstellungen LightCycler 96	35

# 9. Literaturverzeichnis

Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer. J Clin Invest.2017;127:780-789

Ahmed O. A. and Kelly C. Head and neck melanoma (excluding ocular melanoma): United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. J Laryngol Otol.2016;130:S133-S141

Ajona D., Castano Z., Garayoa M., Zudaire E., Pajares M. J., Martinez A., Cuttitta F., Montuenga L. M. and Pio R. Expression of complement factor H by lung cancer cells: effects on the activation of the alternative pathway of complement. Cancer Res.2004;64:6310-8

Ajona D., Ortiz-Espinosa S., Moreno H., Lozano T., Pajares M. J., Agorreta J., Bertolo C., Lasarte J. J., Vicent S., Hoehlig K., Vater A., Lecanda F., Montuenga L. M. and Pio R. A Combined PD-1/C5a Blockade Synergistically Protects against Lung Cancer Growth and Metastasis. Cancer Discov.2017;7:694-703

Ajona D., Ortiz-Espinosa S. and Pio R. Complement anaphylatoxins C3a and C5a: Emerging roles in cancer progression and treatment. Semin Cell Dev Biol.2019;85:153-163

Ajona D., Pajares M. J., Corrales L., Perez-Gracia J. L., Agorreta J., Lozano M. D., Torre W., Massion P. P., de-Torres J. P., Jantus-Lewintre E., Camps C., Zulueta J. J., Montuenga L. M. and Pio R. Investigation of complement activation product c4d as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer. J Natl Cancer Inst.2013;105:1385-93

Albrecht E. A., Chinnaiyan A. M., Varambally S., Kumar-Sinha C., Barrette T. R., Sarma J. V. and Ward P. A. C5a-induced gene expression in human umbilical vein endothelial cells. Am J Pathol.2004;164:849-59

Armstrong B. K. and Cust A. E. Sun exposure and skin cancer, and the puzzle of cutaneous melanoma: A perspective on Fears et al. Mathematical models of age and ultraviolet effects on the incidence of skin cancer among whites in the United States. American Journal of Epidemiology 1977; 105: 420-427. Cancer Epidemiol.2017;48:147-156

Aykut B., Pushalkar S., Chen R., Li Q., Abengozar R., Kim J. I., Shadaloey S. A., Wu D., Preiss P., Verma N., Guo Y., Saxena A., Vardhan M., Diskin B., Wang W., Leinwand J., Kurz E., Kochen Rossi J. A., Hundeyin M., Zambrinis C., Li X., Saxena D. and Miller G. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. Nature.2019;574:264-267

Barnum S. R. C4a: An Anaphylatoxin in Name Only. J Innate Immun.2015;7:333-9

Beatson R., Tajadura-Ortega V., Achkova D., Picco G., Tsourouktsoglou T. D., Klausing S., Hillier M., Maher J., Noll T., Crocker P. R., Taylor-Papadimitriou J. and Burchell J. M. The mucin MUC1 modulates the tumor immunological microenvironment through engagement of the lectin Siglec-9. Nat Immunol.2016;17:1273-1281 Berraondo P., Minute L., Ajona D., Corrales L., Melero I. and Pio R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. Immunol Rev.2016;274:290-306

Bieche I., Olivi M., Champeme M. H., Vidaud D., Lidereau R. and Vidaud M. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: application to the detection of gene amplification in breast cancer. Int J Cancer.1998;78:661-6

Blaum B. S., Hannan J. P., Herbert A. P., Kavanagh D., Uhrin D. and Stehle T. Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H. Nat Chem Biol.2015;11:77-82

Bohana-Kashtan O., Ziporen L., Donin N., Kraus S. and Fishelson Z. Cell signals transduced by complement. Mol Immunol.2004;41:583-97

Boire A., Zou Y., Shieh J., Macalinao D. G., Pentsova E. and Massague J. Complement Component 3 Adapts the Cerebrospinal Fluid for Leptomeningeal Metastasis. Cell.2017;168:1101-1113 e13

Boligan K. F., Mesa C., Fernandez L. E. and von Gunten S. Cancer intelligence acquired (CIA): tumor glycosylation and sialylation codes dismantling antitumor defense. Cell Mol Life Sci.2015;72:1231-48

Bonavita E., Gentile S., Rubino M., Maina V., Papait R., Kunderfranco P., Greco C., Feruglio F., Molgora M., Laface I., Tartari S., Doni A., Pasqualini F., Barbati E., Basso G., Galdiero M. R., Nebuloni M., Roncalli M., Colombo P., Laghi L., Lambris J. D., Jaillon S., Garlanda C. and Mantovani A. PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer. Cell.2015;160:700-714

Brinkman-Van der Linden E. C., Sjoberg E. R., Juneja L. R., Crocker P. R., Varki N. and Varki A. Loss of N-glycolylneuraminic acid in human evolution. Implications for sialic acid recognition by siglecs. J Biol Chem.2000;275:8633-40

Bull C., Stoel M. A., den Brok M. H. and Adema G. J. Sialic acids sweeten a tumor's life. Cancer Res.2014;74:3199-204

Bulla R., Tripodo C., Rami D., Ling G. S., Agostinis C., Guarnotta C., Zorzet S., Durigutto P., Botto M. and Tedesco F. C1q acts in the tumour microenvironment as a cancer-promoting factor independently of complement activation. Nat Commun.2016;7:10346

Camacho L. H. CTLA-4 blockade with ipilimumab: biology, safety, efficacy, and future considerations. Cancer Med.2015;4:661-72

Carroll M. C. The role of complement in B cell activation and tolerance. Adv Immunol.2000;74:61-88

Carroll M. C. and Isenman D. E. Regulation of humoral immunity by complement. Immunity.2012;37:199-207

Chenoweth D. E. and Goodman M. G. The C5a receptor of neutrophils and macrophages. Agents Actions Suppl.1983;12:252-73

Cheung C. H. Y., Cheng C. K., Lau K. M., Ip R. K. L., Chan N. C. N., Tam T. H. C., Wong R. S. M., Raghupathy R., Chan N. P. H. and Ng M. H. L. Prevalence and Clinicopathologic Significance of BRAF V600E Mutation in Chinese Multiple Myeloma Patients. Clin Lymphoma Myeloma Leuk.2018;18:e315-e325

Cho M. S., Rupaimoole R., Choi H. J., Noh K., Chen J., Hu Q., Sood A. K. and Afshar-Kharghan V. Complement Component 3 Is Regulated by TWIST1 and Mediates Epithelial-Mesenchymal Transition. J Immunol.2016;196:1412-8

Cho M. S., Vasquez H. G., Rupaimoole R., Pradeep S., Wu S., Zand B., Han H. D., Rodriguez-Aguayo C., Bottsford-Miller J., Huang J., Miyake T., Choi H. J., Dalton H. J., Ivan C., Baggerly K., Lopez-Berestein G., Sood A. K. and Afshar-Kharghan V. Autocrine effects of tumor-derived complement. Cell Rep.2014;6:1085-1095

Chu S., Zhu X., You N., Zhang W., Zheng F., Cai B., Zhou T., Wang Y., Sun Q., Yang Z., Zhang X., Wang C., Nie S., Zhu J. and Wang M. The Fab Fragment of a Human Anti-Siglec-9 Monoclonal Antibody Suppresses LPS-Induced Inflammatory Responses in Human Macrophages. Front Immunol.2016;7:649

Clark S. J., Ridge L. A., Herbert A. P., Hakobyan S., Mulloy B., Lennon R., Würzner R., Morgan B. P., Uhrín D., Bishop P. N. and Day A. J. Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions. J Immunol.2013;190:2049-57

Contractor T., Kobayashi S., da Silva E., Clausen R., Chan C., Vosburgh E., Tang L. H., Levine A. J. and Harris C. R. Sexual dimorphism of liver metastasis by murine pancreatic neuroendocrine tumors is affected by expression of complement C5. Oncotarget.2016;7:30585-96

Cornelissen L. A. M., Blanas A., van der Horst J. C., Kruijssen L., Zaal A., O'Toole T., Wiercx L., van Kooyk Y. and van Vliet S. J. Disruption of sialic acid metabolism drives tumor growth by augmenting CD8(+) T cell apoptosis. Int J Cancer.2019;144:2290-2302

Corrales L., Ajona D., Rafail S., Lasarte J. J., Riezu-Boj J. I., Lambris J. D., Rouzaut A., Pajares M. J., Montuenga L. M. and Pio R. Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. J Immunol.2012;189:4674-83

Criscuolo B. A. and Krag S. S. Selection of tunicamycin-resistant Chinese hamster ovary cells with increased N-acetylglucosaminyltransferase activity. J Cell Biol.1982;94:586-91

Curtin J. A., Fridlyand J., Kageshita T., Patel H. N., Busam K. J., Kutzner H., Cho K. H., Aiba S., Brocker E. B., LeBoit P. E., Pinkel D. and Bastian B. C. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. N Engl J Med.2005;353:2135-47

Dahinden C. A., Bischoff S. C., Brunner T., Krieger M., Takafuji S. and de Weck A. L. Regulation of mediator release by human basophils: importance of the sequence and time of addition in the combined action of different agonists. Int Arch Allergy Appl Immunol.1991;94:161-4

Daugan M. V., Revel M., Russick J., Dragon-Durey M. A., Gaboriaud C., Robe-Rybkine T., Poillerat V., Grunenwald A., Lacroix G., Bougouin A., Meylan M., Verkarre V., Oudard S. M., Mejean A., Vano Y. A., Perkins G., Validire P., Cathelineau X., Sanchez-Salas R., Damotte D., Fremeaux-Bacchi V., Cremer I., Sautes-Fridman C., Fridman W. H. and Roumenina L. T. Complement C1s and C4d as Prognostic Biomarkers in Renal Cancer: Emergence of Noncanonical Functions of C1s. Cancer Immunol Res.2021;9:891-908

Daugan M. V., Revel M., Thouenon R., Dragon-Durey M. A., Robe-Rybkine T., Torset C., Merle N. S., Noe R., Verkarre V., Oudard S. M., Mejean A., Validire P., Cathelineau X., Sanchez-Salas R., Pickering M. C., Cremer I., Mansuet-Lupo A., Alifano M., Sautes-Fridman C., Damotte D., Fridman W. H. and Roumenina L. T. Intracellular Factor H Drives Tumor Progression Independently of the Complement Cascade. Cancer Immunol Res.2021;9:909-925

Derer S., Beurskens F. J., Rosner T., Peipp M. and Valerius T. Complement in antibody-based tumor therapy. Crit Rev Immunol.2014;34:199-214

Dobie C. and Skropeta D. Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis. Br J Cancer.2021;124:76-90

Edovitsky E., Elkin M., Zcharia E., Peretz T. and Vlodavsky I. Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. J Natl Cancer Inst.2004;96:1219-30

Elbein A. D. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides. CRC Crit Rev Biochem.1984;16:21-49

Elsner J., Oppermann M., Czech W., Dobos G., Schopf E., Norgauer J. and Kapp A. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. Eur J Immunol.1994;24:518-22

Elvington M., Huang Y., Morgan B. P., Qiao F., van Rooijen N., Atkinson C. and Tomlinson S. A targeted complement-dependent strategy to improve the outcome of mAb therapy, and characterization in a murine model of metastatic cancer. Blood.2012;119:6043-51

Erdei A., Kerekes K. and Pecht I. Role of C3a and C5a in the activation of mast cells. Exp Clin Immunogenet.1997;14:16-8

Erdmann F., Spix C., Katalinic A., Christ M., Folkerts J., Hansmann J., Kranzhöfer K., Kunz B., Manegold K. and Penzkofer A. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2021,

Eroglu Z. and Ribas A. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. Ther Adv Med Oncol.2016;8:48-56

Fayyazi A., Scheel O., Werfel T., Schweyer S., Oppermann M., Gotze O., Radzun H. J. and Zwirner J. The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells. Immunology.2000;99:38-45

Fearon D. T. The complement system and adaptive immunity. Semin Immunol.1998;10:355-61

Fishelson Z. and Kirschfink M. Complement C5b-9 and Cancer: Mechanisms of Cell Damage, Cancer Counteractions, and Approaches for Intervention. Front Immunol.2019;10:752

Flaherty K. T., Infante J. R., Daud A., Gonzalez R., Kefford R. F., Sosman J., Hamid O., Schuchter L., Cebon J., Ibrahim N., Kudchadkar R., Burris H. A., 3rd, Falchook G., Algazi A., Lewis K., Long G. V., Puzanov I., Lebowitz P., Singh A., Little S., Sun P., Allred A., Ouellet D., Kim K. B., Patel K. and Weber J. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. N Engl J Med.2012;367:1694-703

Freeley S., Kemper C. and Le Friec G. The "ins and outs" of complement-driven immune responses. Immunol Rev.2016;274:16-32

Fuster M. M. and Esko J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. Nat Rev Cancer.2005;5:526-42

Garbe C., Buttner P., Weiss J., Soyer H. P., Stocker U., Kruger S., Roser M., Weckbecker J., Panizzon R., Bahmer F. and et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter casecontrol study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. J Invest Dermatol.1994;102:695-9

Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. Mol Immunol.2004;41:1089-98

Grob J. J., Gouvernet J., Aymar D., Mostaque A., Romano M. H., Collet A. M., Noe M. C., Diconstanzo M. P. and Bonerandi J. J. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. Cancer.1990;66:387-95

Guo F., Feng Y. C., Zhao G., Zhang R., Cheng Z. Z., Kong W. N., Wu H. L., Xu B., Lv X. and Ma X. M. Tumor-Associated CD163(+) M2 Macrophage Infiltration is Highly Associated with PD-L1 Expression in Cervical Cancer. Cancer Manag Res.2020;12:5831-5843

Haas Q., Boligan K. F., Jandus C., Schneider C., Simillion C., Stanczak M. A., Haubitz M., Seyed Jafari S. M., Zippelius A., Baerlocher G. M., Laubli H., Hunger R. E., Romero P., Simon H. U. and von Gunten S. Siglec-9 Regulates an Effector Memory CD8(+) T-cell Subset That Congregates in the Melanoma Tumor Microenvironment. Cancer Immunol Res.2019;7:707-718

Habermann J. K., Roblick U. J., Luke B. T., Prieto D. A., Finlay W. J., Podust V. N., Roman J. M., Oevermann E., Schiedeck T., Homann N., Duchrow M., Conrads T. P., Veenstra T. D., Burt S. K., Bruch H. P., Auer G. and Ried T. Increased serum levels of complement C3a anaphylatoxin indicate the presence of colorectal tumors. Gastroenterology.2006;131:1020-9; quiz 1284

Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F. S., Hwu W. J., Kefford R., Wolchok J. D., Hersey P., Joseph R., Weber J. S., Dronca R., Mitchell T. C., Patnaik A., Zarour H. M., Joshua A. M., Zhao Q., Jensen E., Ahsan S., Ibrahim N. and Ribas A. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001. Ann Oncol.2019;30:582-588 Harboe M., Garred P., Karlstrom E., Lindstad J. K., Stahl G. L. and Mollnes T. E. The down-stream effects of mannan-induced lectin complement pathway activation depend quantitatively on alternative pathway amplification. Mol Immunol.2009;47:373-80

Harboe M., Ulvund G., Vien L., Fung M. and Mollnes T. E. The quantitative role of alternative pathway amplification in classical pathway induced terminal complement activation. Clin Exp Immunol.2004;138:439-46

Hargadon K. M., Johnson C. E. and Williams C. J. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. Int Immunopharmacol.2018;62:29-39

Helmy K. Y., Katschke K. J., Jr., Gorgani N. N., Kljavin N. M., Elliott J. M., Diehl L., Scales S. J., Ghilardi N. and van Lookeren Campagne M. CRIg: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. Cell.2006;124:915-27

Herbert A. P., Makou E., Chen Z. A., Kerr H., Richards A., Rappsilber J. and Barlow P. N. Complement Evasion Mediated by Enhancement of Captured Factor H: Implications for Protection of Self-Surfaces from Complement. J Immunol.2015;195:4986-98

Holly E. A., Kelly J. W., Shpall S. N. and Chiu S. H. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. J Am Acad Dermatol.1987;17:459-68

Hossler P., Mulukutla B. C. and Hu W. S. Systems analysis of N-glycan processing in mammalian cells. PLoS One.2007;2:e713

Hu X. and Weinbaum S. A new view of Starling's hypothesis at the microstructural level. Microvasc Res.1999;58:281-304

Hugdahl E., Kalvenes M. B., Puntervoll H. E., Ladstein R. G. and Akslen L. A. BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival. Br J Cancer.2016;114:801-8

Ishida Y., Yamashita K., Sasaki H., Takajou I., Kubuki Y., Morishita K., Tsubouchi H. and Okayama A. Activation of complement system in adult T-cell leukemia (ATL) occurs mainly through lectin pathway: a serum proteomic approach using mass spectrometry. Cancer Lett.2008;271:167-77

Jacquelot N., Roberti M. P., Enot D. P., Rusakiewicz S., Ternes N., Jegou S., Woods D. M., Sodre A. L., Hansen M., Meirow Y., Sade-Feldman M., Burra A., Kwek S. S., Flament C., Messaoudene M., Duong C. P. M., Chen L., Kwon B. S., Anderson A. C., Kuchroo V. K., Weide B., Aubin F., Borg C., Dalle S., Beatrix O., Ayyoub M., Balme B., Tomasic G., Di Giacomo A. M., Maio M., Schadendorf D., Melero I., Dreno B., Khammari A., Dummer R., Levesque M., Koguchi Y., Fong L., Lotem M., Baniyash M., Schmidt H., Svane I. M., Kroemer G., Marabelle A., Michiels S., Cavalcanti A., Smyth M. J., Weber J. S., Eggermont A. M. and Zitvogel L. Predictors of responses to immune checkpoint blockade in advanced melanoma. Nat Commun.2017;8:592

Jandus C., Boligan K. F., Chijioke O., Liu H., Dahlhaus M., Demoulins T., Schneider C., Wehrli M., Hunger R. E., Baerlocher G. M., Simon H. U., Romero P., Munz C. and
von Gunten S. Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. J Clin Invest.2014;124:1810-20

Jozsi M. and Zipfel P. F. Factor H family proteins and human diseases. Trends Immunol.2008;29:380-7

Jun L., Yuanshu W., Yanying X., Zhongfa X., Jian Y., Fengling W., Xianjun Q., Kokudo N., Wei T., Weixia Z. and Shuxiang C. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in human gastric cancer tissues. Med Oncol.2012;29:84-90

Junnikkala S., Hakulinen J., Jarva H., Manuelian T., Bjorge L., Butzow R., Zipfel P. F. and Meri S. Secretion of soluble complement inhibitors factor H and factor H-like protein (FHL-1) by ovarian tumour cells. Br J Cancer.2002;87:1119-27

Kaida T., Nitta H., Kitano Y., Yamamura K., Arima K., Izumi D., Higashi T., Kurashige J., Imai K., Hayashi H., Iwatsuki M., Ishimoto T., Hashimoto D., Yamashita Y., Chikamoto A., Imanura T., Ishiko T., Beppu T. and Baba H. C5a receptor (CD88) promotes motility and invasiveness of gastric cancer by activating RhoA. Oncotarget.2016;7:84798-84809

Karasarides M., Cogdill A. P., Robbins P. B., Bowden M., Burton E. M., Butterfield L. H., Cesano A., Hammer C., Haymaker C. L., Horak C. E., McGee H. M., Monette A., Rudqvist N. P., Spencer C. N., Sweis R. F., Vincent B. G., Wennerberg E., Yuan J., Zappasodi R., Lucey V. M. H., Wells D. K. and LaVallee T. Hallmarks of Resistance to Immune-Checkpoint Inhibitors. Cancer Immunol Res.2022;10:372-383

Karjalainen J. M., Tammi R. H., Tammi M. I., Eskelinen M. J., Agren U. M., Parkkinen J. J., Alhava E. M. and Kosma V. M. Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. Am J Pathol.2000;157:957-65

Karsten C. M. and Kohl J. The immunoglobulin, IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. Immunobiology.2012;217:1067-79

Khatua B., Bhattacharya K. and Mandal C. Sialoglycoproteins adsorbed by Pseudomonas aeruginosa facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9. J Leukoc Biol.2012;91:641-55

Kornfeld R. and Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev Biochem. 1985;54:631-64

Kosunen A., Ropponen K., Kellokoski J., Pukkila M., Virtaniemi J., Valtonen H., Kumpulainen E., Johansson R., Tammi R., Tammi M., Nuutinen J. and Kosma V. M. Reduced expression of hyaluronan is a strong indicator of poor survival in oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol.2004;40:257-63

Krisinger M. J., Goebeler V., Lu Z., Meixner S. C., Myles T., Pryzdial E. L. and Conway E. M. Thrombin generates previously unidentified C5 products that support the terminal complement activation pathway. Blood.2012;120:1717-25

Kusmartsev S., Nefedova Y., Yoder D. and Gabrilovich D. I. Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. J Immunol.2004;172:989-99

Lachmann P. J. The amplification loop of the complement pathways. Adv Immunol.2009;104:115-49

Larkin J., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Grob J. J., Rutkowski P., Lao C. D., Cowey C. L., Schadendorf D., Wagstaff J., Dummer R., Ferrucci P. F., Smylie M., Hogg D., Hill A., Marquez-Rodas I., Haanen J., Guidoboni M., Maio M., Schoffski P., Carlino M. S., Lebbe C., McArthur G., Ascierto P. A., Daniels G. A., Long G. V., Bastholt L., Rizzo J. I., Balogh A., Moshyk A., Hodi F. S. and Wolchok J. D. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med.2019;381:1535-1546

Laubli H., Pearce O. M., Schwarz F., Siddiqui S. S., Deng L., Stanczak M. A., Deng L., Verhagen A., Secrest P., Lusk C., Schwartz A. G., Varki N. M., Bui J. D. and Varki A. Engagement of myelomonocytic Siglecs by tumor-associated ligands modulates the innate immune response to cancer. Proc Natl Acad Sci U S A.2014;111:14211-6

Law S. K. and Levine R. P. Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. Proc Natl Acad Sci U S A.1977;74:2701-5

Li K., Fazekasova H., Wang N., Sagoo P., Peng Q., Khamri W., Gomes C., Sacks S. H., Lombardi G. and Zhou W. Expression of complement components, receptors and regulators by human dendritic cells. Mol Immunol.2011;48:1121-7

Liszewski M. K., Kolev M., Le Friec G., Leung M., Bertram P. G., Fara A. F., Subias M., Pickering M. C., Drouet C., Meri S., Arstila T. P., Pekkarinen P. T., Ma M., Cope A., Reinheckel T., Rodriguez de Cordoba S., Afzali B., Atkinson J. P. and Kemper C. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. Immunity.2013;39:1143-57

Liu X., Fang H., Chen H., Jiang X., Fang D., Wang Y. and Zhu D. An artificial miRNA against HPSE suppresses melanoma invasion properties, correlating with a down-regulation of chemokines and MAPK phosphorylation. PLoS One.2012;7:e38659

Liu X., Wang Y., Bauer A. T., Kirschfink M., Ding P., Gebhardt C., Borsig L., Tuting T., Renne T., Haffner K., Hu W., Schneider S. W. and Gorzelanny C. Neutrophils activated by membrane attack complexes increase the permeability of melanoma blood vessels. Proc Natl Acad Sci U S A.2022;119:e2122716119

Liu X. Y., Tang Q. S., Chen H. C., Jiang X. L. and Fang H. Lentiviral miR30-based RNA interference against heparanase suppresses melanoma metastasis with lower liver and lung toxicity. Int J Biol Sci.2013;9:564-77

Livingstone E., Swann S., Lilla C., Schadendorf D. and Roesch A. Combining BRAF(V) (600E) inhibition with modulators of the mitochondrial bioenergy metabolism to overcome drug resistance in metastatic melanoma. Exp Dermatol.2015;24:709-10

Lockshin A., Giovanella B. C., De Ipolyi P. D., Williams L. J., Jr., Mendoza J. T., Yim S. O. and Stehlin J. S., Jr. Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma. Cancer Res.1985;45:345-50

Lucas S. D., Karlsson-Parra A., Nilsson B., Grimelius L., Akerstrom G., Rastad J. and Juhlin C. Tumor-specific deposition of immunoglobulin G and complement in papillary thyroid carcinoma. Hum Pathol.1996;27:1329-35

Luke J. J. and Hodi F. S. Ipilimumab, vemurafenib, dabrafenib, and trametinib: synergistic competitors in the clinical management of BRAF mutant malignant melanoma. Oncologist.2013;18:717-25

Macauley M. S., Crocker P. R. and Paulson J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. Nat Rev Immunol.2014;14:653-66

Mackiewicz J. and Mackiewicz A. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. Contemp Oncol (Pozn).2018;22:68-72

Maggioni A., von Itzstein M., Rodriguez Guzman I. B., Ashikov A., Stephens A. S., Haselhorst T. and Tiralongo J. Characterisation of CMP-sialic acid transporter substrate recognition. Chembiochem.2013;14:1936-42

Mamidi S., Hone S. and Kirschfink M. The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. Immunobiology.2017;222:45-54

Markiewski M. M., DeAngelis R. A., Benencia F., Ricklin-Lichtsteiner S. K., Koutoulaki A., Gerard C., Coukos G. and Lambris J. D. Modulation of the antitumor immune response by complement. Nat Immunol.2008;9:1225-35

Markiewski M. M. and Lambris J. D. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. Am J Pathol.2007;171:715-27

Markiewski M. M. and Lambris J. D. Is complement good or bad for cancer patients? A new perspective on an old dilemma. Trends Immunol.2009;30:286-92

Matsutani M., Suzuki T., Hori T., Terao H., Takakura K. and Nishioka K. Cellular immunity and complement levels in hosts with brain tumours. Neurosurg Rev.1984;7:29-35

McCoy K., Camberis M. and Gros G. L. Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. J Exp Med.1997;186:183-7

Medler T. R., Murugan D., Horton W., Kumar S., Cotechini T., Forsyth A. M., Leyshock P., Leitenberger J. J., Kulesz-Martin M., Margolin A. A., Werb Z. and Coussens L. M. Complement C5a Fosters Squamous Carcinogenesis and Limits T Cell Response to Chemotherapy. Cancer Cell.2018;34:561-578 e6

Merle N. S., Church S. E., Fremeaux-Bacchi V. and Roumenina L. T. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. Front Immunol.2015;6:262

Michael M., Bagga A., Sartain S. E. and Smith R. J. H. Haemolytic uraemic syndrome. Lancet.2022;400:1722-1740

Monk P. N., Scola A. M., Madala P. and Fairlie D. P. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. Br J Pharmacol.2007;152:429-48

Mulivor A. W. and Lipowsky H. H. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. Am J Physiol Heart Circ Physiol.2004;286:H1672-80

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. and Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol.1986;51 Pt 1:263-73

Muraki M., Ishimura M. and Harata K. Interactions of wheat-germ agglutinin with GlcNAc beta 1,6Gal sequence. Biochim Biophys Acta.2002;1569:10-20

Nabizadeh J. A., Manthey H. D., Steyn F. J., Chen W., Widiapradja A., Md Akhir F. N., Boyle G. M., Taylor S. M., Woodruff T. M. and Rolfe B. E. The Complement C3a Receptor Contributes to Melanoma Tumorigenesis by Inhibiting Neutrophil and CD4+ T Cell Responses. J Immunol.2016;196:4783-92

Nalcaci S., Palamar M., Yaman B., Akalin T. and Mentes J. Choroidal malignant melanoma with no extraocular extension presenting as orbital cellulitis. Orbit.2016;35:285-7

Niculescu F., Rus H. G., Retegan M. and Vlaicu R. Persistent complement activation on tumor cells in breast cancer. Am J Pathol.1992;140:1039-43

Nitta H., Murakami Y., Wada Y., Eto M., Baba H. and Imamura T. Cancer cells release anaphylatoxin C5a from C5 by serine protease to enhance invasiveness. Oncol Rep.2014;32:1715-9

Nitta H., Wada Y., Kawano Y., Murakami Y., Irie A., Taniguchi K., Kikuchi K., Yamada G., Suzuki K., Honda J., Wilson-Morifuji M., Araki N., Eto M., Baba H. and Imamura T. Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a receptor (CD88). Clin Cancer Res.2013;19:2004-13

O'Reilly M. K. and Paulson J. C. Siglecs as targets for therapy in immune-cellmediated disease. Trends Pharmacol Sci.2009;30:240-8

Pal H. C., Hunt K. M., Diamond A., Elmets C. A. and Afaq F. Phytochemicals for the Management of Melanoma. Mini Rev Med Chem.2016;16:953-79

Pangburn M. K. Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. Immunopharmacology.2000;49:149-57

Pangburn M. K., Morrison D. C., Schreiber R. D. and Müller-Eberhard H. J. Activation of the alternative complement pathway: recognition of surface structures on activators by bound C3b. J Immunol.1980;124:977-82

Pangburn M. K., Schreiber R. D. and Muller-Eberhard H. J. Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. J Exp Med.1977;146:257-70

Paszek M. J., DuFort C. C., Rossier O., Bainer R., Mouw J. K., Godula K., Hudak J. E., Lakins J. N., Wijekoon A. C., Cassereau L., Rubashkin M. G., Magbanua M. J., Thorn K. S., Davidson M. W., Rugo H. S., Park J. W., Hammer D. A., Giannone G.,

Bertozzi C. R. and Weaver V. M. The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. Nature.2014;511:319-25

Perkins S. J., Fung K. W. and Khan S. Molecular Interactions between Complement Factor H and Its Heparin and Heparan Sulfate Ligands. Front Immunol.2014;5:126

Pflugfelder A., Kochs C., Blum A., Capellaro M., Czeschik C., Dettenborn T., Dill D., Dippel E., Eigentler T., Feyer P., Follmann M., Frerich B., Ganten M. K., Gartner J., Gutzmer R., Hassel J., Hauschild A., Hohenberger P., Hubner J., Kaatz M., Kleeberg U. R., Kolbl O., Kortmann R. D., Krause-Bergmann A., Kurschat P., Leiter U., Link H., Loquai C., Loser C., Mackensen A., Meier F., Mohr P., Mohrle M., Nashan D., Reske S., Rose C., Sander C., Satzger I., Schiller M., Schlemmer H. P., Strittmatter G., Sunderkotter C., Swoboda L., Trefzer U., Voltz R., Vordermark D., Weichenthal M., Werner A., Wesselmann S., Weyergraf A. J., Wick W., Garbe C., Schadendorf D. and German Society of D. S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma" -short version. J Dtsch Dermatol Ges.2013;11:563-602

Piao C., Cai L., Qiu S., Jia L., Song W. and Du J. Complement 5a Enhances Hepatic Metastases of Colon Cancer via Monocyte Chemoattractant Protein-1-mediated Inflammatory Cell Infiltration. J Biol Chem.2015;290:10667-76

Pinho S. S. and Reis C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. Nat Rev Cancer.2015;15:540-55

Pio R., Ajona D. and Lambris J. D. Complement inhibition in cancer therapy. Semin Immunol.2013;25:54-64

Pio R., Corrales L. and Lambris J. D. The role of complement in tumor growth. Adv Exp Med Biol.2014;772:229-62

Pries A. R., Secomb T. W. and Gaehtgens P. The endothelial surface layer. Pflugers Arch.2000;440:653-66

Rabinovich G. A. and Croci D. O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. Immunity.2012;36:322-35

Ralli M., Botticelli A., Visconti I. C., Angeletti D., Fiore M., Marchetti P., Lambiase A., de Vincentiis M. and Greco A. Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. J Immunol Res.2020;2020:9235638

Ranjan A. and Kalraiya R. D. alpha2,6 sialylation associated with increased beta 1,6branched N-oligosaccharides influences cellular adhesion and invasion. J Biosci.2013;38:867-76

Ratajczak M. Z., Reca R., Wysoczynski M., Kucia M., Baran J. T., Allendorf D. J., Ratajczak J. and Ross G. D. Transplantation studies in C3-deficient animals reveal a novel role of the third complement component (C3) in engraftment of bone marrow cells. Leukemia.2004;18:1482-90

Reca R., Mastellos D., Majka M., Marquez L., Ratajczak J., Franchini S., Glodek A., Honczarenko M., Spruce L. A., Janowska-Wieczorek A., Lambris J. D. and Ratajczak M. Z. Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1. Blood.2003;101:3784-93

Reis E. S., Barbuto J. A., Kohl J. and Isaac L. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. Mol Immunol.2008;45:1952-62

Reis E. S., Mastellos D. C., Ricklin D., Mantovani A. and Lambris J. D. Complement in cancer: untangling an intricate relationship. Nat Rev Immunol.2018;18:5-18

Reitsma S., Slaaf D. W., Vink H., van Zandvoort M. A. and oude Egbrink M. G. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. Pflugers Arch.2007;454:345-59

Riihila P., Nissinen L., Farshchian M., Kallajoki M., Kivisaari A., Meri S., Grenman R., Peltonen S., Peltonen J., Pihlajaniemi T., Heljasvaara R. and Kahari V. M. Complement Component C3 and Complement Factor B Promote Growth of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. Am J Pathol.2017;187:1186-1197

Robbins H. A., Clarke C. A., Arron S. T., Tatalovich Z., Kahn A. R., Hernandez B. Y., Paddock L., Yanik E. L., Lynch C. F. and Kasiske B. L. Melanoma risk and survival among organ transplant recipients. Journal of Investigative Dermatology.2015;135:2657-2665

Rodriguez de Cordoba S., Esparza-Gordillo J., Goicoechea de Jorge E., Lopez-Trascasa M. and Sanchez-Corral P. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. Mol Immunol.2004;41:355-67

Rooijakkers S. H., Wu J., Ruyken M., van Domselaar R., Planken K. L., Tzekou A., Ricklin D., Lambris J. D., Janssen B. J., van Strijp J. A. and Gros P. Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor. Nat Immunol.2009;10:721-7

Roumenina L. T., Daugan M. V., Petitprez F., Sautes-Fridman C. and Fridman W. H. Context-dependent roles of complement in cancer. Nat Rev Cancer.2019;19:698-715

Rutkowski M. J., Sughrue M. E., Kane A. J., Mills S. A. and Parsa A. T. Cancer and the complement cascade. Mol Cancer Res.2010;8:1453-65

Sacks S. H. Complement fragments C3a and C5a: the salt and pepper of the immune response. Eur J Immunol.2010;40:668-70

Schachter J., Ribas A., Long G. V., Arance A., Grob J. J., Mortier L., Daud A., Carlino M. S., McNeil C., Lotem M., Larkin J., Lorigan P., Neyns B., Blank C., Petrella T. M., Hamid O., Zhou H., Ebbinghaus S., Ibrahim N. and Robert C. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). Lancet.2017;390:1853-1862

Schmidt E. P., Yang Y., Janssen W. J., Gandjeva A., Perez M. J., Barthel L., Zemans R. L., Bowman J. C., Koyanagi D. E., Yunt Z. X., Smith L. P., Cheng S. S., Overdier K. H., Thompson K. R., Geraci M. W., Douglas I. S., Pearse D. B. and Tuder R. M. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. Nat Med.2012;18:1217-23

Schmudde I., Laumonnier Y. and Kohl J. Anaphylatoxins coordinate innate and adaptive immune responses in allergic asthma. Semin Immunol.2013;25:2-11

Schneider F., Kemmner W., Haensch W., Franke G., Gretschel S., Karsten U. and Schlag P. M. Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid:Galbeta1,3GalNAc-R alpha6-Sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. Cancer Res.2001;61:4605-11

Schraufstatter I. U., Discipio R. G., Zhao M. and Khaldoyanidi S. K. C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. J Immunol.2009;182:3827-36

Seales E. C., Jurado G. A., Brunson B. A., Wakefield J. K., Frost A. R. and Bellis S. L. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. Cancer Res.2005;65:4645-52

Sell S. Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. Hum Pathol.1990;21:1003-19

Silsirivanit A. Glycosylation markers in cancer. Adv Clin Chem.2019;89:189-213

Sliwkowski M. X. and Mellman I. Antibody therapeutics in cancer. Science.2013;341:1192-8

Smith B. A. H. and Bertozzi C. R. The clinical impact of glycobiology: targeting selectins, Siglecs and mammalian glycans. Nat Rev Drug Discov.2021;20:217-243

Smolag K. I., Mueni C. M., Leandersson K., Jirstrom K., Hagerling C., Morgelin M., Barlow P. N., Martin M. and Blom A. M. Complement inhibitor factor H expressed by breast cancer cells differentiates CD14(+) human monocytes into immunosuppressive macrophages. Oncoimmunology.2020;9:1731135

Sokoloff M. H., Nardin A., Solga M. D., Lindorfer M. A., Sutherland W. M., Bankovich A. J., Zhau H. E., Chung L. W. and Taylor R. P. Targeting of cancer cells with monoclonal antibodies specific for C3b(i). Cancer Immunol Immunother.2000;49:551-62

Stover C. Dual role of complement in tumour growth and metastasis (Review). Int J Mol Med.2010;25:307-13

Strainic M. G., Liu J., Huang D., An F., Lalli P. N., Muqim N., Shapiro V. S., Dubyak G. R., Heeger P. S. and Medof M. E. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. Immunity.2008;28:425-35

Suzuki R., Okubo Y., Takagi T., Sugimoto M., Sato Y., Irie H., Nakamura J., Takasumi M., Kato T., Hashimoto M., Kobashi R., Hikichi T. and Ohira H. The Complement C3a-C3a Receptor Axis Regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Activating the ERK Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Anticancer Res.2022;42:1207-1215 Tarbell J. M. and Cancel L. M. The glycocalyx and its significance in human medicine. J Intern Med.2016;280:97-113

Taylor R. P. and Lindorfer M. A. Cytotoxic mechanisms of immunotherapy: Harnessing complement in the action of anti-tumor monoclonal antibodies. Semin Immunol.2016;28:309-16

Thurman J. M. and Holers V. M. The central role of the alternative complement pathway in human disease. J Immunol.2006;176:1305-10

Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., Gettinger S. N., Smith D. C., McDermott D. F., Powderly J. D., Carvajal R. D., Sosman J. A., Atkins M. B., Leming P. D., Spigel D. R., Antonia S. J., Horn L., Drake C. G., Pardoll D. M., Chen L., Sharfman W. H., Anders R. A., Taube J. M., McMiller T. L., Xu H., Korman A. J., Jure-Kunkel M., Agrawal S., McDonald D., Kollia G. D., Gupta A., Wigginton J. M. and Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med.2012;366:2443-54

Towner L. D., Wheat R. A., Hughes T. R. and Morgan B. P. Complement Membrane Attack and Tumorigenesis: A SYSTEMS BIOLOGY APPROACH. J Biol Chem.2016;291:14927-38

Ushiyama A., Kataoka H. and Iijima T. Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiologies. J Intensive Care.2016;4:59

Vadrevu S. K., Chintala N. K., Sharma S. K., Sharma P., Cleveland C., Riediger L., Manne S., Fairlie D. P., Gorczyca W., Almanza O., Karbowniczek M. and Markiewski M. M. Complement c5a receptor facilitates cancer metastasis by altering T-cell responses in the metastatic niche. Cancer Res.2014;74:3454-65

Van Allen E. M., Wagle N., Sucker A., Treacy D. J., Johannessen C. M., Goetz E. M., Place C. S., Taylor-Weiner A., Whittaker S., Kryukov G. V., Hodis E., Rosenberg M., McKenna A., Cibulskis K., Farlow D., Zimmer L., Hillen U., Gutzmer R., Goldinger S. M., Ugurel S., Gogas H. J., Egberts F., Berking C., Trefzer U., Loquai C., Weide B., Hassel J. C., Gabriel S. B., Carter S. L., Getz G., Garraway L. A., Schadendorf D. and Dermatologic Cooperative Oncology Group of G. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma. Cancer Discov.2014;4:94-109

van Muijen G. N., Jansen K. F., Cornelissen I. M., Smeets D. F., Beck J. L. and Ruiter D. J. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. Int J Cancer.1991;48:85-91

Van Teeffelen J. W., Brands J., Stroes E. S. and Vink H. Endothelial glycocalyx: sweet shield of blood vessels. Trends Cardiovasc Med.2007;17:101-5

Varki A. Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. Am J Phys Anthropol.2001;Suppl 33:54-69

Vlaicu S. I., Tegla C. A., Cudrici C. D., Danoff J., Madani H., Sugarman A., Niculescu F., Mircea P. A., Rus V. and Rus H. Role of C5b-9 complement complex and response gene to complement-32 (RGC-32) in cancer. Immunol Res.2013;56:109-21

Walport M. J. Complement. First of two parts. N Engl J Med.2001;344:1058-66

Walport M. J. Complement. Second of two parts. N Engl J Med.2001;344:1140-4

Wan P. T., Garnett M. J., Roe S. M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V. M., Jones C. M., Marshall C. J., Springer C. J., Barford D., Marais R. and Cancer Genome P. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell.2004;116:855-67

Wang P. H., Lee W. L., Juang C. M., Yang Y. H., Lo W. H., Lai C. R., Hsieh S. L. and Yuan C. C. Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers. Gynecol Oncol.2005;99:631-9

Wang Y., Sun S. N., Liu Q., Yu Y. Y., Guo J., Wang K., Xing B. C., Zheng Q. F., Campa M. J., Patz E. F., Jr., Li S. Y. and He Y. W. Autocrine Complement Inhibits IL10-Dependent T-cell-Mediated Antitumor Immunity to Promote Tumor Progression. Cancer Discov.2016;6:1022-35

Weiler J. M., Daha M. R., Austen K. F. and Fearon D. T. Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. Proc Natl Acad Sci U S A.1976;73:3268-72

Weinbaum S., Tarbell J. M. and Damiano E. R. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. Annu Rev Biomed Eng.2007;9:121-67

Wellbrock C., Ogilvie L., Hedley D., Karasarides M., Martin J., Niculescu-Duvaz D., Springer C. J. and Marais R. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. Cancer Res.2004;64:2338-42

Werfel T., Oppermann M., Schulze M., Krieger G., Weber M. and Gotze O. Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. Blood.1992;79:152-60

Whaley K. and Ruddy S. Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. J Exp Med.1976;144:1147-63

Wolchok J. D., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Grob J. J., Rutkowski P., Lao C. D., Cowey C. L., Schadendorf D., Wagstaff J., Dummer R., Ferrucci P. F., Smylie M., Butler M. O., Hill A., Marquez-Rodas I., Haanen J., Guidoboni M., Maio M., Schoffski P., Carlino M. S., Lebbe C., McArthur G., Ascierto P. A., Daniels G. A., Long G. V., Bas T., Ritchings C., Larkin J. and Hodi F. S. Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. J Clin Oncol.2022;40:127-137

Wolchok J. D., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Rutkowski P., Grob J. J., Cowey C. L., Lao C. D., Wagstaff J., Schadendorf D., Ferrucci P. F., Smylie M., Dummer R., Hill A., Hogg D., Haanen J., Carlino M. S., Bechter O., Maio M., Marquez-Rodas I., Guidoboni M., McArthur G., Lebbe C., Ascierto P. A., Long G. V., Cebon J., Sosman J., Postow M. A., Callahan M. K., Walker D., Rollin L., Bhore R., Hodi F. S. and Larkin J. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med.2017;377:1345-1356

Wright C. S. Crystallographic elucidation of the saccharide binding mode in wheat germ agglutinin and its biological significance. J Mol Biol.1980;141:267-91

Wright C. S. 2.2 A resolution structure analysis of two refined N-acetylneuraminyllactose--wheat germ agglutinin isolectin complexes. J Mol Biol.1990;215:635-51

Wu J., Chen S., Liu H., Zhang Z., Ni Z., Chen J., Yang Z., Nie Y. and Fan D. Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation. J Exp Clin Cancer Res.2018;37:272

Zauner G., Kozak R. P., Gardner R. A., Fernandes D. L., Deelder A. M. and Wuhrer M. Protein O-glycosylation analysis. Biol Chem.2012;393:687-708

Zha H., Han X., Zhu Y., Yang F., Li Y., Li Q., Guo B. and Zhu B. Blocking C5aR signaling promotes the anti-tumor efficacy of PD-1/PD-L1 blockade. Oncoimmunology.2017;6:e1349587

Zipfel P. F. and Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. Nat Rev Immunol.2009;9:729-40

Zwirner J., Gotze O., Sieber A., Kapp A., Begemann G., Zuberbier T. and Werfel T. The human mast cell line HMC-1 binds and responds to C3a but not C3a(desArg). Scand J Immunol.1998;47:19-24

# 10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Stefan Schneider, Direktor der Hautklinik des UKEs, für die Überlassung des Themas und die großartige Möglichkeit unter seiner Leitung zu promovieren bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Christian Gorzelanny, Leiter des Labors für Zell- und Molekularbiologie der Klinik für Dermatologie und Venerologie des UKEs für die herausragende Betreuung, die Zeit und Energie, die Freiheit und Unterstützung bei der Ausarbeitung des Themas und für die vielen interessanten Diskussionen und angenehmen Unterhaltungen.

An nächster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Xiabao Liu für die geduldige Einführung in die Arbeit im Labor, die Begleitung meiner Experimente und für ein immer offenes Ohr bedanken.

Darüber hinaus danke ich Dr. Alexander T. Bauer, Dr. Volker Huck und Christian Meß für ihre wissenschaftliche Unterstützung und viele hilfreiche Anregungen.

Des weiteren bedanke ich mich bei Sabine Vidal-y-Sy und Ewa Wladykowski für viele wertvolle Ratschläge zur Durchführung der experimentellen Arbeit und die ständige Hilfsbereitschaft. Zudem danke ich dem gesamten Team der Arbeitsgruppe für ein sehr produktives und angenehmes Arbeitsklima und für die mir sehr schön in Erinnerung gebliebene Zeit im Labor.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freundinnen für die stetig bedingungslose und liebevolle Ermutigung und Unterstützung bedanken.

# 11. Lebenslauf

## Martha Katharina Hähnle

### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 18.08.1993 Geburtsort: Hamburg

### Wissenschaftliche Arbeit

Promotion: Experimentelle Doktorarbeit in der Klinik für Dermatologie und Venerologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Gruppenleiter PD Dr. rer. nat. C. Gorzelanny zum Thema Komplementaktivierung in Melanomzellen



Forschungsarbeit: Institut der Geschichte der Medizin der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, med. Fakultät Mannheim bei Prof. Dr. med. Axel W. Bauer. Titel: "Die wandelbare Geschichte des Methylphenidats und seiner sozialen Zuschreibungen"

#### **Berufliche Erfahrung**

5/2022-aktuell: Weiterbildungsassistentin in der Dermatologie, Elbeklinikum, Buxtehude 2/2021: Medizinische Teamleitung und Impfärztin im Corona-Impfzentrum, Hamburg

#### Studium

12/2020: 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Fakultät Mannheim

10/2019: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Fakultät Mannheim

07/2016: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Semmelweis Universität Budapest

### Klinische Erfahrung

Praktisches Jahr:

- 1. Quartal: Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Köln
- 2. Quartal: Viszeralchirurgie, Hospital Clinicario Universidad Valladolid, Spanien
- 3. Quartal: Innere Medizin, Kantonsspital Luzern, Schweiz
- 4. Quartal: Kinderkardiologische Ambulanz, Westpfalzklinikum, Kaiserslautern

#### Famulaturen:

2018: Adoleszentenzentrum des Zentralinstitut für seelische Gesundheit Mannheim

2017: Gastroenterologie, Israelitischen Krankenhaus, Hamburg

2017: Gynäkologische Praxisklinik Winterhude, Hamburg

2016: Pädiatrie, Praxisgemeinschaft Dres. Hähnle, Hessling, Leithäuser, Hamburg

#### Schulausbildung

2011: Abitur, Gelehrtenschule des Johanneums, Hamburg

# 12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....