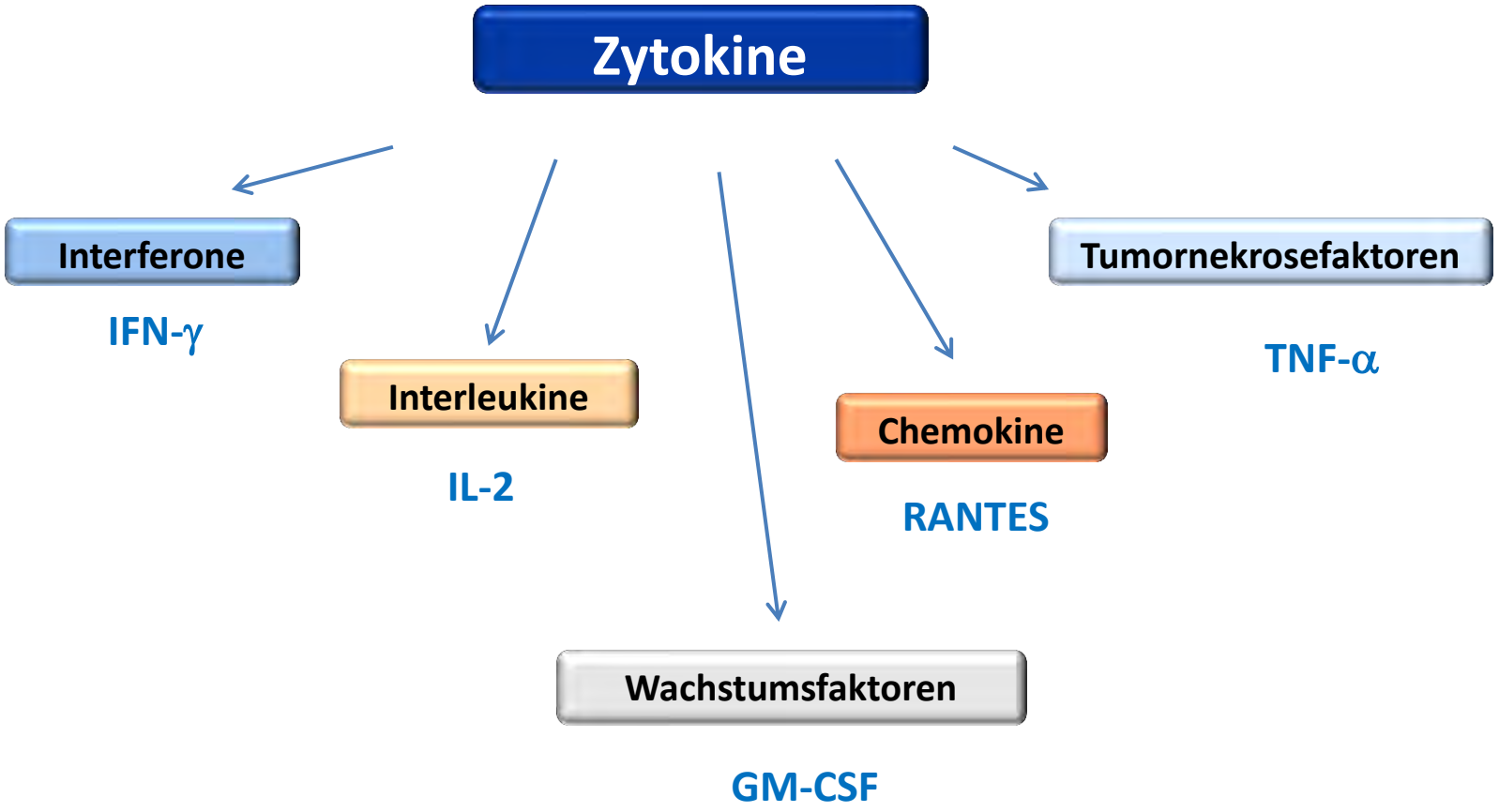
inflammatio Akademie

ONLINEFORTBILDUNG

Bedeutung der Zytokindiagnostik bei Tumorpatienten

Dr. rer. nat. Cornelia Doebis
IMD Berlin



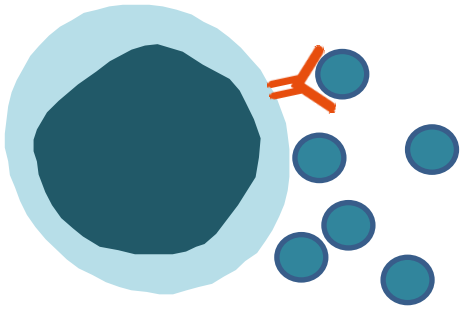
- Proteine (Peptide)
- regulieren Wachstum und Differenzierung von Zellen

Allgemeine Charakteristika

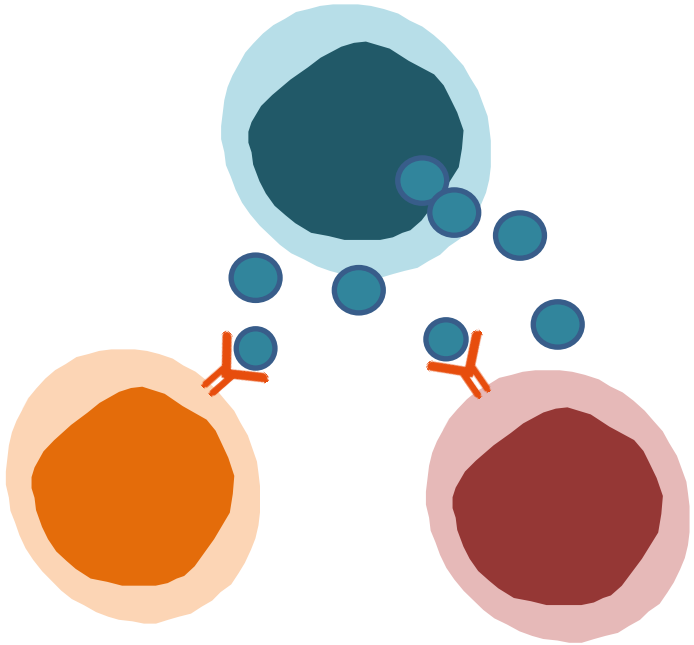
- Mediatoren/„Botenstoffe“
- regulieren Wachstum, Aktivierung, Differenzierung, Chemotaxis von Immunzellen
- Wirkung auf verschiedenste Zielzellen (Immunsystem, Nervensystem, Endothelzellen, Hormonsystem…)
- Wirkung durch Rezeptorbindung
    1. membrangebundene Rezeptoren
    2. lösliche Rezeptoren ⇨ Komplexe binden an Zellmembranen sehr vieler Zelltypen

Allgemeine Charakteristika

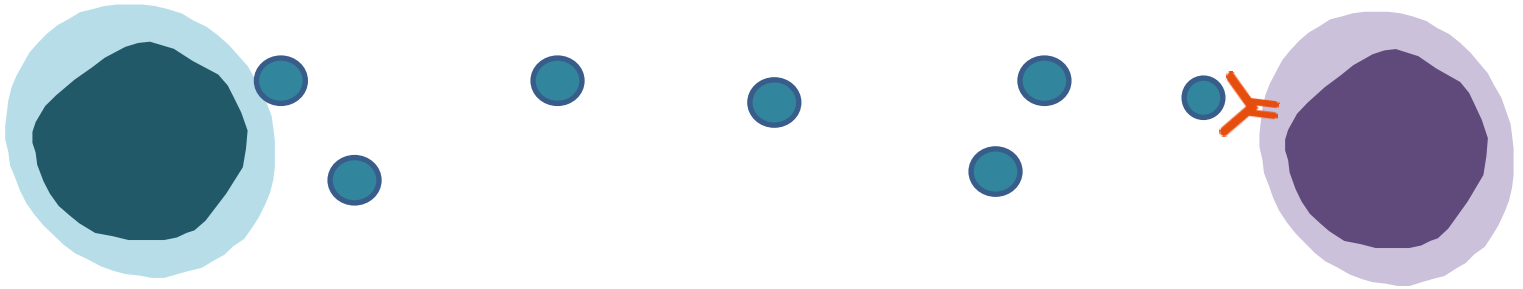
Autokrine Wirkung



Parakrine Wirkung



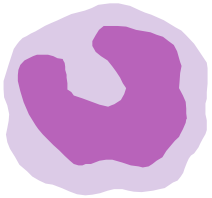
Endokrine Wirkung



Pro- und antientzündlich-wirksame Zytokine

Pro	Anti
TNF-α	IL-10
IL-1	TGF-β
IL-6	
IL-8	
IFN-γ, IP-10	

- Bakterien
- LPS
- Pilze
- Partikel (z.B. Titanoxid)
- Immunkomplexe

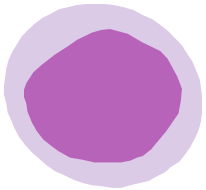


Makrophage

TNF-α
IL-1
IL-6
IL-8
TGF-β
CRP

Myelomonozytäre Entzündung

- Viren
- Intrazellulär persistierende Bakterien
- Xenobiotika (z.B. Metalle, Acrylate, Biozide)
- Allergene (bei Sensibilisierung)

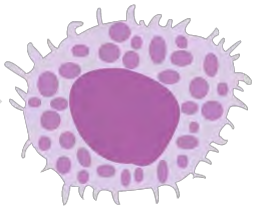


T-Lymphozyt

IFN-γ
(IP-10)
IL-17
IL-4
IL-10
TGF-β

Lymphozytäre Entzündung

- Bakterien
- Pilze
- Xenobiotika (z.B. Flammschutz-mittel, Biozide)
- Allergene (bei Sensibilisierung)



Mastzelle

Histamin
Leukotriene
TGF-β
Serotonin

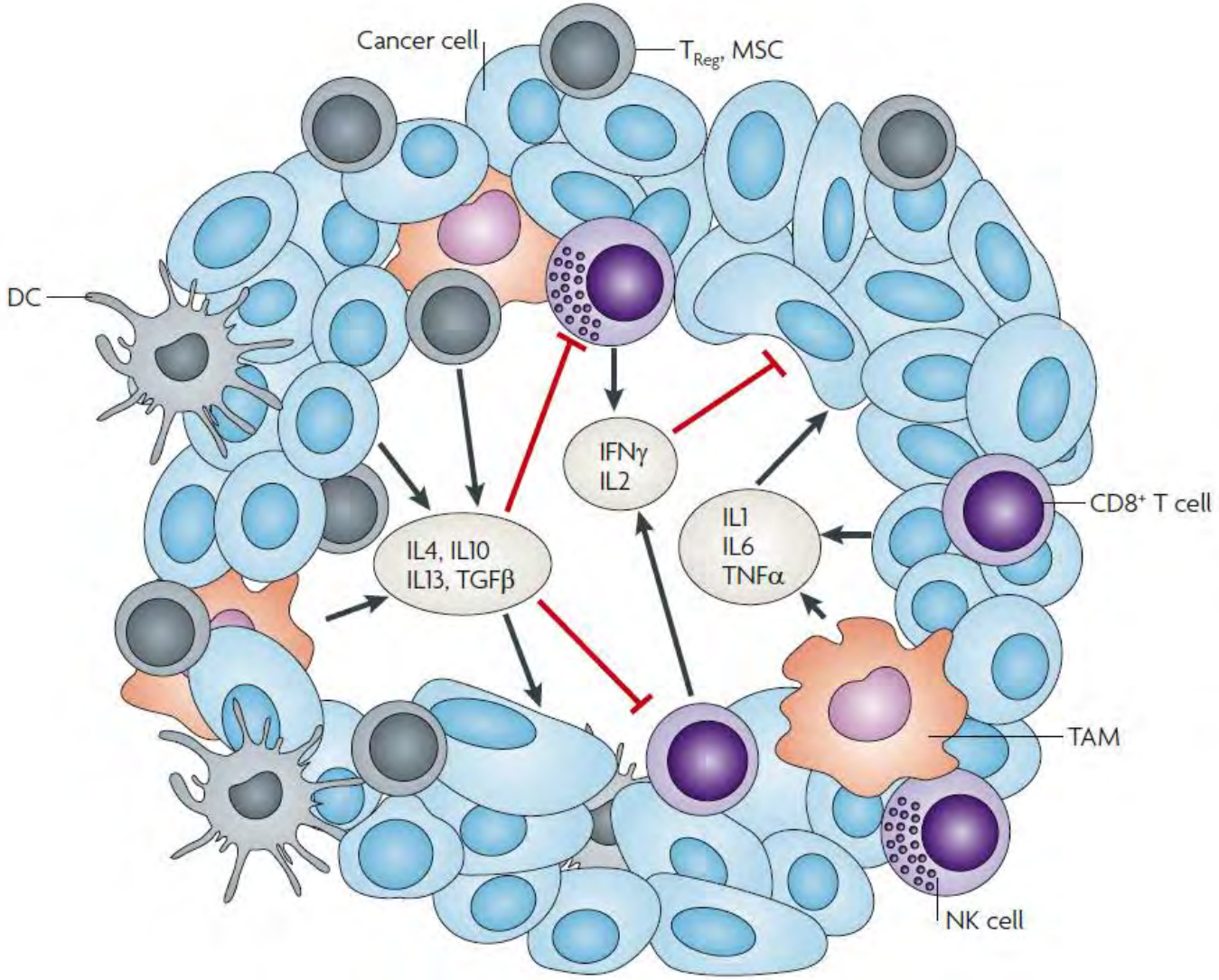
Mastzellaktivierung (Typ I)-allergische Entzündung

Angeborenes und adaptives Immunsystem sind involviert bei Tumoren

Tumor-infiltrierende Zellen

- Angeborenes Immunsystem:
  - Makrophagen, NK-Zellen, Mastzellen, Myeloid-derived Suppressor Zellen (MSDC), Dendritische Zellen
- Adaptive Immunantwort:
  - T- und B-Zellen

Zytokine im Tumor-Microenvironment



Seruga B, Nat Rev Cancer, 2008

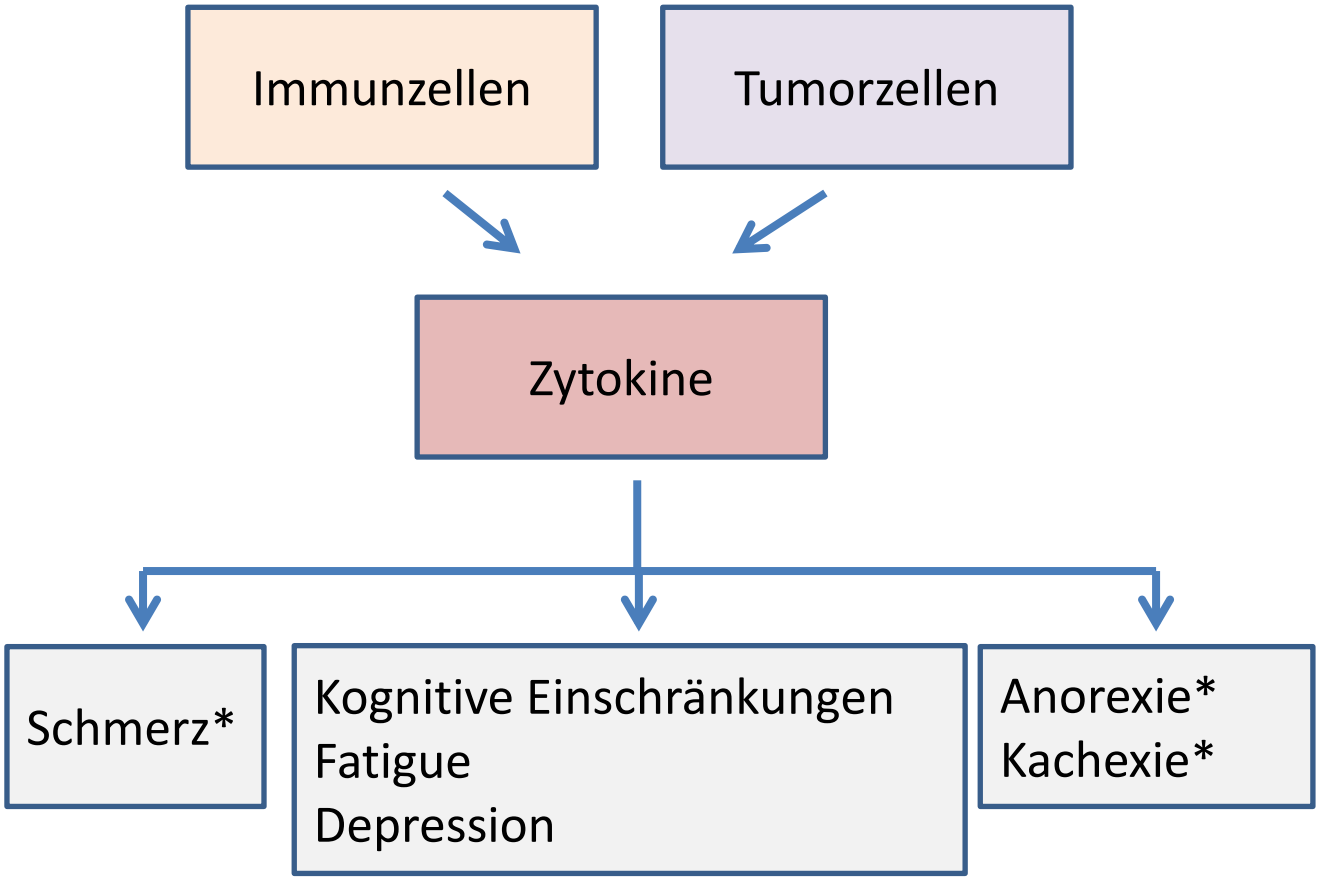
Angeborenes und adaptives Immunsystem sind involviert bei Tumoren

Tumor-infiltrierende Zellen

- Angeborenes Immunsystem:
  - Makrophagen, NK-Zellen, Mastzellen, Myeloid-derived Suppressor Zellen (MSDC), Dendritische Zellen
- Adaptive Immunantwort:
  - T- und B-Zellen

- Tumor generiert Entzündung
- Entzündungsprozesse bei der Entwicklung beteiligt
- Tumore nutzen lokale Mechanismen, um einer Immunantwort zu entgehen => immunsuppressorisches Milieu

Zytokin-assoziierte Tumor-Symptomatik



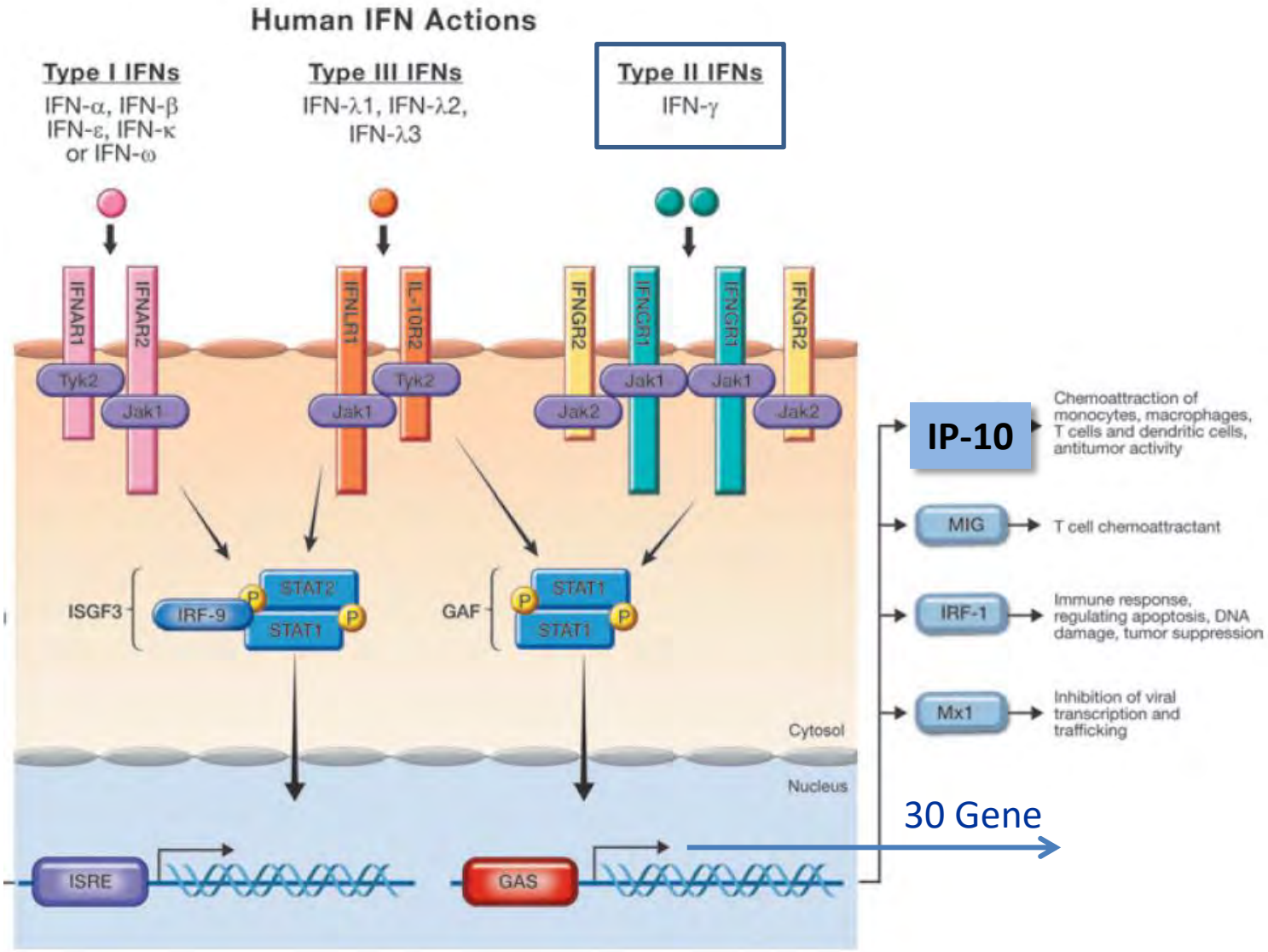
*fortgeschrittene Tumorerkrankung

Seruga B, Nat Rev Cancer, 2008 (adaptiert)

Interferon-γ (IFN-γ)

- Typ II Interferon
- starke antitumorale Wirkung
- v.a. von TH1-Zellen (Markerzytokin), zyt. CD8-Zellen und NK-Zellen gebildet
- zytostatische / zytotoxische Funktion
- Aktivierung und Differenzierung zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL)
- induziert u.a. IP-10 => Chemokine zur Anlockung von Immunzellen
- inhibiert TGF-β
- Aktivierung von Makrophagen (=> M1 Makrophagen; TAMs)
  - Steigerung der Antigenpräsentation (MHC Klasse I und II Moleküle ↑)
  - Erhöhung der Tumor-Immunogenität
  - Erhöhung der TNF-α und IL-1 Sekretion
- hemmt die Angiogenese

Interferon - Signalling

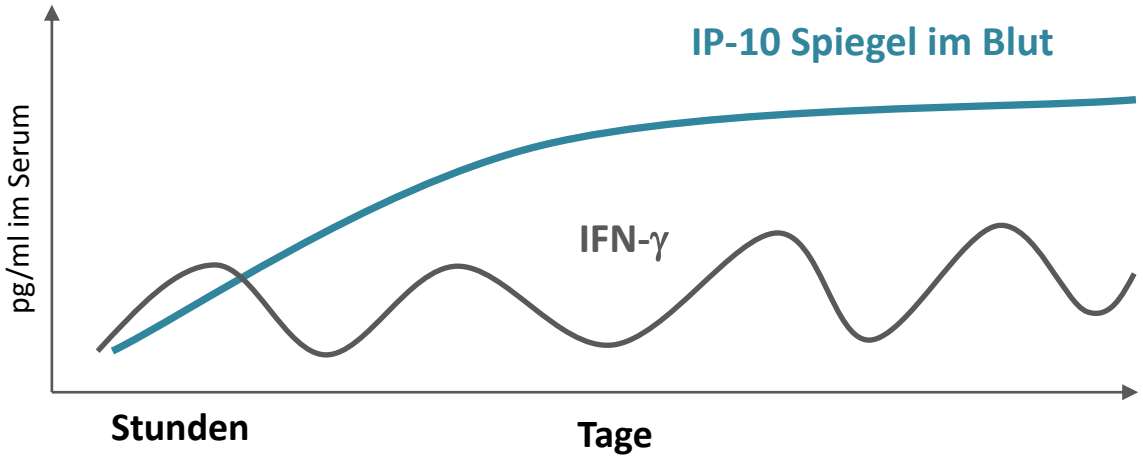


Bekisz J, Jorunal of Interferon & Cytokine Research, 2012

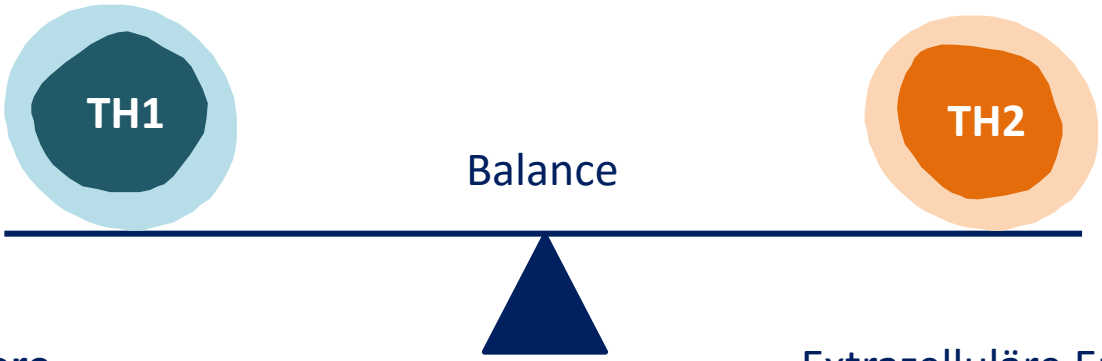
Nachweis einer TH1-vermittelten Immunantwort

- IP-10 (IFN-γ induziertes Protein-10, CXCL10)
- höhere Spiegel im Blut, längere Stabilität *in vivo*

  ⇨ idealer Marker für TH1-lymphozytäre Immunaktivierung

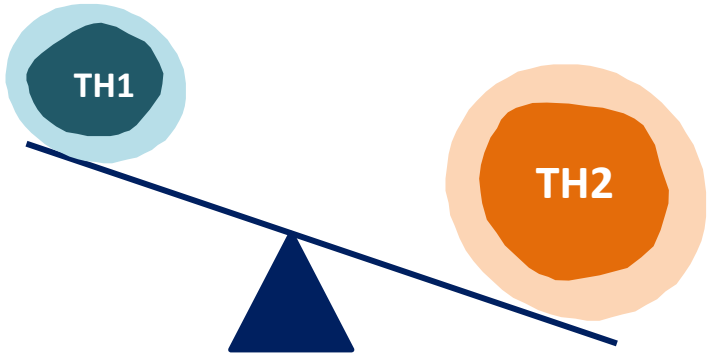


TH1 / TH2 – Balance und Tumorerkrankungen



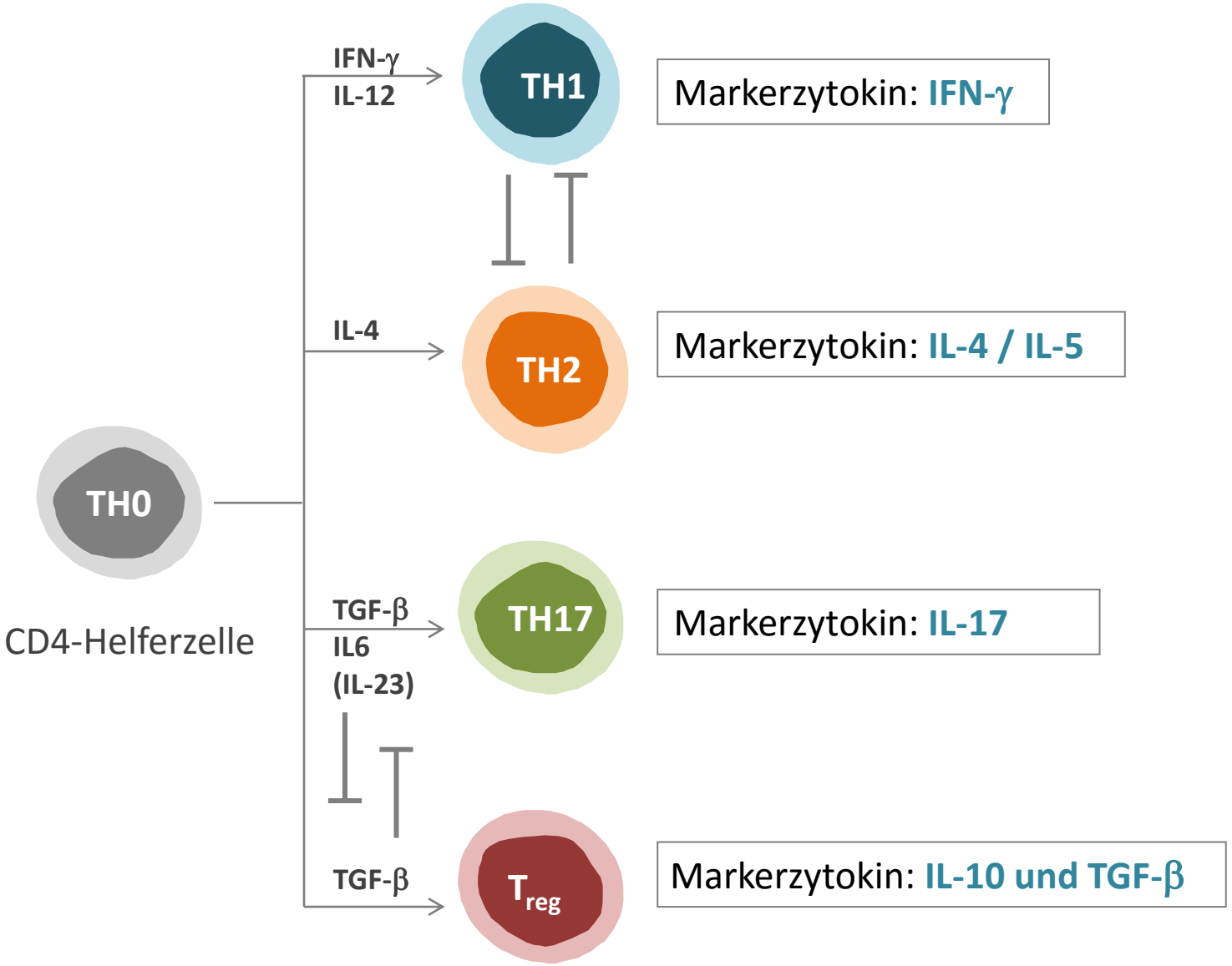
Tumore
Intrazelluläre Erreger
Virus

Extrazelluläre Erreger
Parasiten
Allergene



Tumorerkrankungen

T-Helfer-Subpopulationen



T-Helfer-Subpopulationen

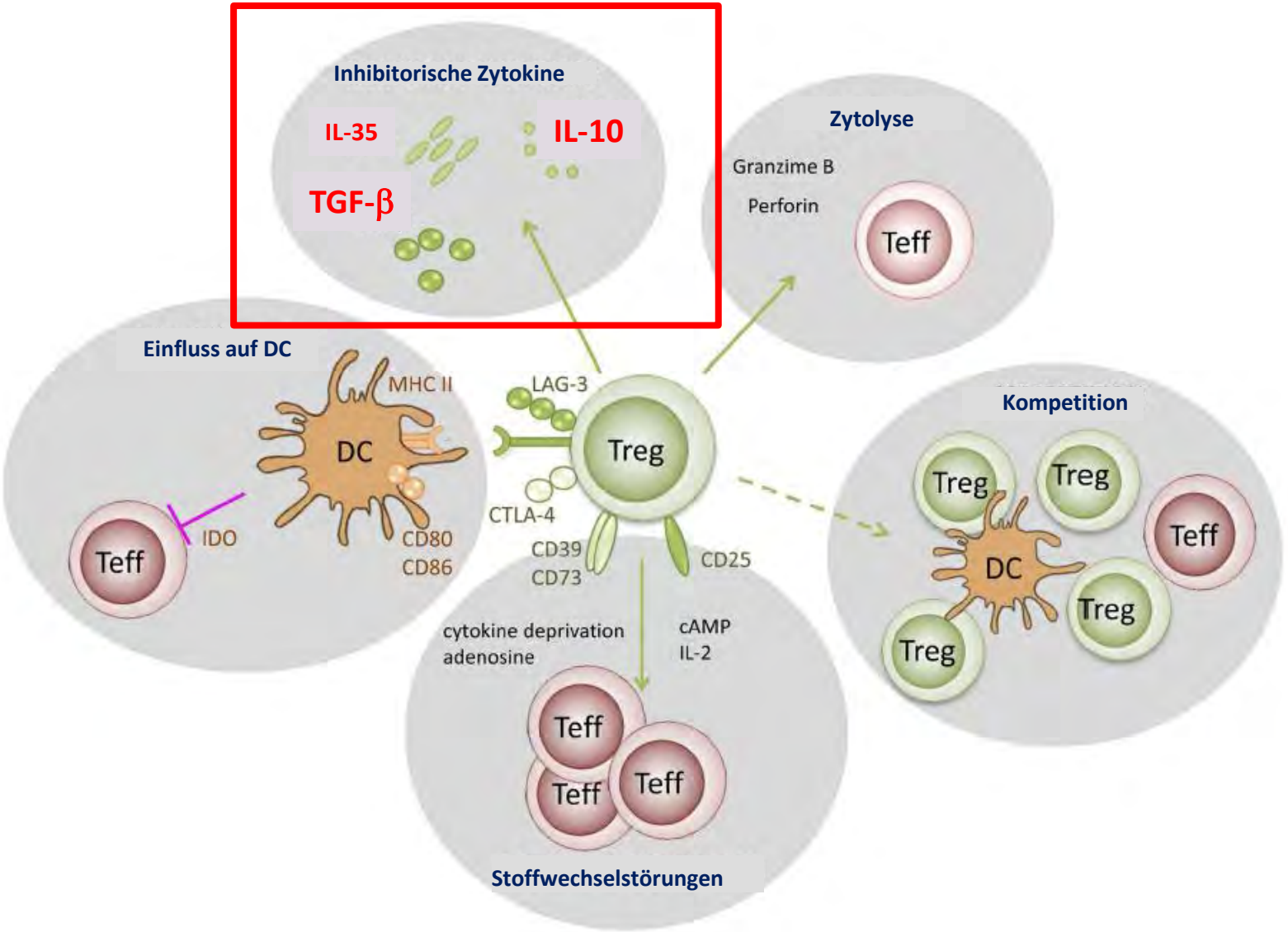
Ärztlicher Befundbericht

IMD Labor Berlin

Material: 1x Heparinblut

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich*
T-Helferzellstatus - Zytokinprofil			
Angegeben sind die Zytokinkonzentrationen nach 24 Stunden Stimulation mit ConA/SEB.			
IFN-g (TH1)	**2704**	pg/ml	374 - 1660
IL-4 (TH2)	174	pg/ml	40 - 198
TH1/TH2 Ratio	**15.5**		3.5 - 11
IL-2 (TH0)	863	pg/ml	384 - 960
IL-17 (TH17)	112	pg/ml	49 - 446
IL-10 (T-reg,TH2)	1777	pg/ml	760 - 1900

Regulatorische T-Zellen sezernieren IL-10 und TGF-β



Caridade et al., Frontiers in Immunology 2013

Interleukin-10 (IL-10)

- v.a. immunsuppressive Eigenschaften
- v.a. von TH2-Zellen und Treg-Zellen exprimiert, aber auch DC, Makrophagen, NK-Zellen, B-Zellen…
- Schutz des Organismus vor übersteigerten Entzündungsprozessen
- hemmt TH1- und fördert TH2-Immunantwort
- vermindert die Antigen-Präsentation in dendritischen Zellen (DC)
- hemmt Expression inflammatorische Zytokine: IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α und IL-2
- einige Tumorzellen exprimieren IL-10
- erhöhte Serumkonzentrationen:

Lung	Breast	Colorectal	Gastric	Malignant melanoma	Pancreatic	Malignant glioma	Hepatocellular	Renal cell	Head and neck
+	+	+	+	+	+	+	+		

Lippitz B, The Lancet, 2013

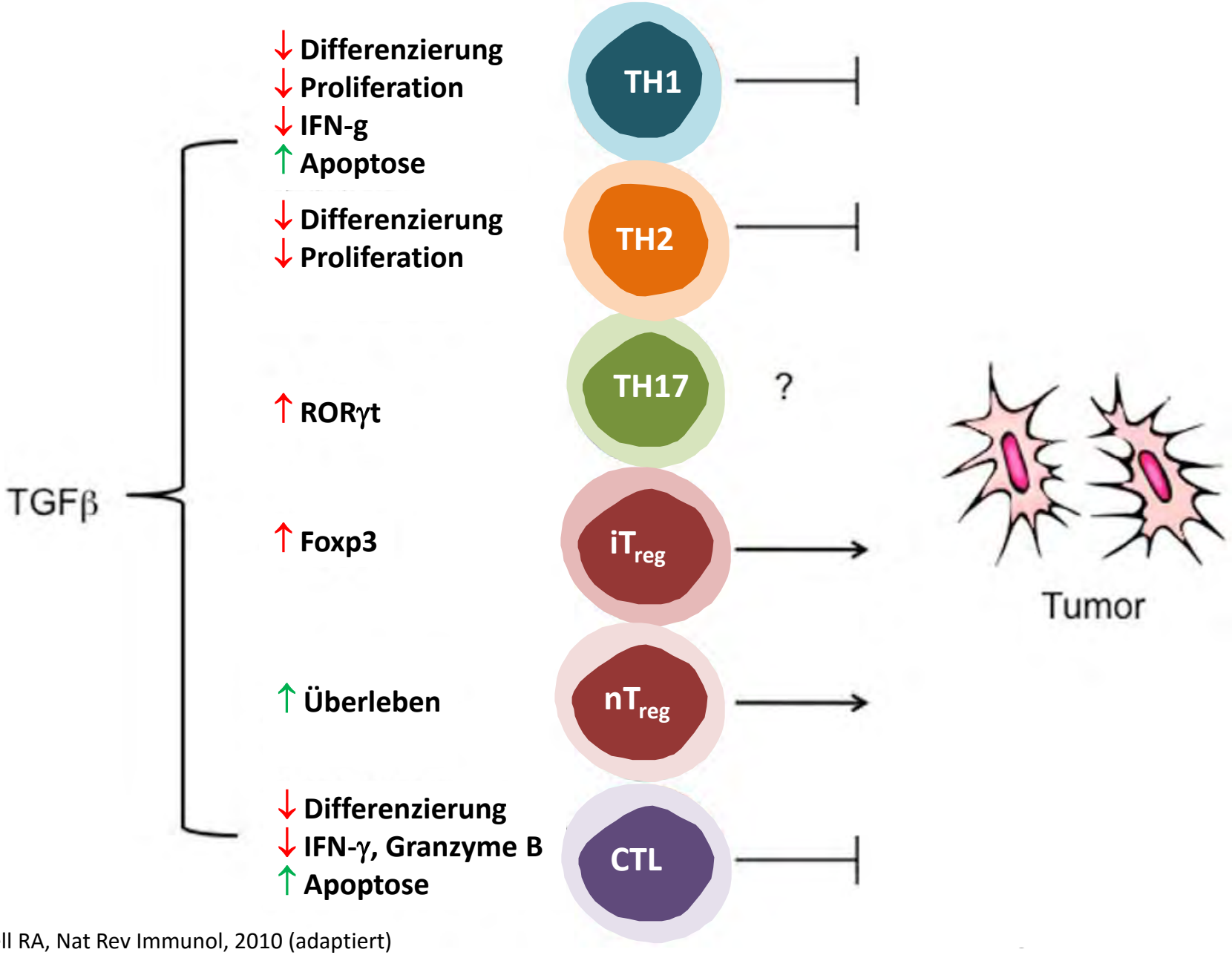
Transforming growth factor-β (TGF-β)

- immunsuppressive Eigenschaften
- Wachstums- und Differenzierungsfaktor
- v.a. von Monozyten/Makrophagen und als Effektorzytokin der Treg-Zellen
- wird von Tumor-Zellen selbst ausgeschüttet
- hohe Konzentrationen auch im extrazellulären Milieu
- inhibiert die IL-2-abhängige Proliferation von T-Zellen
- Antagonist der IFN-γ Produktion
- trägt indirekt zur Gefäßbildung bei
- begünstigt Metastasierung (Brustkrebs, Magenkrebs, Kolonkarzinom…)
- erhöhte Serumkonzentrationen:

Lung	Breast	Colorectal	Gastric	Malignant melanoma	Pancreatic	Malignant glioma	Hepatocellular	Renal cell	Head and neck
+	+	+	+			+	+	+	

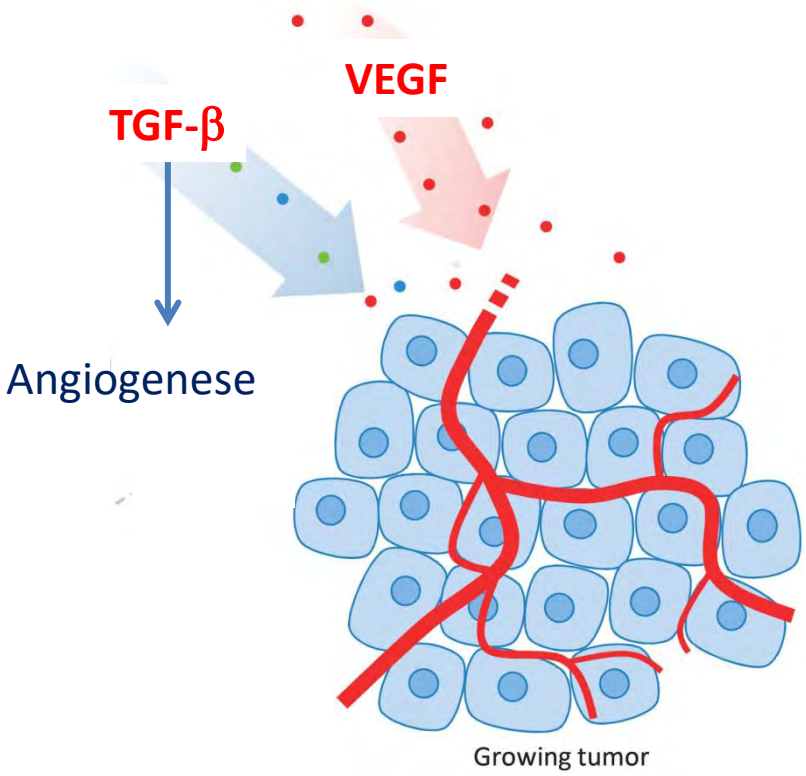
Lippitz B, The Lancet, 2013

TGF-β hemmt anti-Tumor-Immunantwort



Flavell RA, Nat Rev Immunol, 2010 (adaptiert)

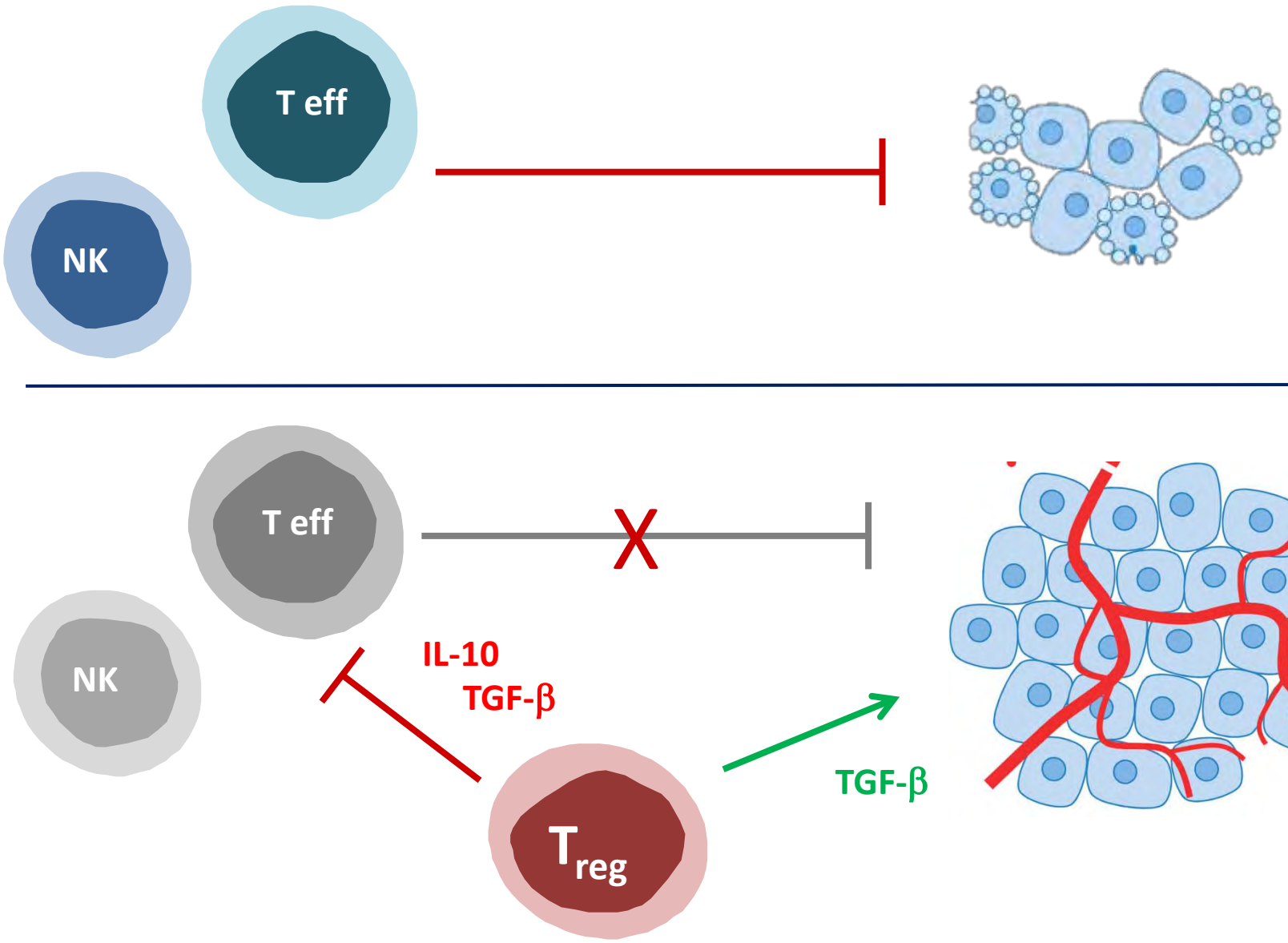
TGF-β fördert das Tumorwachstum



VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

Bastid et al., Oncogene, 2013 (adaptiert)

Regulatorische T-Zellen hemmen über Zytokine die anti-Tumor-Immunreaktion und fördern das Tumorwachstum



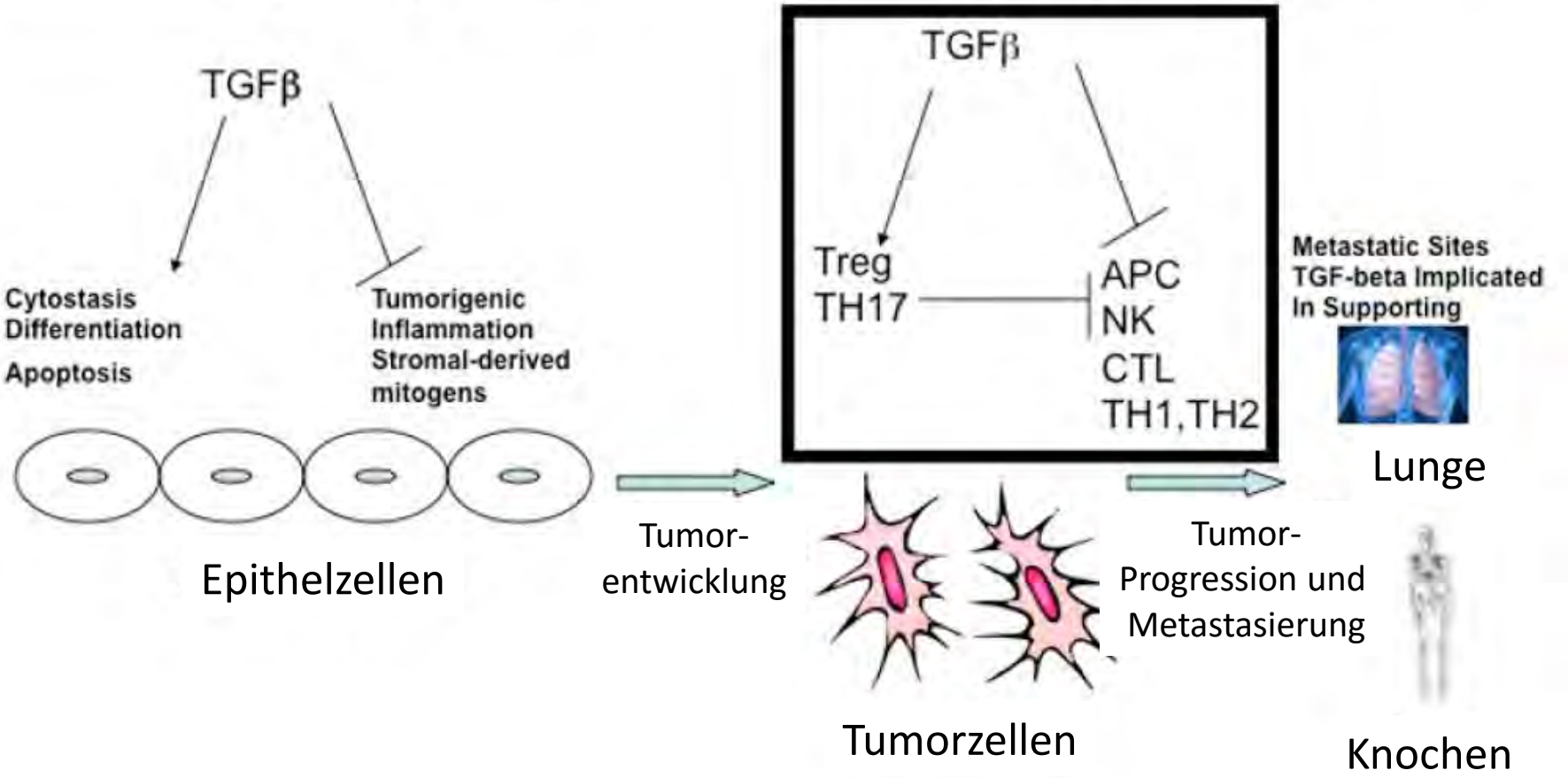
TGF-β – Zytokin mit Januskopf

YIN

Tumor-Suppression
Mechanismus premaligner Status

YANG

Tumor-fördernder Mechanismus
Maligne Progression



Flavell RA, Nat Rev Immunol, 2010 (adaptiert)

Zytokin-Serumspiegel

Ärztlicher Befundbericht

IMD Labor Berlin

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich*
TNF-alpha i.S.	8.9	pg/ml	< 8.1
Interleukin 1-ß i.S.	6.3	pg/ml	< 5.0
Interleukin 10 i.S.	23.5	pg/ml	< 9.1
TGF-beta i.S.	56.7	ng/ml	18.3 - 41.6

- Mischung aus pro- und anti-entzündlichen Zytokinen nicht unüblich
- immunsuppressive Zytokine (TGF-β, IL-10) können Zeichen für eine Immunparalyse sein
- v.a. Verlaufskontrollen empfohlen

Ziele einer immunmodulierenden Therapie

- viele Tumorerkrankungen weisen eine TH2 > TH1 Dominanz auf

⇒ TH1-vermittelte Immunabwehr stärken (TH1 shift)

Diagnostik:

– T-Helferzell-Status (*in vitro* induzierte Expression: IFN-γ, IL-4, IL-17, IL-10, IL-2)

– Serum-Spiegel IP-10 (IFN-γ)

- Immunsuppressorisches Milieu im Tumorgewebe

⇒ Anteil regulatorischer T-Zellen niedrig/normal halten

⇒ anti-entzündliche Zytokine möglichst niedrig/normal

Diagnostik:

– Tregs quantitativ im Vollblut

– Serum-Spiegel TGF-β, IL-10

Material: Serum, 1x EDTA-Blut, 1x Heparinblut

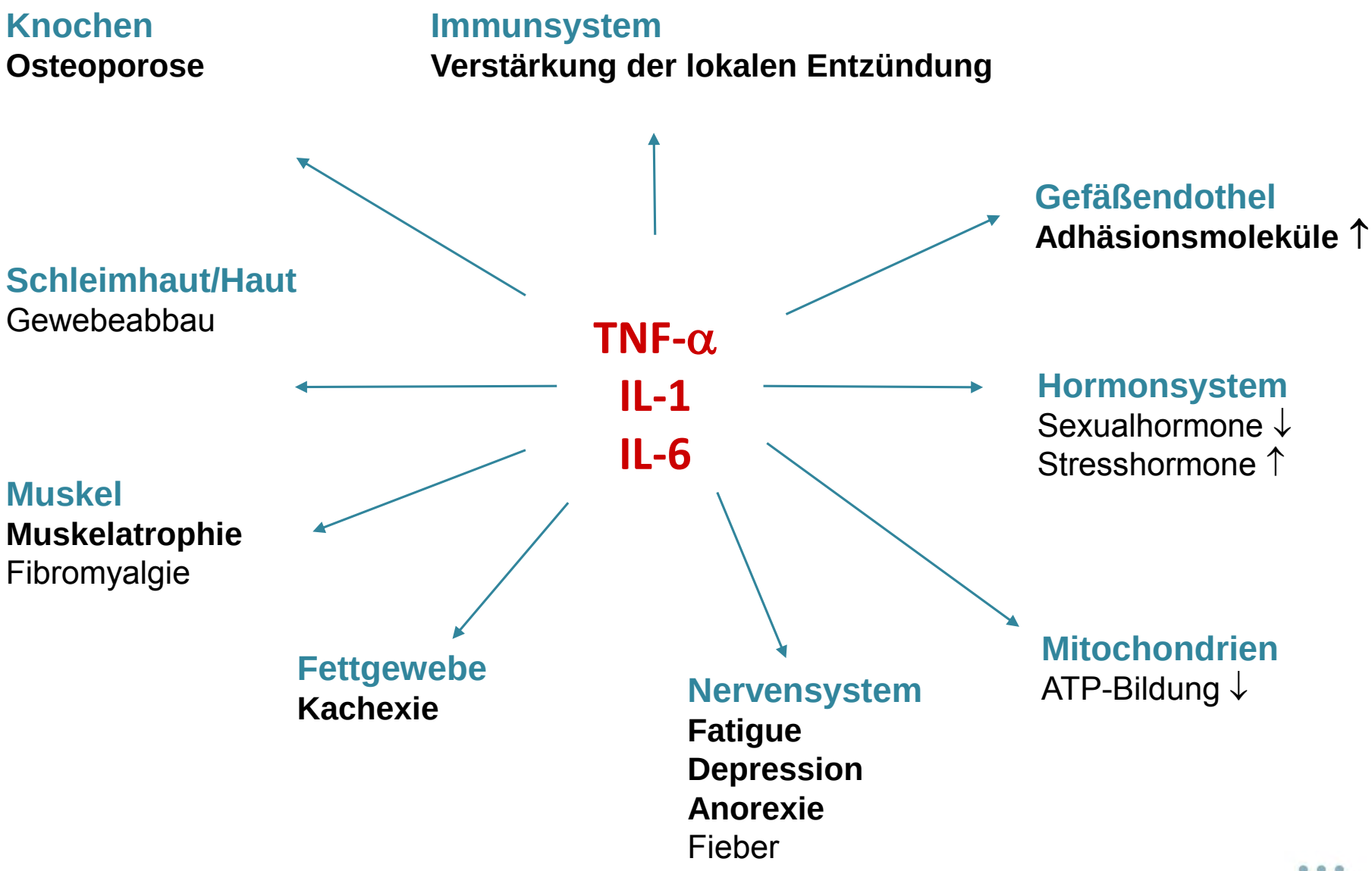
Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
IP-10 i.Serum	**1250**	pg/ml	< 900
Interleukin 10 i.S.	**10.5**	pg/ml	< 9.1
TGF-beta i.S.	37.5	ng/ml	18.3 - 41.6
Regulatorische T-Zellen (CD4+/CD25++/CD127-)			
CD4-Helfer	54.8	%	32 - 60
CD4-Helfer	1230	/µl	550 - 1460
Treg (CD4+/CD25++/CD127low)	8.9	%CD4	4 - 10
Treg (CD4+/CD25++/CD127low)	95	/µl	35 - 120

T-Helferzellstatus - Zytokinprofil

Angegeben sind die Zytokinkonzentrationen nach 24 Stunden Stimulation mit ConA/SEB.

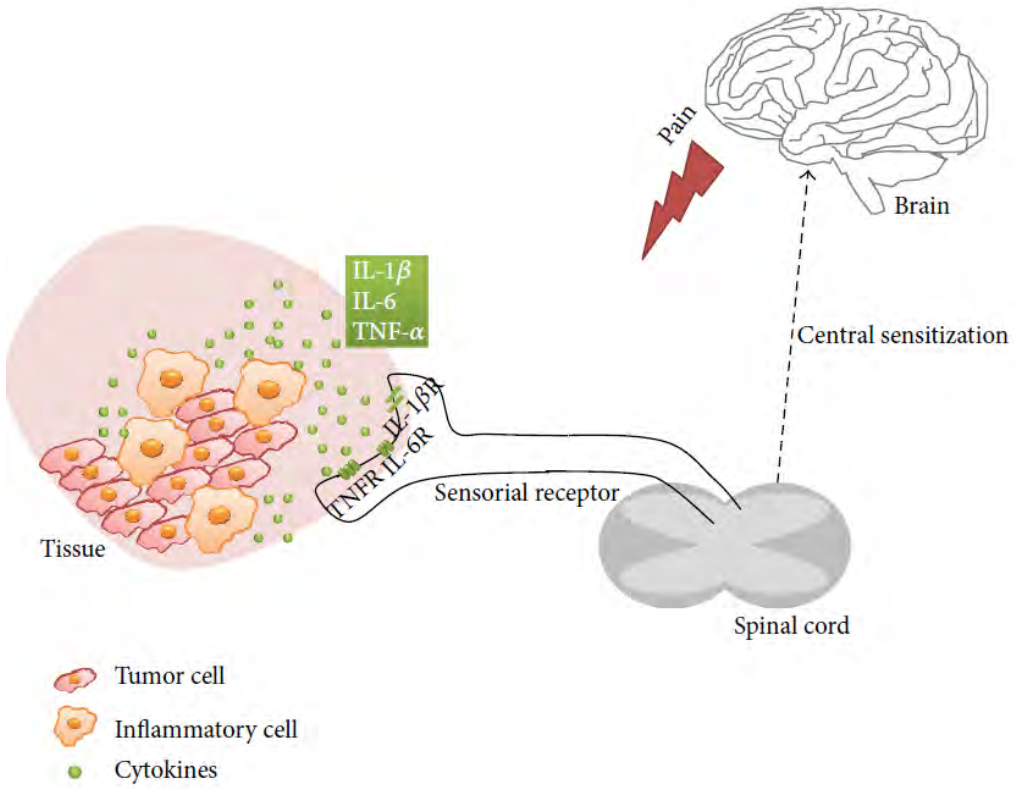
IFN-g (TH1)	**1958**	pg/ml	374 - 1660
IL-4 (TH2)	125	pg/ml	40 - 198
TH1/TH2 Ratio	**15.7**		3.5 - 11
IL-2 (TH0)	642	pg/ml	384 - 960
IL-17 (TH17)	265	pg/ml	49 - 446
IL-10 (T-reg,TH2)	1465	pg/ml	760 - 1900

Pro-inflammatorische , myelomonozytäre Zytokine



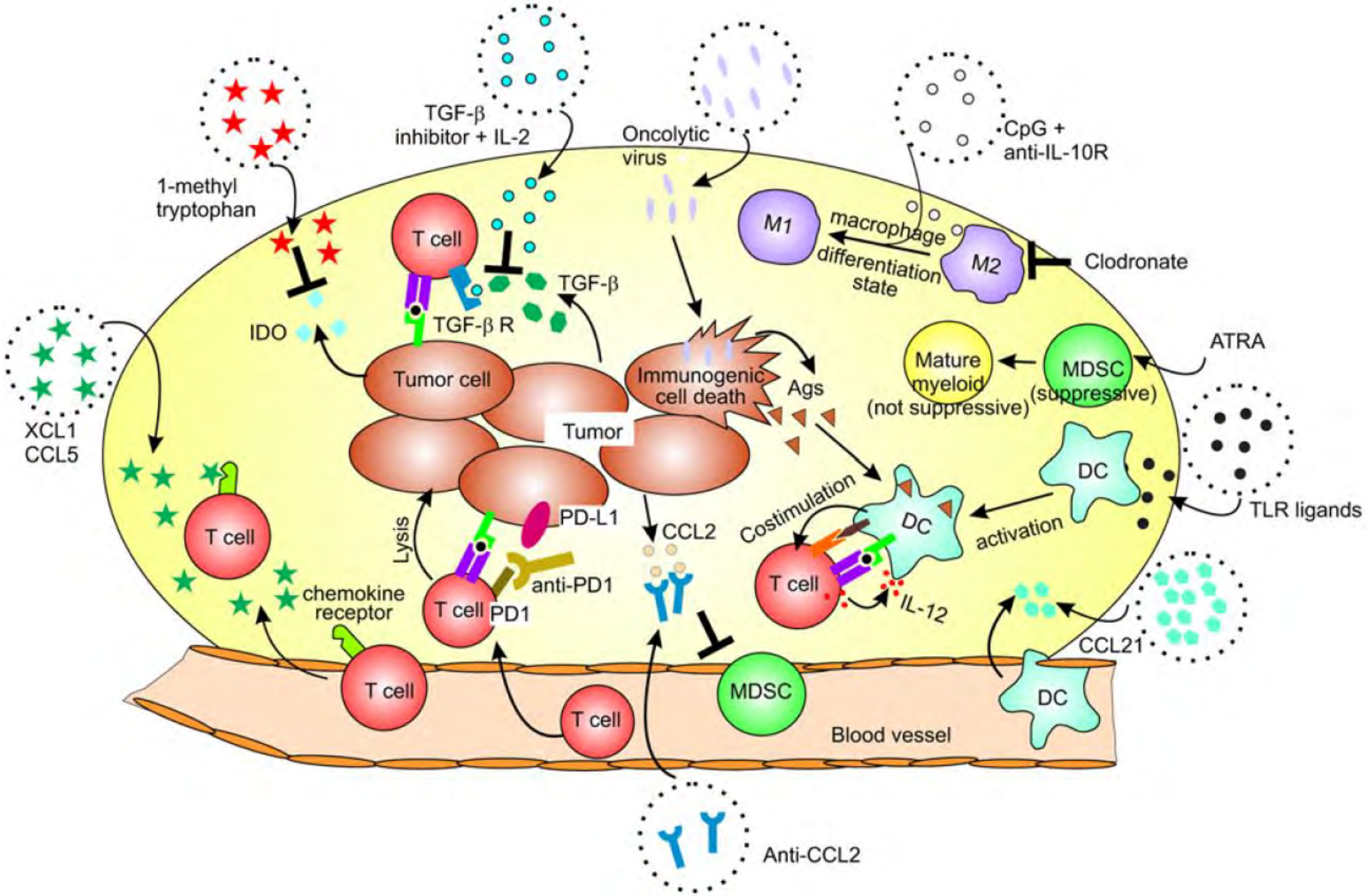
Schmerzsymptomatik bei Tumorerkrankungen

- direkte oder indirekte Sensibilisierung von Nozizeptoren (Schmerz) durch TNF-α, IL-1, IL-6
- IL-6: verstärkte Bildung durch Prostaglandin E2 => Schmerzverstärkung (nozizeptive Nervenendigungen werden sensibilisiert; Hyperalgesie)



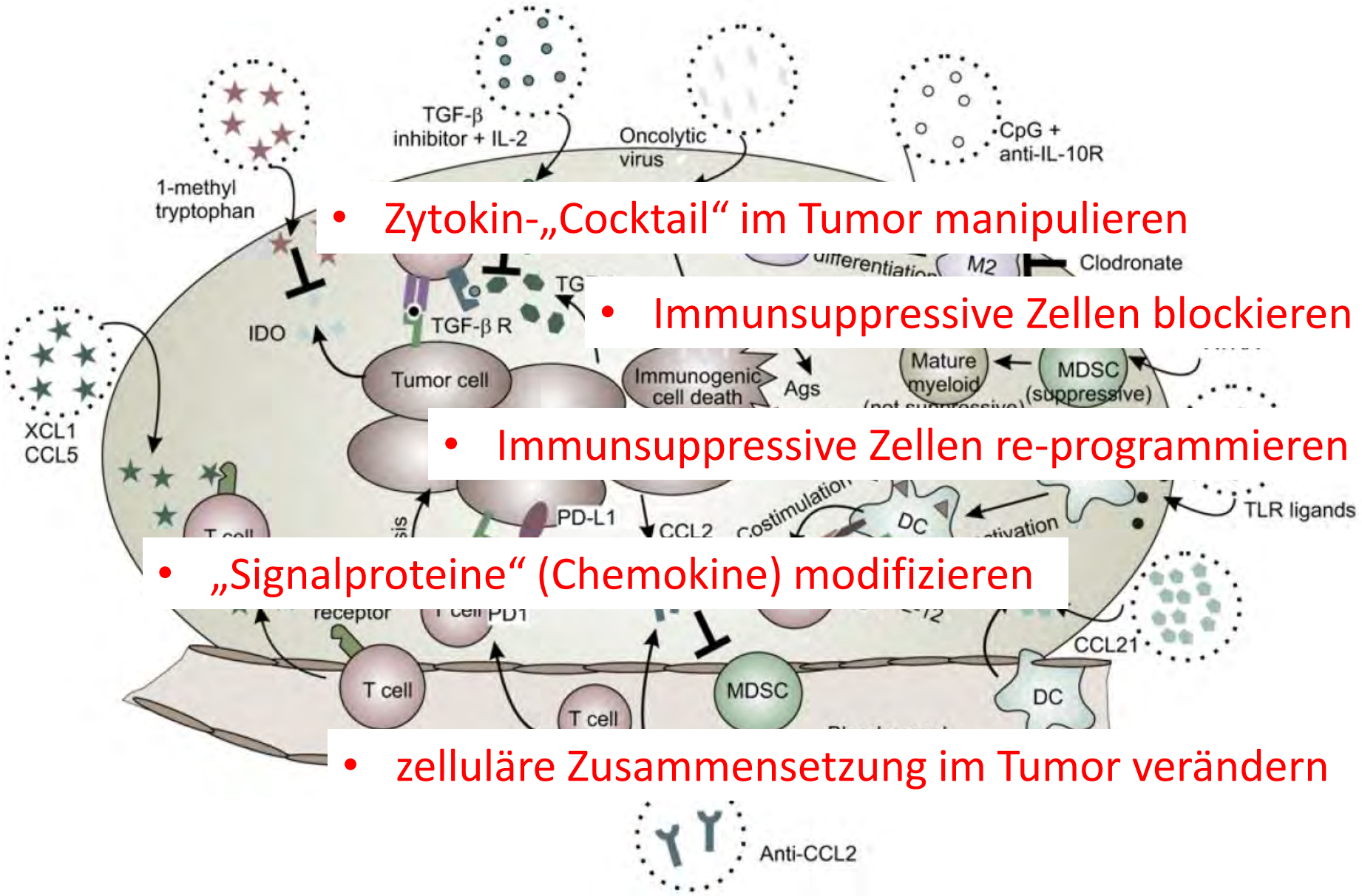
Vendrell et al., Mediators of Inflammation, 2015 (Adapted from Molecular Mechanisms of Cancer Pain, Nature Reviews Cancer)

Immuntherapie



Devaud C, OncoImmunology, 2013

Immuntherapie



- Zytokin-„Cocktail“ im Tumor manipulieren
- Immunsuppressive Zellen blockieren
- Immunsuppressive Zellen re-programmieren
- „Signalproteine“ (Chemokine) modifizieren
- zelluläre Zusammensetzung im Tumor verändern

Devaud C, OncoImmunology, 2013

IMD Labor Berlin

Material: Serum, 1x EDTA-Blut, 1x Heparinblut

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
TNF-alpha i.S.	13.8	pg/ml	< 8.1
Interleukin 1-ß i.S.	7.8	pg/ml	< 5.0
Interleukin 6 i.S.	5.6	pg/ml	< 3.8
IP-10 i.Serum	1250	pg/ml	< 900
Interleukin 10 i.S.	10.5	pg/ml	< 9.1
TGF-beta i.S.	37.5	ng/ml	18.3 - 41.6
Regulatorische T-Zellen (CD4+/CD25++/CD127-)			
CD4-Helfer	54.8	%	32 - 60
CD4-Helfer	1230	/µl	550 - 1460
Treg (CD4+/CD25++/CD127low)	8.9	%CD4	4 - 10
Treg (CD4+/CD25++/CD127low)	95	/µl	35 - 120

T-Helferzellstatus - Zytokinprofil

Angegeben sind die Zytokinkonzentrationen nach 24 Stunden Stimulation mit ConA/SEB.

IFN-g (TH1)	1958	pg/ml	374 - 1660
IL-4 (TH2)	125	pg/ml	40 - 198
TH1/TH2 Ratio	15.7		3.5 - 11
IL-2 (TH0)	642	pg/ml	384 - 960
IL-17 (TH17)	265	pg/ml	49 - 446
IL-10 (T-reg,TH2)	1465	pg/ml	760 - 1900

Quantitative Immunprofile

				€
1	Großes Blutbild		E	4,67
2	Basisprofil T-, NK-, B-Zellen, CD4+8, T-zytotox-CD28, Ratio, aktivierte T-Zellen		E	162,61
3	Immunkompetenz Basisprofil 2 + CD25, NK-aktiviert, CD31, T-naiv/memory, $T_{reg.}$		E	235,46
4	Immunkompetenz Tumor Immunkompetenz 3 + CD39 $T_{reg.}$-Anteil		E	250,03
5	Chronische Entzündung Basisprofil 2 + CD31, T-naiv/memory, CD28-Status, $T_{reg.}$		E	206,35
6	Lymphomtypisierung B-CLL		E	308,31
7	CD31-Thymusreserve		E	62,36
X	T_{reg}-Zellen		E	47,79

Immunfunktionsteste

					€
11	LTT-Immunfunktion	24h	LT		156,19
12	NK-Zell-Funktion	24h	H		71,11
13	Granulozytenfunktion (Phag.+Burst)	24h	H		66,44

Immunbalance (Vollblutstimulation)

					€
X	T-Helferstatus IFN-γ, IL-4, IL-2, IL-17, IL-10	24h	H		102,00
22	TH1/TH2-Balance IFN-γ, IL-4	24h	H		64,11

5. _____ +H

6. _____

Immunparameter (einzeln)

					€
51	Komplement (CH50, AP50)	24h	S		64,11
52	MBL-Serumspiegel		S		27,98
53	MBL genetisch		S	! E	159,00
54	IgA, IgG, IgM		S		26,22
55	IgG-Subklassen 1–4		S		34,96

Entzündung (Serumspiegel)

				€
61	CRP – hoch sensitiv	S		11,66
X	TNF-α	S		26,23
X	IL-1	S		27,98
X	IL-6	S		27,98
65	IL-8	Sz		27,98
X	IL-10	S		27,98
67	IFN-γ	S		27,98
X	IP-10 (TH1-Aktivität)	S		27,98
69	sIL-2-Rezeptor	S		27,98
X	TGF-β	S		27,98
71	Histamin	H		33,22
72	AGE	S		27,98
73	Lp-PLA_2 (Endothel)	S		43,72
74	BDNF	S		43,72
75	RANTES	S		43,72

sdam

Zusammenfassung

- Zytokine spielen sowohl bei der Entwicklung, Abwehr aber auch Etablierung von Tumoren eine wichtige Rolle.

- Zytokine zeigen dabei pro- und/oder anti-Tumor-Effekte.

- Tumore können selbst über die Ausschüttung von immunmodulierenden Zytokinen die Immunantwort beeinflussen.

inflammatio Akademie

ONLINEFORTBILDUNG

Nächste online-Fortbildung am
11. Januar 2017, 15:00 Uhr

Die klinische Bedeutung auffälliger Manganspiegel - essentielles Spurenelement und neurotoxisches Metall

Dr. Katrin Huesker