

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**KLINIK UND POLIKLINIK
FÜR STRAHLENTHERAPIE UND RADIOLOGISCHE ONKOLOGIE
KLINIKUM RECHTS DER ISAR**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls)

Bestimmung der Hsp70 Protein- und Antikörpergehalte im Blut von Tumorpatienten als potenziell prognostischer Parameter

Kathrin Hube

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff
2. Univ.-Prof. Dr. P. A. Knolle

Die Dissertation wurde am 12. 11. 2013 bei der Technischen Universität München ein-
gereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19. 11. 2014 angenommen.

In Liebe für meine Mutter

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung	6
Abstract	7
1 Einleitung	8
1.1 Tumore des Binde- und Stützgewebe	8
1.1.1 Klassifikation	8
1.1.2 Epidemiologie	11
1.1.3 Ätiologie	12
1.1.4 Klinisches Bild	13
1.1.5 Lokalisation	13
1.1.6 Diagnostik	15
1.1.7 Stadieneinteilung (Staging)	15
1.1.8 Therapie	18
1.1.9 Prognose	19
1.2 Kopf-Hals-Karzinom	20
1.2.1 Klassifikation und Histologie	20
1.2.2 Epidemiologie	21
1.2.3 Ätiologie	21
1.2.4 Klinisches Bild	22
1.2.5 Grading und Staging	23
1.2.6 Diagnostik	26
1.2.7 Therapie	26
1.2.8 Prognose	27
1.3 Prostatakarzinom	28
1.3.1 Prostata-Aufbau, Funktion, Lage des Karzinoms	28
1.3.2 PSA - prostataspezifisches Antigen	29
1.3.3 Epidemiologie	30
1.3.4 Ätiologie	30
1.3.5 Klinisches Bild	31
1.3.6 Diagnostik und Screening	31

1.3.7	Klassifikation	32
1.3.8	Staging und Stadieneinteilung	33
1.3.9	Histologie und Grading	36
1.3.10	Therapie	38
1.3.11	Prognose	39
1.4	Hitzeschockproteine	41
1.4.1	Hsp70 Struktur, Regulation, Aufbau und Funktion	42
1.4.2	Rolle der HSP in der Onkologie und Immunologie	44
1.5	ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay)	46
1.6	Intention und Zielsetzung	47
2	Material und Methoden	49
2.1	Material	49
2.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Kit	49
2.1.2	Puffer	50
2.1.3	Antikörper und Protein	51
2.1.4	Plastikmaterial	51
2.1.5	Geräte	52
2.1.6	Blutserum Patienten und Probanden	52
2.1.7	Sonstiges Material und sonstige Geräte	53
2.2	Methoden	54
2.2.1	Materialgewinnung	54
2.2.2	Serumgewinnung und Protokoll	54
2.2.3	Allgemeine Arbeitsanweisungen	55
2.2.4	ELISA	55
2.2.5	Standard Laborparameter	64
2.2.6	Bildbearbeitung	64
2.2.7	Statistik	64
3	Ergebnisse	65
3.1	Etablierung ELISA	65
3.1.1	Einblick Etablierung Hsp70 Ak ELISA	67
3.1.2	Einblick Etablierung Hsp70 Protein ELISA	70
3.1.3	Vergleichskollektiv und Schwellenwerte	73

3.2 Tumorkollektive	78
3.2.1 Darstellung Kollektiv Orthopädie/ Patienten mit Tumoren des Binde- und Stützgewebes	78
3.2.2 Darstellung Kollektiv HNO/ Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen	86
3.2.3 Darstellung Kollektiv Prostata/ Patienten mit Prostatakarzinomen	95
3.2.4 Vergleich Kollektive	111
4 Diskussion	119
4.1 Hsp70 Protein im Serum - ein potentiell prognostischer Parameter bei Tumorpatienten?	119
4.2 Ausblick	131
5 Anhang	135
5.1 Abkürzungsverzeichnis	135
5.2 Abbildungsverzeichnis	138
5.3 Tabellenverzeichnis	141
5.4 Danksagung	144
5.5 Anhang Patienteninformation	145
5.6 Anhang R&D ELISAKit Information des Herstellers	150
5.7 Literaturverzeichnis	160

Zusammenfassung

Präzise und frühzeitige Diagnostik, sowie effizientes Staging und permanentes Reevaluieren im Verlauf spielen bei Tumorerkrankungen eine enorme Rolle. Nur durch eine präzise Klassifizierung der Krankheit können eine spezifische Therapie eingeleitet und eine bestmögliche Heilungschance erreicht werden. Hier ist es wichtig, zeit- und kostensparende sowie patientenschonende Methoden zu entwickeln, um dem Patienten die bestmögliche Therapie zuzuführen. In der folgenden Arbeit geht es darum, eine wissenschaftliche Methode zu entwickeln, um das Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) und den anti-Hsp70 Antikörper als potentiell prognostischen Marker in Patientenseren zuverlässig und reproduzierbar nachzuweisen.

Hsp70 Protein ist ein Chaperon (Faltassistent), das intrazellulär und membran-gebunden in allen kernhaltigen Zellen vorkommt. Stresseinwirkungen auf die Zelle in Form von Therapien und Krankheiten verstärken die Expression von Hsp70 und anderen Hitzeschockproteinen. Intrazelluläres Hsp70 hilft bei Reparaturarbeiten in der Zelle und bei der Faltung neu synthetisierter Proteine. Bei Normalgewebe kommt Hsp70 nur im Zellinneren vor. Eine tumorspezifische Translokation von zytosolischem Hsp70 an die Zelloberflächen eröffnet neue diagnostische und therapeutische Optionen (De Maio, 1999; Hantschel et al., 2000; Multhoff et al., 1995).

In dieser Arbeit wurden ELISAtechniken etabliert, mit denen es gelang, Hsp70 Protein und anti-Hsp70 Antikörper im Serum zu messen. Patienten mit Tumoren des Binde- und Stützgewebes, Kopf-Hals-Karzinomen und Prostatakarzinomen zeigten ein deutlich erhöhtes Hsp70 Proteinlevel im Serum im Vergleich zum gesunden Normalkollektiv.

Hsp70 wurde bereits sehr stark beforscht. Nun soll durch den klinischen Bezug eine weitere Grundlage geschaffen werden, um in der Zukunft Hsp70 in der Onkologie als potentiellen Tumorbiomarker zu evaluieren. Diese Arbeit soll als Grundlage dienen, um in Zukunft Studien effizient anhand von Serumparametern überwachen zu können. Dadurch könnten neue Diagnosewege und somit Therapie und Prognose in der Tumoronkologie maßgeblich verbessert werden.

Abstract

Cancer patients benefit from early diagnosis, accurate staging and subsequent restaging after an intervention. Precise monitoring of the disease process is necessary to guide therapy and increase patient survival. Therefore, it is essential to develop time and cost-saving, as well as, patient-friendly tests to direct treatment. The aim of this study was to develop a technology to measure heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibody in serum as a potential reliable and reproducible biomarker in cancer patients. Hsp70 is a chaperone protein, which occurs intracellular and membrane-bound in all nucleated cells. Stress effects on the cell due to diseases and medical interventions increase the expression of Hsp70 and other heat shock proteins. Intracellular Hsp70 is responsible for repairing injured cells and helps to fold new synthesized proteins. In normal tissue Hsp70 occurs only inside the cell. A tumor-specific translocation of cytosolic Hsp70 on the cell surface opens up new diagnostic and therapeutic options in medicine.

Besides developing a novel technique, Hsp70 and anti-Hsp70 levels in the serum of patients suffering from bone, ears, nose and throat, and prostate cancer, was measured and compared against levels in healthy donors. Increased Hsp70 protein Serumlevels in cancer patients were found in comparison to healthy controls.

Hsp70 is already a well-known protein, and this study should help establish it as a potential tumor biomarker in clinical oncology. This work is intended to create the possibility of monitoring future studies utilizing serum parameters. This might open new perspectives in the diagnosis, therapy and prognosis of carcinomas.

1 Einleitung

In der Einleitung werden zunächst grundlegende Kenntnisse über die Kollektive (Tumorkollektiv Binde- und Stützgewebe, Tumorkollektiv Kopf-Hals-Karzinome, Tumorkollektiv Prostatakarzinom) dargelegt. Anschließend wird in das Themengebiet der Hitzeschockproteine eingeführt sowie wichtigste Arbeitsmethode dieser Arbeit, der ELISA, kurz erläutert.

1.1 Tumore des Binde- und Stützgewebe

Dieses Kollektiv wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Sophie Lehnerer erarbeitet. Ihre Doktorarbeit mit dem Titel „Hsp70-Membranexpression auf Sarkomen - eine tumorspezifische Zielstruktur“ befasste sich mit den soliden Tumoren (Lehnerer, 2012). Die vorliegende Doktorarbeit evaluiert die Hsp70 Protein Menge im Serum dieser Tumorpatienten.

1.1.1 Klassifikation

Gemäß seinem Ursprung im Mesoderm ist das Mesenchym embryonales, pluripotentes Stütz- und Füllgewebe und somit der embryonale Ursprung des Binde- und Stützgewebes.

Man unterscheidet in der Embryologie zwischen dem intraembryonalen Mesenchym, welches als Ursprung für Binde-, Knorpel-, Knochen-, Sehnen-, Muskel- und Fettgewebe dient, und dem extraembryonalen Mesenchym, welches als Stützgewebe zur Umhüllung der Leibesfrucht verwendet wird (Böcker et al., 2004; Freyschmidt et al., 2010; Welsch, 2006).

Primäre mesenchymale Tumore entstehen direkt aus dem Gewebe des Binde- und Stützgewebes, sekundäre Tumore sind Metastasen, die sich im Bereich des Binde- und Stützgewebes ansiedeln. Die folgende Arbeit setzt sich mit primären Tumoren auseinander. Muskuloskelettäre Tumore lassen sich in Knochen- und Weichteiltumore unterteilen. In beiden Untergruppen lassen sich gut-

artige (benigne) und bösartige (maligne) Tumore, auch als Sarkome bezeichnet, voneinander unterscheiden. Dazwischen existieren semimaligne Tumore, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird. Jedoch ist die Dignität der Tumore nicht immer leicht und final zu bestimmen (Niethard et al., 2005).

Die Knochentumore werden nach der WHO-Klassifikation von Lyon (2002) wie folgt eingeteilt:

<p>Knorpelige Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Osteochondrom -0 - Chondrom -0 - Enchondrom -0 - Periostales Chondrom -0 - Multiple Chondromatose -1 - Chondroblastom -0 - Chondromyxoidfibrom -0 - Chondrosarkom -3 - zentral, primär und sek. -3 - peripher -3 - dedifferenziert -3 - mesenchymal -3 - Klarzell -3 <p>Osteogene Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Osteoidosteom -0 - Osteoblastom -0 - Osteosarkom -3 - Konventionell -3 <ul style="list-style-type: none"> • Chondroblastisch -3 • Fibroblastisch -3 • Osteoblastisch -3 - Teleangiektatisch -3 - Kleinzellig -3 - niedrig-maligne zentral -3 - sekundär -3 - paraossal -3 - periostal -3 - hochmalig. Oberflächen Osteosarkom -3 	<p>Fibrogener Tumore</p> <ul style="list-style-type: none"> - Desmoplast. Fibrom -0 - Fibrosarkom -3 <p>Fibrohistiozytäre Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Benignes fibröses Histiozytom -0 - Malignes fibröses Histiozytom -3 <p>Ewing-Sarkom/ Primitiver neuroektodermaler Tumor (PNET)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ewing-Sarkom -3 <p>Hämatopoetische Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Plasmazellmyelom -3 - Malignes Lymphom, NOS -3 <p>Riesenzelltumor</p> <ul style="list-style-type: none"> - Riesenzelltumor -1 - Malignität beim RZT -3 <p>Notochordaler Tumor</p> <ul style="list-style-type: none"> - Chordom -0 <p>Vaskuläre Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hämangiom -0 - Angiosarkom -3 	<p>Tumoren der Glatten Muskulatur</p> <ul style="list-style-type: none"> - Leiomyom -0 - Leiomyosarkom -3 <p>Lipogene Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lipom -0 - Liposarkom -3 <p>Neurale Tumore</p> <ul style="list-style-type: none"> - Neurolemmoma -0 <p>Gemischtförmige Tumoren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adamantinom -3 - Metastatische Malignität <p>Sonstige Läsionen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aneurysmatische Knochenzyste - Einfache Zyste - Fibröse Dysplasie - Osteofibröse Dysplasie - Langerhanszell-Histiozytose -1 - Erdheim-Chester-Erkrankung - Brustwandhamartom <p>Gelenkläsionen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Chondromatose -0
--	---	--

Tabelle 1 **WHO-Klassifikation der Knochentumore**, Lyon 2002 (Freyschmidt et al., 2010). Die Tumore der ersten Spalte werden durch das ortständige Gewebe, aus dem sie sich entwickeln, definiert. Die Tumore der zweiten und dritten Spalte werden nach dem vorherrschenden Zelltyp eingeteilt. Die Ziffern beziehen sich auf ihr biologisches Verhalten: 0 = benigner Tumor; 1 = unspezifischer, borderline oder ungewisse Dignität; (2 = in situ carcinoma, Grad III intraepitheliale Neoplasie); 3 = maligner Tumor.

Für diese Arbeit wurden mehrere Entitäten mittels Hsp70 Protein ELISA vermessen. Der Ergebnisteil konzentrierte sich auf drei maligne (Chondrosarkom, Osteosarkom, Liposarkom) sowie zwei benigne Tumore (Enchondrom und Lipom).

Es ist zu erwähnen, dass das Liposarkom sowohl in die Gruppe der Weichteilsarkome als auch in die seltenere Gruppe der Knochensarkome eingeteilt werden kann. In der folgenden Tabelle werden die Entitäten genauer definiert:

Entität	Definition nach WHO-Klassifikation, Lyon 2002
Osteosarkom	Das konventionelle Osteosarkom ist ein primärer, hochgradig maligner, intramedullärer Tumor, dessen neoplastische Zellen Osteoid produzieren, wenn auch (manchmal) nur in kleinen Mengen.
Chondrosarkom	Das Chondrosarkom ist ein maligner Tumor mit rein hyalinknorpeliger Differenzierung. Myxoide Veränderungen, Kalzifizierungen oder Ossifikationen kommen vor.
Liposarkom	Das Liposarkom des Knochens ist eine Neoplasie, deren Phänotyp Fett „rekapituliert“.
Enchondrom	Das Enchondrom ist ein benigner hyaliner Knorpeltumor des Knochenmarkraums. Die meisten Tumore sind solitär, doch können sie – in seltenen Fällen – mehr als einen Knochen oder mehrere Stellen in einem Knochen befallen.
Lipom	Genaue Ursache noch nicht gesichert. Möglicherweise sind sie das Resultat einer abnormalen Entwicklung von primitiven pluripotenten mesenchymalen Zellen, die sich normalerweise in Adipozyten differenzieren.

Tabelle 2 **Definition (WHO-Klassifikation) ausgewählter Entitäten mesenchymaler Tumore** eigene Zusammenstellung aus (Freyschmidt et al., 2010; Grivas et al., 2008)

Für die genaue Klassifikation eines Tumors sind Aussagen über dessen Dignität (Grading) und lokale systemische Ausbreitung (Staging) erforderlich. Durch diagnostische Maßnahmen ist es möglich, Tumore in ihrer Malignität, sowie Größe (T), dem Lymphknotenbefall (N) und der Fernmetastasierung (M), zu beschreiben (Kapitel 1.1.7).

1.1.2 Epidemiologie

Tumore des Binde- und Stützgewebes sind seltene Tumore. Primäre Knochentumore machen ca. 1% aller Tumore aus (Niethard et al., 2005). 75% aller diagnostizierten primären Knochentumore sind laut Schweizer Krebsregister benigne. Die tatsächliche Prävalenz könnte hier aufgrund des asymptomatischen Verlaufs tatsächlich noch höher liegen.

Aufgrund der Seltenheit werden die malignen Knochentumore, trotz frühzeitiger Symptome, oft verkannt und verspätet diagnostiziert. Zwei Drittel der primären Knochentumore fallen in die Wachstumsperiode im Jugendalter (Niethard et al., 2005). Die Inzidenz der Knochensarkome wird in der Literatur mit ca. 0,8 Fällen pro 100.000 Einwohner/ Jahr beschrieben (Freyschmidt et al., 2010).

Sekundäre Knochentumore treten 2,5-mal häufiger als primäre Knochentumore auf und stehen vor allem im Erwachsenenalter im Vordergrund (Böcker et al., 2004; Niethard et al., 2005).

Die folgende Tabelle mit epidemiologischen Daten zu ausgewählten Knochentumoren, wurden von Dr. Sophie Lehnerer basierend auf Angaben des Basler Knochentumor-Referenzzentrums (Jundt, 1997) und den Daten von Dahlin und Schajowitz (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie Schütte, 2006; Walden et al., 2008) zusammengetragen.

Entität des Tumors	Altersdurchschnitt in Jahren (Lebensjahr LJ)	Geschlechterverteilung (M:F)	Häufigkeit % aller KT	Häufigkeit % aller malignen KT
Osteosarkom	19	1,1:1	20%	40%
Chondrosarkom	46	1,4:1	9%	20%
Liposarkom -im Knochen	20.-40. LJ ¹	Nicht bekannt ¹	<1%	<1%
-im Weichteilgewebe	40.-60 LJ ²	Nicht bekannt ¹	-	20% (aller Sakome) ²
Enchondrom	38	0,9:1	3-10% ⁴	-
Lipom	40.-50.LJ	-	-	-

Tabelle 3 **Epidemiologische Daten Knochentumore (KT) ausgewählter Entitäten** Zusammenstellung aus (Böcker et al., 2004; DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie Schütte, 2006; Freyschmidt et al., 2010; Walden et al., 2008).

Die Tabelle zeigt eine Präferenz des Auftretens im männlichen Geschlecht und verdeutlicht, dass das Osteosarkom mit der größten Häufigkeit unter den Knochentumoren auftritt.

1.1.3 Ätiologie

Die Ätiologie der primären Knochentumore ist bis dato nicht ausreichend erforscht. Es ist jedoch bekannt, dass einige Tumore wie Riesenzelltumore, Osteoblastome, Chondroblastome und das Enchondrom mit geringer Häufigkeit zur Entartung neigen. Besonders Enchondrome des Beckens sind potentiell maligne (entartet) und sollten deshalb vollständig reseziert werden. Auf diese besondere Stellung der Enchondrome wird unter Kapitel 3.2 dezidiert eingegangen.

Das erhöhte Risiko, an einem Knochentumor zu erkranken, geht beispielsweise mit folgenden Krankheiten einher: Morbus Paget, chronische Osteomyelitiden, familiäre Retinoblastomsyndrom, uvm. Aber auch strahlenduzierte Knochenveränderung (z.B. durch Radiotherapie) können prädisponieren und zu einer Entartung führen (Freyschmidt et al., 2010; Niethard et al., 2005).

1.1.4 Klinisches Bild

In den Frühstadien der Tumore ist das klinische Erscheinungsbild oftmals unspezifisch und lediglich von Schwellung und Schmerz gekennzeichnet. Diese Symptome sind jedoch nicht spezifisch und könnten bei malignen und benignen Tumoren, aber auch bei Entzündungen auftreten. Die sogenannte B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust) tritt allenfalls bei einem kleinen Teil der Patienten, in der Regel dann mit einem fortgeschrittenen malignen Tumorstadium assoziiert, auf. Benigne Tumore manifestieren sich eher durch eine langsam progrediente Klinik. Maligne Tumore hingegen eher durch eine rasch progredient verlaufende klinische Manifestation. Auch pathologische Frakturen können eine Erstmanifestation darstellen (Berchthold et al., 2008; Niethard et al., 2005). Interessanterweise können maligne Tumore auch einen projizierenden Schmerz in einer nicht betroffenen Region verursachen (Freyschmidt et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Ein klinisches Leitsymptom bzw. einen klinischen Leitbefund gibt es im Fall der Tumore des Binde- und Stützgewebes nicht.

1.1.5 Lokalisation

Zur Lokalisation der Knochentumore lässt sich festhalten, dass sich die verschiedenen Entitäten pathognomonisch an bestimmten Stellen des Skeletts und Knochens manifestieren.

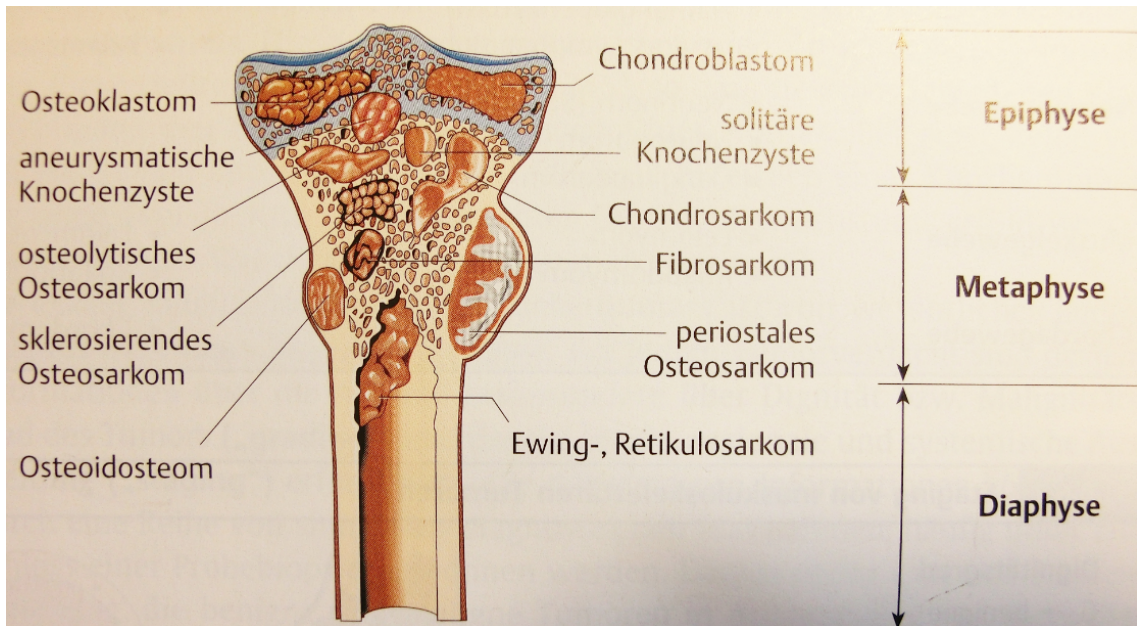


Abbildung 1 **Typische Lokalisation von Knochentumoren** Duale Reihe Orthopädie S.228 (Niethard et al., 2005). Die Abbildung zeigt die Unterteilung des Knochens ins Epiphyse (gelenknah) Metaphyse (Übergangszone) und Diaphyse (Schaftbereich).

Bevorzugt treten Tumore gelenknah auf, da Tumorentstehung in Bezug zu Gewebedifferenzierung gebracht werden kann, deshalb ist die Epiphysenfuge besonders während des Längenwachstums betroffen (Niethard et al., 2005).

Der Diagnosefindung dienliche typische Lokalisationen der Tumore stellt die folgende Übersichtstabelle da:

Entität	Knochenlokalisierung	Skelettlokalisierung
Osteosarkom	Metaphyse, Diaphyse	Femur (45%), Tibia (20%), Humerus (10%)
Chondrosarkom	Metaphyse, Diaphyse	Femur (23%), Os illium (19%), Humerus (10%), Rippen (10%)
Liposarkom	Metaphyse, selten Diaphyse	Weichteile, Femur (10%)
Enchondrom	Diaphyse	Skelett der Hand(60%), Femur (10%)

Tabelle 4 **Lokalisation der Tumore des Binde- und Stützgewebes** eigene Zusammenstellung (DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie Schütte, 2006; Freyschmidt et al., 2010; Niethard et al., 2005)

1.1.6 Diagnostik

Der typische Diagnoseweg einer Krankheit besteht aus einem klinischen Befund (subjektive und objektive Leiden des Patienten) und ergänzender Diagnostik mittels Labor und Bildgebung.

Sowohl die Klinik als auch das Labor bieten im Fall von Knochentumoren allenfalls einen Verdacht auf ein Tumorleiden, jedoch liegt oftmals kein klares richtungsweisendes Bild vor.

Durch eine Ultraschalluntersuchung und ein Röntgenbild der betroffenen Region lässt sich meistens eine Verdachtsdiagnose ausräumen oder erhärten. Schlussendlich wird je nach Tumorentität und Ausmaß der Weichteilbeteiligung die konventionelle Bildgebung durch CT (Computertomographie), MRT (Magnetresonanztomographie), Szintigraphie oder Angiographie ergänzt. Auf radiologische Diagnosekriterien verschiedener Entitäten wird hier nicht weiter eingegangen.

Goldstandard in der Diagnostik ist die histopathologische Beurteilung einer Biopsie (Niethard et al., 2005). Histopathologisch werden sowohl generelle Malignitätskriterien (Kernatypien, Hyperchromatose, Hyperzellularität, Anaplasie, etc.) als auch spezifische Merkmale (Matrixprodukte und immunhistochemische Marker) herausgearbeitet, um den Tumor möglichst exakt zu klassifizieren (Böcker et al., 2004). An dieser Stelle wird nicht weiter auf die Pathologie der soliden Tumore eingegangen.

Die Diagnostik setzt sich zusammen aus einer lokalen und einer systemischen Ausbreitungsdiagnostik.

1.1.7 Stadieneinteilung (Staging)

Um eine adäquate Therapie einleiten und eine Prognose ableiten zu können, ist es wichtig, neben der Tumorentitätsfeststellung ein Staging durchzuführen. Als Grundlage der Stadieneinteilung gelten die TNM-Klassifikation und das Grading.

Grading bedeutet die histologische und/ oder zytologische Charakterisierung maligner Tumore. Hierbei gehen vor allem Kernatypien, Mitosezahlen und die

Differenzierung des Gewebes in die Beurteilung ein. Numerisch werden den histologischen und/ oder zytologischen Differenzierungsgrade G0-G4 zugewiesen. G0 bedeutet hierbei benigne, G1 geht mit hochdifferenziert und damit niedrigmaligne einher. G4 deutet auf niedrigdifferenziertes Gewebe hin und gilt damit als hochmaligne (Böcker et al., 2004).

Die TNM-Klassifikation beschreibt die Komponenten T (Tumorgröße), N (Lymphknotenmetastasierung) und M (Metastasierung) und wird in folgender Tabelle genauer erläutert.

TNM - Klassifikation der mesenchymalen Knochentumore	Kriterium/ Definition
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T1	Tumor <8cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor >8cm in größter Ausdehnung
T3	Diskontinuierliche Ausbreitung in primär befallenen Knochen
N0	Keine regionären Lymphknoten/Metastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Lunge
M1b	Andere Fernmetastasen

Tabelle 5 **TNM-Klassifikation der mesenchymalen Tumore** nach UICC/ AJCC 2002. Die lokale Ausbreitung im vorliegenden Fall wird auch mit T0 (intrakapsulär), T1 (extrakapsulär, intrakompartimental) und T2 (extrakompartimental) beschrieben.

Stadium benigne KT	Grading	Lokalisation	Metastase
1	G0	T0	M0
2	G0	T0	M0
3	G0	T1-2	M0-1

Tabelle 6 **Stadieneinteilung benigner Knochentumore** Enneking 1985

Die Einteilung der malignen Knochentumore nach Enneking 1985 ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Stadium maligne KT	Grading	Lokalisation	Metastase
1A	G1	T1	M0
1B	G1	T2	M0
2A	G2	T1	M0
2B	G2	T2	M0
3A	G1-2	T1	M1
3B	G1-2	T2	M1

Tabelle 7 **Stadieneinteilung maligner Knochentumore** nach Enneking 1985

Je nach Zentrum oder klinischer Untersuchung wird auch folgende Klassifikation nach UICC/ AJCC 2002 verwendet.

Stadium maligner KT	Grading	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
IA	G1,2	T1	N0	M0
IB	G1,2	T2	N0	M0
IIA	G3,4	T1	N0	M0
IIB	G3,4	T2	N0	M0
III	Jedes G	Jedes T	N0	M0
IVA	Jedes G	Jedes T	N0	M1a
IVB	Jedes G	Jedes T	N1	Jedes M
IV		Jedes T	Jedes M	M1b

Tabelle 8 **Klassifikation maligner Knochentumore** nach UICC/ AJCC 2002

1.1.8 Therapie

Die Therapie der Tumore des Binde- und Stützgewebes richtet sich nach Dignität (benigne oder maligne) sowie Entität und Staging. Bei benignen Tumoren gilt eine zurückhaltende Einstellung gegenüber operativer Therapien, nur bei rezidivierenden klinischen Problemen und bei Verdacht auf drohende Instabilität des Kochens wird eine Operation durchgeführt (Niethard et al., 2005).

Bei malignen Tumoren richtete sich die Radikalität der Operation nach der Ausbreitung. Ab dem Stadium IIA wird zumeist ein radikales Resezieren empfohlen (Freyschmidt et al., 2010).

Die folgende Abbildung Nummer 2 aus der Dualen Reihe Orthopädie (Freyschmidt et al., 2010) zeigt Operationsoptionen und die damit verbundenen Rezidivraten.

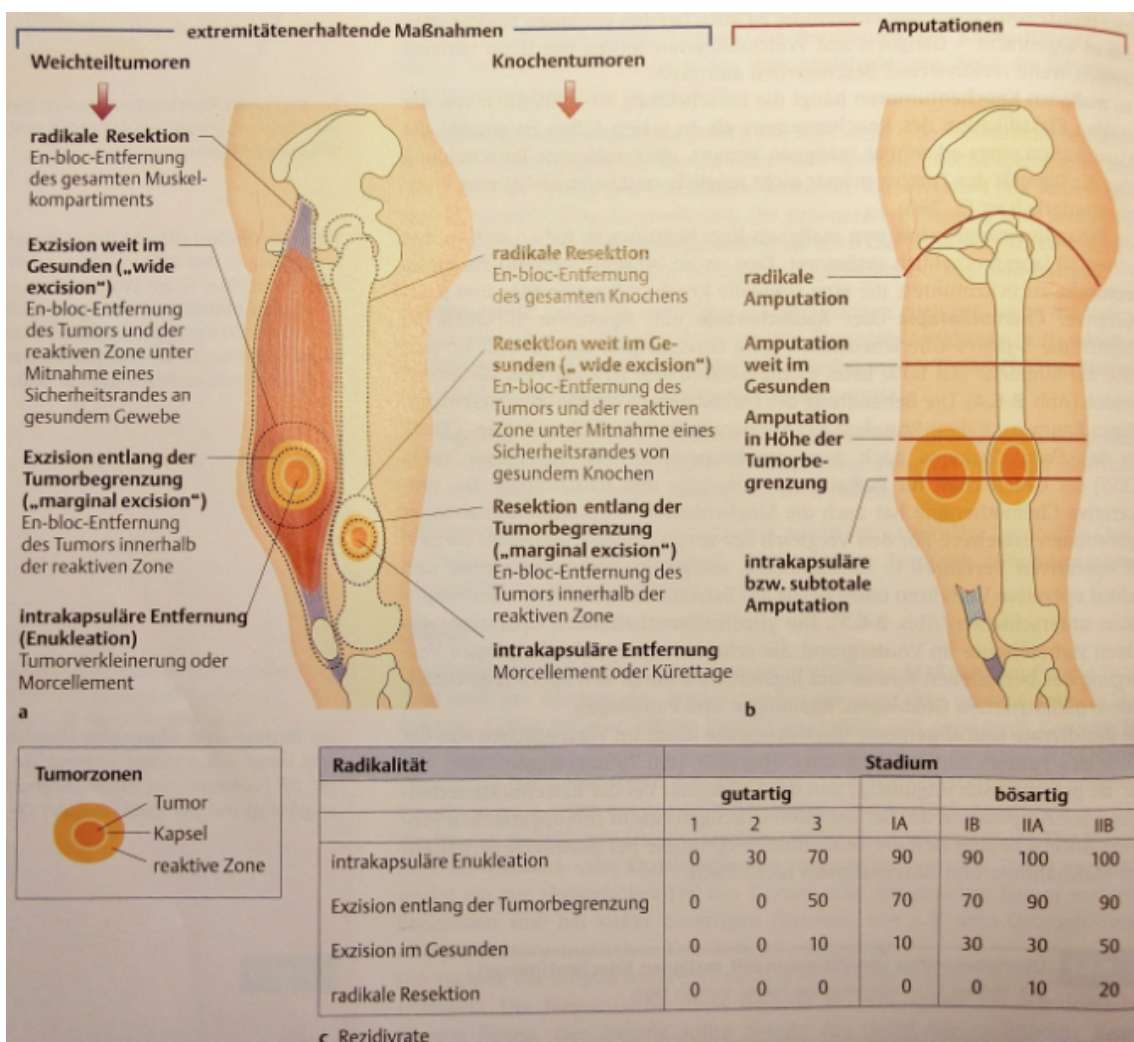


Abbildung 2 **Operative Therapie maligner Knochentumore und Rezidivraten** Duale Reihe Orthopädie S.232 (Niethard et al., 2005). Die Abbildung zeigt verschiedene Resektionsgrenzen

bei malignen Tumoren. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Extremität erhaltende Operationen und Amputation. Je nach notwendiger Radikalität steigt der Flurschaden, aber auch die Chance des Überlebens.

Je nach Entität kommen auch prä- und postoperative Chemotherapie oder Strahlentherapie als Behandlungsoptionen in Betracht, jedoch mit unterschiedlichem Outcome (Bacci et al., 2001; Dickey et al., 2004).

1.1.9 Prognose

Abbildung 2 bietet bereits eine erste Übersicht über die Art der Operation und der damit verbundenen Rezidivraten.

Allgemein lässt sich festhalten, dass die Prognose entscheidend vom Staging abhängt. Je kleiner, besser differenzierter und radikaler operiert ein Tumor ist, desto höher ist die Survivalkurve. Tumorumfänge über 150cm³ gelten als prognostisch ungünstig (Niethard et al., 2005).

Das 5-Jahresüberleben beim Osteosarkom beträgt 50-70%, das des Chondrosarkoms liegt bei 77% (Björnsson et al., 1998; Niethard et al., 2005).

1.2 Kopf-Hals-Karzinom

Unter Kopf-Hals-Karzinomen versteht man eine Gruppe maligner Tumore, die ihren Ursprung im Kopf und Hals Bereich haben.

1.2.1 Klassifikation und Histologie

Zu den Kopf-Hals-Karzinomen zählen laut Einteilung der Neubildungen nach *ICD-10#C00-C14* unter anderem:

- Mundhöhlenkarzinome
- Nasopharynxkarzinome
- Tracheakarzinome
- Oropharynxkarzinome (Gaumen-, Zungengrund-, Tonsillenkarzinome)
- Hypopharynxkarzinome
- Larynxkarzinome (Glottiskarzinome, supra-/ sub-/ transglottische Larynxkarzinome)

Die folgende Abbildung dient als grobe Übersicht der Lokalisation der Kopf-Hals-Karzinome.

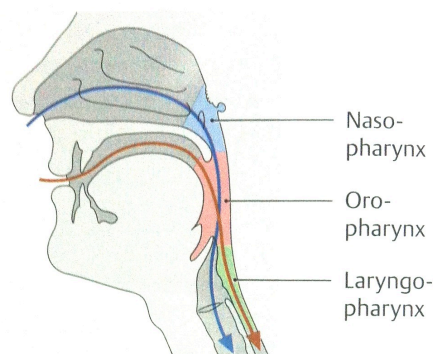


Abbildung 3 **Etagengliederung der Schlundhöhle (Cavitas pharynx)** Prometheus Hals und Innerer Organe S. 36 (Schünke et al., 2005). Die obere Etage bildet der Nasopharynx oder Epipharynx, die mittlere Etage wird Oropharynx oder Mesopharynx und die untere Etage Laryngopharynx oder Hypopharynx genannt. Die Nomenklatur richtet sich nach den anatomischen Leitstrukturen der jeweiligen Etage.

Im Ergebnissteil werden vor allem Ergebnisse aus dem Bereich Oropharynx-, Tonsillen-, Hypopharynx- und Larynxkarzinome vorgestellt. Aus diesem Grund beschränkt sich die folgende Einleitung auf diese Entitäten.

Histologisch handelt es sich bei >90% der Kopf-Hals-Tumore um Plattenepithelkarzinome. Hierbei handelt es sich um Epithel der Haut und der Schleimhäute, die in maligne Tumore, auch Karzinome genannt, entarten (Böcker et al., 2004).

1.2.2 Epidemiologie

Die Krebserkrankungen des Kopf- und Hals-Bereiches stehen weltweit auf Platz sechs der häufigsten Malignomerkrankungen. Larynxkarzinome treten aktuell noch im Verhältnis 6:1 bei Männern zu Frauen auf (d.h., ca. 3.300 Neuerkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland pro Jahr bei den Männern und 500 Neuerkrankungen pro Jahr bei den Frauen) (Böcker et al., 2004). Die Zunahme des Rauchverhaltens der Frauen wird dieses Verhältnis in den nächsten Jahren verschieben. Vor allem China mit seinem hohen Nikotinkonsum weist ein erhöhtes Vorkommen von Kopf-Hals-Tumoren auf. Die meisten Patienten sind zum Diagnose Zeitpunkt zwischen 50 und 70 Jahren alt. Pharynxkarzinome haben eine Inzidenz von 2 pro 100.000 Einwohnern. Die häufigsten Oropharynxkarzinome sind Tonsillen und Zungenkarzinome, während der Nasopharynx seltener betroffen ist (Behrbohm et al., 2009; Böcker et al., 2004).

1.2.3 Ätiologie

Die meisten Menschen mit einem Kopf-Hals-Tumor haben einen langjährigen Nikotin und Alkoholabusus (vor allem hochprozentiger Alkohol) hinter sich. Eine weitere Noxe ist Kautabak, sowie Infektionen mit HPV (Humane Papilloma Viren) oder EBV (Ebstein-Barr-Virus). Schlechte Mundhygiene, hoher Konsum heißer und stark gewürzter Speisen und Mate Tee gelten als Kofaktoren für die Tumorentstehung (Behrbohm et al., 2009; Böcker et al., 2004).

Krankheitsbilder wie beispielsweise Dysphagie (Plummer-Vinson-Syndrom), chronisch-hyperplastische Laryngitis, gastroösophagealer Reflux gelten ebenfalls als prädisponierende Faktoren für Pharynx- bzw. Larynxkarzinome.

Ebenfalls berufliche Noxen wie Schwefelsäuredämpfe, Fichtenholzstäube, Textilstäube, Teer, Nickel, Dieseldämpfe und viele andere Noxen begünstigen das Auftreten von Larynxkarzinomen. Bei Kehlkopfkarzinomen unter Asbestbelastung ist es bereits als Berufskrankheit (Nr. 4104) anerkannt (Behrbohm et al., 2009).

1.2.4 Klinisches Bild

Die unterschiedlichen Lokalisationen der Kopf-Hals-Tumore zeichnen sich klinisch verschieden ab. Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht über das Erscheinungsbild der verschiedenen Lokalisationen und wurde aus dem Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde (Behrbohm et al., 2009) zusammengetragen.

Entität der Kopf-Hals-Tumore	Klinik
Supraglottische Larynxkarzinome	Druck im Kehlkopf, Schluckbeschwerden, häufig werden Halsmetastasen zuerst entdeckt
Transglottische Larynxkarzinome	Frühe anhaltende Heiserkeit, Schluckbeschwerden, Atemnot
Subglottische Larynxkarzinome	Luftnot, Heiserkeit
Hypopharynxkarzinome	Dysphagie, Schluckbeschwerden, Schmerz ins Ohr ausstrahlend, Lymphkotschwellung schmerzlos im Kieferwinkel
Oropharynxkarzinom	Erste Symptome sehr spät, Halsschmerzen, klosige Sprache, z.T. Ausstrahlung ins Ohr, ev. später Kieferklemme, Metastasen im Kieferwinkel

Tabelle 9 **Übersicht Klinik der verschiedenen Entitäten der Kopf-Hals-Tumore** eigene Zusammenstellung Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde S. 1-215 (Behrbohm et al., 2009).

1.2.5 Grading und Staging

Um die adäquate Therapie festzulegen und eine Prognose ableiten zu können, ist es wichtig, neben der Tumorentitätsfeststellung ein Staging durchzuführen. Als Grundlage der Stadieneinteilung gilt die TNM-Klassifikation und das Grading.

Grading bedeutet die histologische und/ oder zytologische Charakterisierung maligner Tumore. Hierbei gehen vor allem Kernatypien, Mitosezahlen und die Differenzierung des Gewebes in die Beurteilung ein. Numerisch werden den histologischen und/ oder zytologischen Differenzierungsgrade G0-G4 zugewiesen. G0 bedeutet hierbei benigne, G1 geht mit hochdifferenziert und damit niedrigmaligne einher. G4 deutet auf niedrigdifferenziertes Gewebe hin und gilt damit als hochmaligne (Böcker et al., 2004).

Die TNM-Klassifikation beschreibt die Komponenten T (Tumorgröße), N (Lymphknotenmetastasierung) und M (Metastasierung).

Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht der TNM-Klassifikation der Larynxkarzinome:

TNM-Klassifikation*	
T-Klassifikation: Größe des Primärtumors am Entstehungsort**	
Supraglottis	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert Schleimhaut von mehr als einem benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis (z. B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis), ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna
Glottis	
T1	Tumor auf die Stimmlippe begrenzt (kann auch vordere oder hintere Kommissur befallen), normale Beweglichkeit T1 a: einseitig T1 b: beide Stimmlippen befallen
T2	Tumor breitet sich auf Supraglottis und/oder Subglottis aus und/oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit (phonatorisch), ohne Fixation
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postkrikoidgegend und/oder des präepiglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna
Subglottis	
T1	Tumor auf die Subglottis begrenzt
T2	Tumor breitet sich auf eine Stimmlippe oder beide Stimmlippen aus; diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit (ohne Fixation)
T3	Tumor auf Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
T4a	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z. B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna
N-Klassifikation: Ausmaß des Befalls der regionalen Lymphknoten	
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
M-Klassifikation (Fernmetastasierung)	
Mx	Fernmetastasen nicht ermittelbar
M0	keine bekannten Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
* T = Ausdehnung des Primärtumors, N = Fehlen oder Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, M = Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen	
** Für alle Formen gilt: Tx: Größe kann nicht bestimmt werden, T0 keine Tumorzeichen, Tis Carcinoma in situ	

Tabelle 10 TNM-Klassifikation der Larynxkarzinome (Behrbohm et al., 2009)

Die T-Stadien der Oropharynxkarzinome können der folgende Tabelle 11 entnommen werden. N-/ M-Stadium der Oropharynxkarzinome ist denen der Larynxkarzinome gleichzusetzen und somit der Tabelle 10 zu entnehmen:

T-Stadium der Oropharynxkarzinome	Definition
T0	Kein Tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor kleiner oder gleich 2 cm
T2	Tumor mehr als 2cm aber kleiner als 4cm
T3	Tumor ist größer als 4cm
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen

Tabelle 11 **T-Klassifikation der Oropharynxkarzinome** (Behrbohm et al., 2009)

Die T-Stadien der Hypopharynxkarzinome können der Tabelle 12 entnommen werden, N-/ M-Stadium der Hypopharynxkarzinome ist denen der Larynxkarzinome gleichzusetzen und somit der Tabelle 10 zu entnehmen:

T-Stadium der Hypopharynxkarzinome	Definition
T0	Kein Tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor kleiner oder gleich 2 cm, auf Unterbezirk des Hypopharynx beschränkt
T2	Tumor mehr als 2cm aber kleiner als 4cm, infiltriert einen Unterbezirk, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor ist größer als 4cm, infiltriert mehr als ein Unterbezirk, mit Fixation des Hemilarynx
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen (Knorpel- / Weichteil)

Tabelle 12 **T-Klassifikation der Hypopharynxkarzinome** (Behrbohm et al., 2009)

1.2.6 Diagnostik

Der typische Diagnoseweg einer Krankheit besteht aus einem klinischen Befund (subjektive und objektive Leiden des Patienten) und ergänzender Diagnostik mittels Labor, Bildgebung und ggf. Einleiten einer Intervention (Biopsie).

Im Falle der Kopf-Hals-Tumore sind entweder HNO-Ärzte (Hals-Nasen-Ohren) oder MKG (Mund-/ Kiefer-/ Gesichtschirurgen) betroffen.

Neben einer standardisierten Anamnese und der klinischen Untersuchung des gesamten Körpers sollte ein besonderes Augenmerk auf die tastbaren Lymphknotenstationen geworfen werden. Danach erfolgt die Untersuchung mit Hilfe eines Laryngoskops. Als bildgebende Verfahren kommen Sonografie, MRT, CT, Knochenszintigraphie sowie PET Bildgebung in Betracht. Eine weitere Metastasen Suche mittels Röntgenthorax und Oberbauchsonographie etc. sollte immer ergänzend durchgeführt werden.

Letztendlich wird meist eine Biopsie zur zweifelsfreien Diagnosestellung durchgeführt (Behrbohm et al., 2009).

1.2.7 Therapie

Für die Therapie ist das Staging und die Entität von entscheidender Bedeutung. Als Säulen der Behandlung stehen chirurgische Resektionen, Strahlentherapie und Chemotherapie zur Verfügung, die je nach Fall einzeln gewählt oder kombiniert werden.

Die folgende Tabelle 13 bietet eine Übersicht über die Behandlungsoptionen. Die Therapiemöglichkeiten wurde aus dem Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde (Behrbohm et al., 2009) zusammengetragen.

Entität der Kopf-Hals-Tumore	Therapie
Supraglottische Larynxkarzinome	Exzision im Gesunden, Kehlkopfteilresektion bis zur Laryngektomie, Neck Dissection und Radiochemotherapie
Transglottische Larynxkarzinome	Exisionsbiopsie, CO ₂ -Laser, Thyreotomie, Chörektomie, frontolaterale Teilresektion, Laryngektomie, bei Tis/T1 kurative Hochdosis Radiotherapie möglich,
Subglottische Larynxkarzinome	Laryngektomie und bds. Neck Dissektion
Hypopharynxkarzinome	Radikale chirurgische Resektion mit Neck Dissektion (organerhaltende endoskopische Laserchirurgie) und postoperativer Radiatio 50-70Gy ggf. auch Brachytherapie, adjuvante oder palliative Polychemotherapie
Oropharynxkarzinom	Radikale chirurgische Resektion mit Neck Dissection, ab T2 Radiatio mit 60-75Gy, bei Inoperabilität erfolgt eine Polychemotherapie, supportiv eine Tracheotomie und PEG Anlage (perkutane endoskopische Gastrostomie)

Tabelle 13 **Therapieoptionen der verschiedenen Entitäten der Kopf-Hals-Tumore** eigene Zusammenstellung Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde S. 1-215.

1.2.8 Prognose

Kleine, lokale Oropharynxkarzinome haben eine 5 Jahres-Überlebensrate von 50-60%. Bei fortgeschrittenen metastasierten Oropharynxkarzinomen liegt die Heilungschance unter 20% (Behrbohm et al., 2009). Das 5 Jahres-Überleben liegt bei allen Tonsillenkarzinomen bei ca 30% (Böcker et al., 2004). Hypopharynxkarzinome haben eine infauste Prognose: T1/2 Tumore mit Metastasen haben eine 5 Jahres-Überlebensrate von 30%, T3 Tumore von gerade mal 20%. Larynxkarzinome haben aufgrund ihrer frühen Klinik eine bessere Prognose. Sie metastasieren sehr spät, da Stimmbänder wenig Lymphbahnen enthalten. Bei erhaltener Stimmlippenbeweglichkeit ergibt sich ein 5 Jahres-rezidivfreies-Überleben von 90%. Bei subglottischen Karzinomen schreitet die Lymphknotenmetastasierung schneller voran und die 5 Jahres-Überlebensrate beträgt 50% (Behrbohm et al., 2009; Böcker et al., 2004).

1.3 Prostatakarzinom

Der folgende Teil der Einleitung bietet einen Überblick über die Prostata. Es wird vor allem auf das maligne Prostatakarzinom besonders eingegangen.

1.3.1 Prostata-Aufbau, Funktion, Lage des Karzinoms

Die Prostata (gr. Prostátēs = Vorsteher, Vordermann) gehört zu den männlichen Geschlechtsorganen. Sie ist in etwa kastaniengroß und liegt vom Damm herkommend vor der Harnblase. Die Urethra wird von ihr umgeben. Die Prostata besteht aus tubuloalveolären Einzeldrüsen (einschichtiges Plattenepithel oder hochprismatisches Epithel) mit Ausführungsgängen und ist von einer Kapsel umgeben. Im klinischen Alltag wird die Prostata in drei Zonen untergliedert: urethrale Zone unmittelbar um die Harnröhre, transitionale Zone (Übergangszone) als breite Zwischenzone und periphere Zone an die Kapsel angrenzend (Lippert, 2003).

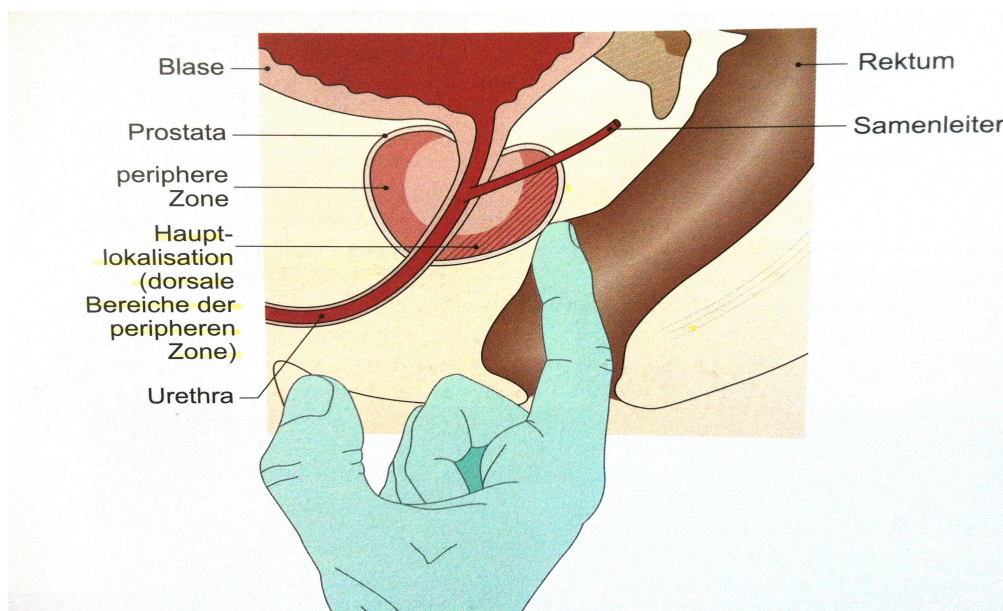


Abbildung 4 **Aufbau und Lage der Prostata** Basics Urologie S. 56 (Lippert, 2003). Die Abbildung zeigt eine DRU (Digitale-Rektale-Untersuchung). Des Weiteren ist die dorsale periphere Zone eingezeichnet als Hauptlokalisationsort des Prostatakarzinoms.

Die Prostata produziert ein Sekret, das bei der Ejakulation in die Harnröhre abgegeben wird und sich mit den Spermien vermischt (ca. 30% des Ejakulats). Neben vielen weiteren Funktionen und Aufgaben wird aus den Epithelzellen der Prostata PSA (Prostata-spezifisches Antigen) sezerniert. Das Sekret hat auch viele weitere Eigenschaften, wie z.B. die pH-Regulierung (Lippert, 2003; Schiebler, 2004; Welsch, 2006).

Das Prostatakarzinom entsteht in 70% der Fälle in der dorsalen, peripheren Zone. Von hier breitet es sich zunächst lokal in die umgebenden Organe und entlang der Nerven und Blutbahnen aus. Die lymphogene Metastasierung zieht in die prävertebralen Lymphabflussstationen. Die hämatogene Metastasierung erfolgt via prävertebralen Venen in den Venenplexus und dann bevorzugt in den Knochen (Wirbelsäule, Beckenknochen, Femur) (Cotic et al., 2009).

1.3.2 PSA - prostataspezifisches Antigen

Das PSA ist ein Parameter, der im Blut gemessen wird und zum Screening, der Tumorausdehnungsbestimmung und der Verlaufskontrolle dient.

Es handelt sich um eine von den Epithelzellen der Prostata produzierte Serinprotease, die die Koagulation des Ejakulats verhindert. Die Halbwertszeit ist 2,2 - 3,2 Tage (Cotic et al., 2009). Nach rektaler Untersuchung oder durch lokale Manipulation, sowie durch Zelluntergang kann der Wert, ebenso wie durch eine Entzündung, beeinflusst werden. Aufgrund der Gefahr falsch positiver Werte eignet sich das PSA besonders als hoch spezifischer Verlaufsparemeter jedoch nicht als Einzelwert. Vor allem das Verhältnis von freiem zu gebundenem PSA oder altersspezifische-PSA Tests erhöhen die Aussagekraft (Bamberg et al., 2009).

In der klinischen Routine wird ab einem Wert von $>4\text{ng/ml}$ im Serum eine Folgediagnostik eingeleitet (Cotic et al., 2009). Bei einem erhöhten Wert sollte man auf das Verhältnis von freiem zu gesamten PSA ($<20\%$) schauen und den jährlichen Anstieg beachten ($0,6\text{ng/ml}$ im Serum sollte nicht überschritten werden). Werden diese Kriterien überschritten, kann von einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für ein Karzinom gesprochen werden (Heidenreich et al., 2008).

Zusammenfassend wird die Geschwindigkeit und die Größe der PSA-Änderung als PSA-Velocity bezeichnet (Cotic et al., 2009).

1.3.3 Epidemiologie

„Es wird davon ausgegangen, dass jeder Mann irgendwann in seinem Leben an einem Prostatakarzinom erkrankt, wenn er nur das nötige Alter erreicht.“ (Cotic et al., 2009). Diese Aussage spiegelt die hohe Rate an Prostatakarzinomen in Deutschland wieder.

Das Adenokarzinom der Prostata stellt die zweithäufigste krebisbedingte Todesursache beim Mann dar und gilt weiterhin als die häufigste Tumorerkrankung beim Mann. Es zählt zur dritt häufigsten Tumorerkrankung der westlichen Industrienationen (Jemal et al., 2007).

Die Inzidenz der Neuerkrankungen in Deutschland liegt bei 46.600 pro Jahr (Gröneberg, 2003). Die Quelle Radioonkologie (Bamberg et al., 2009) berichtet, dass in den letzten 30 Jahren die Inzidenz des Prostatakarzinoms um 2-3% pro Jahr gestiegen ist. Ursache hierfür ist eine zunehmend bessere Diagnostik durch Bestimmung des PSA-Levels und eine hohe Prävalenz latenter Prostatakarzinome in der Bevölkerung.

1.3.4 Ätiologie

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist nur teilweise geklärt. Rauchen als typischer Risikofaktor anderer Krebsarten gilt auch als anerkannter Risikofaktor für das Prostatakarzinom. Kontrovers in der Literatur diskutiert gilt die Wirkung von Östrogen und Testosteron. Hierbei soll Testosteron eine eher wachstumsfördernde Komponente und Östrogen eine eher wachstumshemmende Komponente haben. Festzuhalten gilt, dass hohe Testosteronspiegel aber nicht obligat zu einem Prostatakarzinom führen (Cotic et al., 2009). Es wurde eine erhöhte Inzidenz von Prostatakarzinomen in entwickelten Ländern festgestellt (15,3% vs. 4,3%). Jedoch ist die Häufigkeit des Auftretens des Karzinoms größeren Schwankungen unterworfen (90fach) (Gröneberg, 2003).

1.3.5 Klinisches Bild

Wie bereits in Abbildung 5 abgebildet, ist der Hauptlokalisationsort des Prostatakarzinoms die periphere dorsale Zone.

Früher wurden die Prostatakarzinome meist erst ab dem T2 Stadium diagnostiziert und die Patienten klagten maßgeblich über Miktionstörungen und Hämaturie, da erst fortgeschrittene Tumorstadien diese Klinik verursachen. Die Symptome könnten aber ebenfalls auf eine benigne Prostatahyperplasie hindeuten. Heute, aufgrund eines verstärkten Screenings mittels DRU und PSA, werden immer häufiger asymptomatische T1, T2 Stadien mit N0 und M0 diagnostiziert.

Metastasierte Prostatakarzinome können häufig folgende Symptome zeigen: Rückenschmerzen, postrenales Nierenversagen, Tumoranämie, Lymphödeme und Gewichtsverlust (Bamberg et al., 2009; Cotic et al., 2009).

1.3.6 Diagnostik und Screening

Der typische Diagnoseweg einer Krankheit besteht aus einem klinischen Befund (subjektive und objektive Leiden des Patienten) und ergänzender Diagnostik mittels Labor, Bildgebung und ggf. Einleiten einer Intervention (Biopsie).

Ab dem 50. Lebensjahr sollte jeder Mann in der jährlichen Krebsvorsorge (Screening) digital rektal untersucht werden. Hierbei lässt sich bei einem Karzinom häufig eine verhärtete Prostata tasten. Im fortgeschrittenen Stadium lässt sich eher eine höckerige Oberfläche palpieren. Nach Zustimmung des Patienten wird auch jährlich der PSA Spiegel bestimmt (Cotic et al., 2009).

Differenzialdiagnostisch sollte immer eine benigne Prostatahyperplasie und eine Prostatitis ausgeschlossen werden.

Suspekte Befunde werden nach folgendem Behandlungsalgorithmus abgeklärt:

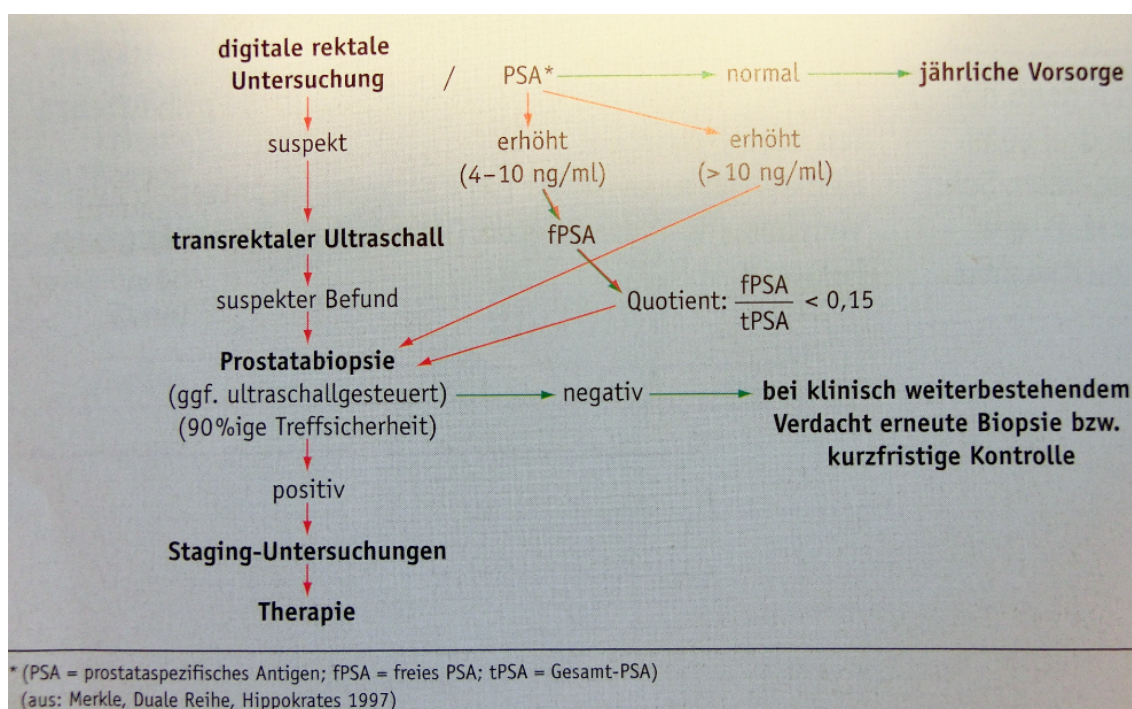


Abbildung 5 **Diagnostikalgorithmus des Prostatakarzinoms** Basics Urologie S. 58 (Cotic et al., 2009). Beim Screening wird vor allem auf folgende Punkte geachtet: PSA über 4ng/ml, suspekter Tastbefund, jährlicher PSA Anstieg. Staging Untersuchung siehe 1.3.8.

1.3.7 Klassifikation

Das Prostatakarzinom wird nach Carter (Cotic et al., 2009) wie folgt eingeteilt:

- Sporadische Form: Keine weiteren Angehörigen sind an einem Prostatakarzinom erkrankt.
- Familiäre Form: Mindestens ein Familienangehöriger ist an einem Prostatakarzinom erkrankt.
- Hereditäre Form: Mindestens drei Betroffene in drei aufeinander folgenden Generationen, sowie drei Betroffene ersten Grades, sind erkrankt. Verwandte ersten Grades müssen zur Diagnose <50 Jahre gewesen sein.

Für diese Einteilung wird eine Familienanamnese erhoben.

Die Manifestationsstadien werden nach Mostofi (Mostofi et al., 1992) eingeteilt:

- Manifestes Karzinom: Primärtumor verursacht eine Klinik/klinisch diagnostizierbar
- Okkultes Karzinom: Metastasen verursachen eine Klinik/ klinisch diagnostizierbar
- Inzidenzielles Karzinom: Zufallsbefund bei Abklärung anderer Fragestellungen
- Latentes Karzinom: Obduktionsnebenbefund

1.3.8 Staging und Stadieneinteilung

Das Staging wird in der TNM-Klassifikation festgehalten. Diese gilt nur für die Adenokarzinome der Prostata. Als Grundlage der Stadieneinteilung dienen: (Bamberg et al., 2009)

- Klinische Untersuchung (DRU)
- Labor (v.a. PSA Wert im Serum)
- Radiologische, nuklearmedizinische Untersuchung: Sonografie (TRUS = transrektaler Ultraschall), Röntgen, MRT mit endorektaler Spule, Skelettszintigraphie, Computertomographie, etc.
- Histologische Aufarbeitung/ biochemische Bestimmungen des Feingewebes

Klinische Klassifikation	
T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund („incidental carcinoma“) in 5 % oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund („incidental carcinoma“) in mehr als 5 % des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z. B. wegen erhöhter PSA-Werte)
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt einen Lappen mit weniger als 50 %
T2b	Tumor befällt einen Lappen zu mehr als 50 %
T2c	Tumor befällt beide Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig)
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen z. B. Blasenhal, Sphinkter externus, Rektum und/oder Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert
Anmerkung: Ein Tumor, der in einem oder beiden Seitenlappen durch eine Nadelbiopsie gefunden wurde, aber nicht tastbar oder in der Bildgebung sichtbar ist, wird als T1c klassifiziert. Eine Invasion in den Apex oder die Kapsel der Prostata (aber nicht darüber hinaus) wird als T2 und nicht als T3 klassifiziert.	
N – Regionäre Lymphknotenmetastasen	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in regionären Lymphknoten
Anmerkung: Regionäre Lymphknoten sind die Lymphknoten des kleinen Beckens unterhalb der Bifurkation der Arteriae iliacae communes. Metastasen nicht über 0,2 cm können als pN1mi angegeben werden.	
M – Fernmetastasen	
MX	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nicht regionäre(r) Lymphknoten
M1b	Knochen
M1c	Andere Lokalisationen

Tabelle 14 **TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (UICC 2002)**

Als Stadieneinteilung kann entweder die Stadieneinteilung der AJCC 2002 (American Joint Committee on Cancer) oder die der UICC 2002 (International Union Against Cancer) herangezogen werden.

Stadium Prostatakarzinom	T	N	M	Grading
0	T1a	N0	M0	1
I	T1a	N0	M0	2-3
	T1b	N0	M0	Jedes G
	T1c	N0	M0	Jedes G
II	T2	N0	M0	Jedes G
III	T3	N0	M0	Jedes G
IV	T4	N0	M0	Jedes G
	Jedes T	N1	M0	Jedes G
	Jedes T	Jedes N	M1	Jedes G

Tabelle 15 **Stadieneinteilung Prostatakarzinom der AJCC 2002**

Stadium Prostatakarzinom	T	N	M	Grading
I	T1a	N0	M0	G1
II	T1a	N0	M0	G2-4
	T1b-2	N0	M0	G1-4
III	T3	N0	M0	G1-4
IV	T4	N0	M0	G1-4
	Jedes T	N1	M0	G1-4
	Jedes T	Jedes N	M1	G1-4

Tabelle 16 **Stadieneinteilung Prostatakarzinom der UICC 2002**. Beide Stadieneinteilungen werden gleichermaßen in der Literatur verwendet. Sie basieren auf dem TNM-System und definieren Stadien von I-IV. Das G-Stadium wird nach WHO in Grad 0-4 unterteilt. G1 geht mit hochdifferenziertem Gewebe und wird damit als niedrigmaligne eingestuft. G4 deutet auf niedrigdifferenziertes Gewebe hin und gilt damit als hochmaligne (Böcker et al., 2004).

1.3.9 Histologie und Grading

Das epitheliale Adenokarzinom ist das häufigste Prostatakarzinom. Es entsteht in den Acini und geht mit unterschiedlichen Subtypen einher.

Seltener kommen das spindelzelldifferenzierte Karzinom, das duktales Adenokarzinom, das urotheliale Karzinom, das plattenepitheliale Karzinom und das kleinzellige Karzinom, sowie Tumore des Stromas und Mesenchyms vor (Böcker et al., 2004).

Die Tumordifferenzierung erfolgt nach WHO in Grad 0-4. G1 geht mit hochdifferenziertem Gewebe und wird damit als niedrigmaligne eingestuft. G4 deutet auf niedrigdifferenziertes Gewebe hin und gilt damit als hochmaligne (Böcker et al., 2004).

Ein weiterer internationaler Grading Score des Prostatakarzinoms ist der Gleason-Score. Er unterteilt per Definition in Grad 1 Tumore (gut differenziert) bis Grad 5 Tumore (keine Differenzierung). Beurteilt wird das strukturelle Wachstumsmuster und die Differenzierung der Drüsenstruktur. Da in einem Tumor häufig mehrere Wachstumsmuster nebeneinander existieren, wird der größte und zweitgrößte Anteil, die das Karzinom ausmachen, per Punktezahl addiert (1 Punkt sehr gut differenziert, 5 Punkte sehr niedrig differenziert). Somit liegt der Gleason-Score im Range von 2 (1+1) bis 10 (5+5). Zytologische Malignitätskriterien spielen keine Rolle in dieser Bewertung (Böcker et al., 2004).

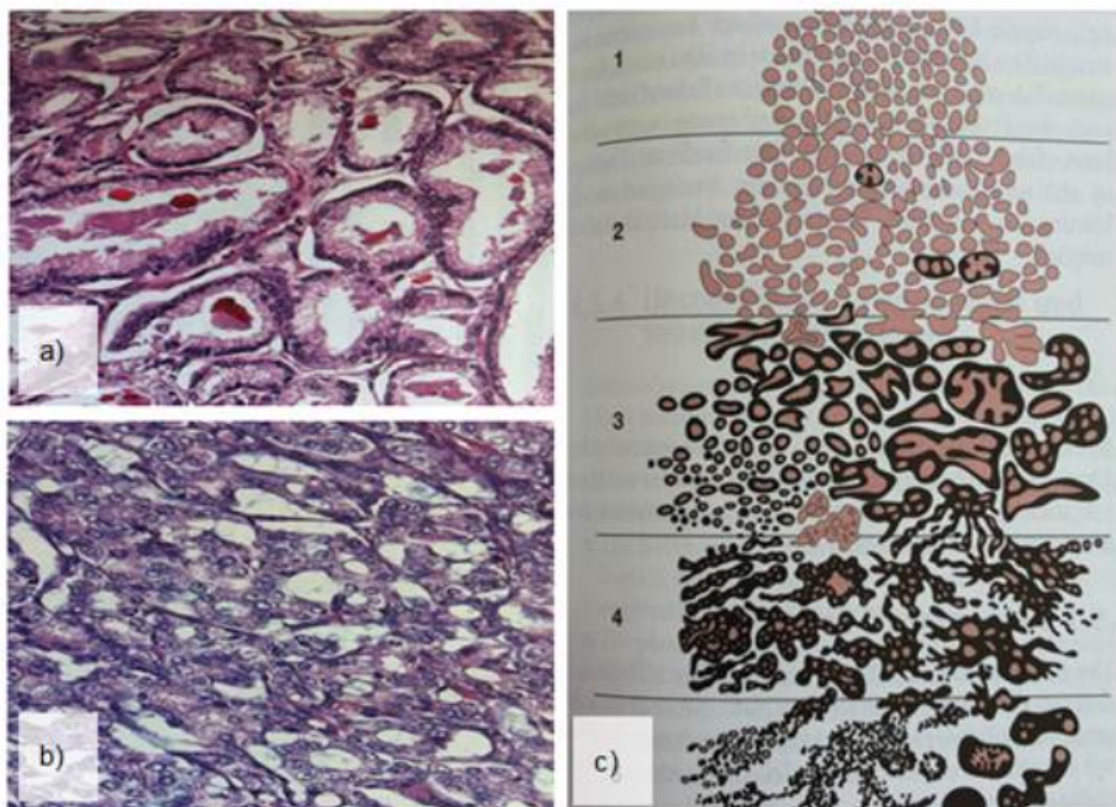


Abbildung 6 a-c **Histologischer Überblick des Gradings des Prostatakarzinoms** Pathologie S. 893-898 (Böcker et al., 2004) a) hochdifferenziertes Karzinom Gleason 2 Grundmuster (HE100fach vergrößert) b) hochmalignes niedrigdifferenziertes Karzinom Gleason 4 Grundmuster c) histologisches Grading nach Gleason schematische Zeichnung der Drüsenmuster

Im Jahre 2005 wurde die Bewertung des Scores modifiziert, da man in der Stanzbiopsie der peripheren Zone kein Muster der Gleason Kategorie 1 und 2 finden konnte (Heldpap et al., 2007).

Nun werden in Präparaten der Prostatektomie die beiden häufigsten Muster addiert und das schlechteste (tertiäre) Muster zusätzlich angegeben. Bei Stanzbiopsien werden das häufigste und das schlechteste Muster angegeben und addiert. Diese Modifikation soll zu einer besseren Vergleichbarkeit des Gleason-Score beider Präparate führen.

Nach der modifizierten Bewertung wird nun bei 3+4 als Gleason-Score 7a eine günstige Prognose, bei 4+3 mit dem Gleason-Score 7b eine intermediäre und ab Gleason 8 eine schlechte Prognose angenommen.

Bei der ursprünglichen Einteilung gilt der Übergang zwischen guter und schlechter Prognose bei Gleason 6 zu 7 (Helpap et al., 2007).

1.3.10 Therapie

Die Therapie wird nach der durch die Biopsie gesicherten Diagnose festgelegt. Die Therapieoptionen umfassen die kurativen Säulen der chirurgischen Intervention und Strahlentherapie sowie die palliativen Säulen der Hormon- und Chemotherapie. Alle Säulen können auch miteinander kombiniert werden. Zuweilen stellen „active surveillance“ (aktives Beobachten) und „watchfull waiting“ (Beobachten und Abwarten) geeignete Wege bei der Therapie des Prostatakarzinoms da.

Die Prostatektomie mit Lymphadenektomie ist die Operation beim Prostatakarzinom. Sie kann auf vier verschiedene Weisen durchgeführt werden: Als retropubische radikale Prostatektomie, als radikale perineale Prostatektomie, sowie minimal invasiv laparoskopisch und roboterassistiert. Im Stadium T1/2 gilt die Operation in Deutschland als die meist gewählte Therapiemethode. Hauptkomplikationen der Operation sind meist Blutungen, erektile Dysfunktion und Stressinkontinenz (Cotic et al., 2009).

Studien von Iversen aus dem Jahre 1995 (Iversen et al., 1995) zeigten, dass es fast keinen signifikanten Vorteil im operativen Vorgehen gegenüber dem „watchfull waiting“ gibt. Bill-Axelson zeigte im Jahre 2008 einen klaren Vorteil für die radikale Prostatektomie (Bill-Axelson A. et al., 2008). Die aktuelle Studienlage zeigt keinen klaren Vorteil für eine der Behandlungsoptionen (Bamberg et al., 2009).

Eine weitere Therapieoption ist die Bestrahlung. Die Strahlentherapie gliedert sich unter anderem in Brachytherapie (von innen) sowie Tomotherapie (perkutane Strahlentherapie von außen). Unerwünschte Nebenwirkungen sind vor allem Durchfall und Verdauungsstörungen, Miktionsbeschwerden und Inkontinenz sowie Impotenz (Cotic et al., 2009). Man unterscheidet zwischen primärer Strahlentherapie, alleiniger kurativer Therapie und adjuvanter Strahlentherapie z.B. postoperativ nach PSA Anstieg oder bei Metastasen. Strahlentherapie

kann auch palliativ, d.h. nur unterstützend, um Leiden zu verhindern oder zu lindern, erfolgen.

Die perkutane Strahlentherapie erfolgt mit Hilfe eines Linearbeschleunigers von außen durch die Haut. Hierbei werden vorher CT basiert Planungsvolumina angefertigt, um umliegende Strukturen zu schonen. Ausgefeilte Techniken, um immer ähnliche anatomische Verhältnisse zu erzeugen, werden angewandt. Es wird ein Ballon während der Bestrahlung ins Rektum eingelegt, um eine konstante rektale Füllung zu erlangen. Die Bestrahlung erfolgt täglich über mehrere Wochen ambulant. Bei der permanenten interstitiellen Brachytherapie werden sogenannte Seeds (kleine Strahlungsquellen) ultraschallgesteuert in die Prostata eingebracht und strahlen vor Ort permanent. Bei der temporären Afterload Therapie wird rektal eine lokale Strahlenquelle mehrmals in Kurznarkose eingeführt (Bamberg et al., 2009).

Zum Vergleich des Therapieerfolges der Prostatektomie versus Strahlentherapie gibt es keine validen prospektiven Studien (Bamberg et al., 2009).

Die Hormontherapie findet beim fortgeschrittenen und metastasierten Prostatakarzinom Anwendung. Sie kann palliativ alleine oder additiv in den Therapieplan einbezogen werden. Man versucht den testosteronsensiblen Tumorzellen mittels LHRH-Agonisten (Luteinisierungs-releasing-Hormon) die Androgene zu entziehen. Nachteil sind Wachstum durch Tumorklone, die Testosteron unabhängig wachsen sowie nicht hormonsensible Tumorzellen (Bamberg et al., 2009; Cotic et al., 2009).

Die Chemotherapie galt lange als wenig wirksam. Seit 2011 gibt es jedoch eine Phase-II Studie, die gute Erfolge unter einem Docetaxel basierenden Chemotherapeutikum zeigt (Mukherji et al., 2012).

1.3.11 Prognose

Wie bei vielen Tumorarten sind die wichtigsten prognostischen Faktoren die Differenzierung des Tumors, das klinische Tumorstadium und vermutlich der PSA Wert (Helpap et al., 2007). Bis Gleason-Score 7a, <cT2b und PSA<10ng/ml ist die Prognose als günstig einzustufen. Im Stadium cT2b, ab einem Gleason-Score 7b und einem PSA zwischen 10-20ng/ml liegt ein inter-

mediäres Risiko vor. Ab einem Gleason von 8 oder höher, cT2c und einem PSA über 20ng/ml muss von einer schlechten Prognose ausgegangen werden. Bei der ursprünglichen Einteilung gilt der Übergang zwischen guter und schlechter Prognose bei einem Gleason 6 zu 7 (Helpap et al., 2007).

Heutzutage werden über 50% der Prostatakarzinome dank suffizienter Screeningmethoden (rektale Palpation, PSA-Wert) in einem nicht metastasierten Stadium diagnostiziert.

Frühe Prostatakarzinome sind in ausgewählten Gruppen auch ohne spezifische Therapie mit den 5 bis 10 Jahres-Überlebensraten altersgleicher männlicher Bevölkerung vergleichbar. Behandelt man lokal (radikale Prostatektomie, perkutane oder interstitielle Radiotherapie) kann man die 10 bis 20 Jahres-Überlebensraten altersgleicher männlicher Bevölkerung ohne Prostatakarzinom erreichen (Roach et al., 1999).

Etwa 90% der Patienten, die mit radikaler Prostatektomie behandelt werden, leben noch 15 Jahre nach Diagnosestellung (Cotic et al., 2009).

1.4 Hitzeschockproteine

(Hsp = Hitzeschockprotein=Heat shock protein) Die Stressantwort von Zellen auf Hitze wurde in den 60er Jahren beschrieben (Ritossa, 1962). Alle Hitzeschockproteine tragen das Merkmal der Induzierbarkeit. Ihre Synthese wird durch endogene und exogene Stressfaktoren wie z.B. Hitze, oxidativen Stress, Einwirken von Chemikalien etc. induziert. Unter Zellstress kommt es dann zu einer vermehrten Bildung von Hitzeschockproteinen mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Physiologisch werden sie konstitutiv gebildet und haben unter anderem zur Aufgabe, die Faltung und den Transport von anderen Proteinen zu unterstützen und bei der Antigenpräsentation zu helfen. Deshalb werden sie auch als Chaperone (Faltungshelfer, Begleiter) bezeichnet (Csermely, 2001; Hartl et al., 2002).

Die heterogene Gruppe der Hitzeschockproteine umfasst Proteine im Bereich von ca. 20kDa bis ca. 110kDa. Soweit wissenschaftlich untersucht kommen sie von Archaeen und Bakterien bis zu Eukaryoten in hochkonservierter Form vor (Gunther et al., 1994).

Die Familie der Hitzeschockproteine wird entsprechend ihres Molekulargewichtes in kleine Hitzeschockproteine (small Hsp) Hsp20, Hsp40, Hsp60 (Chaperonine), Hsp70, Hsp90 und Hsp110 unterteilt (Morimoto, 1998; Parsell et al., 1994).

In Bezug auf Struktur und Expression unterscheiden sich die einzelnen Familienmitglieder sehr stark. Sie sind jedoch weitestgehend homolog innerhalb einer Familie (Jolly et al., 2002). In der Zelle sind die Hitzeschockproteine der unterschiedlichen HSP-Familien in den unterschiedlichsten Zellkompartimenten wie z.B. Zytosol, Zellkern, Mitochondrien, ER, zu finden. Beispielsweise befindet sich Hsc70 im Zytoplasma, Hsp27 im Zellkern, GRp78 im Endoplasmatischen Reticulum, Hsp70 in den Lysosomen und der äußeren Zellmembran (Kiang et al., 1998; Todryk et al., 2003).

In der großen Familie der Hitzeschockproteine nimmt das hauptstress-induzierbare Hsp70 eine besondere Rolle ein. Im Folgenden soll kurz auf ihre Struktur, Regulation und Funktion sowie auf die Rolle in der Immunologie und Tumorkologie eingegangen werden.

1.4.1 Hsp70 Struktur, Regulation, Aufbau und Funktion

Mitglieder der HSP70 Familie sind u.a. das stressinduzierbare Hsp70 mit 72kDa und das konstitutiv exprimierte Hsc70 mit 73kDa. Gunther beschreibt 1994 eine 85% homologe Aminosäuresequenz für beide Mitglieder (Gunther et al., 1994). Die Gruppe der HSP70 Proteine findet sich in nahezu allen Organismen und fast allen Kompartimenten der Zelle. Des Weiteren können sie auch ins extrazelluläre Milieu sezerniert werden. Es wurde gezeigt, dass Hsc70 bis zu 1% aller zytoplasmatischen Proteine ausmacht (Feige et al., 1994). Hsc70 ist nur schwach stressinduzierbar (3-6fach), wird jedoch konstitutiv sehr stark exprimiert. Im Vergleich dazu wird Hsp70 gering konstitutiv exprimiert, nach Einwirkung von Zellstress (mannigfaltige Zellstimulie) sehr stark induziert (bis zu 20 fach). HSPA1A gilt in der neueren Fachliteratur als Synonym für das stressinduzierbare Mitglied Hsp70 (Kampinga et al., 2009).

Wie bereits angesprochen befinden sich Vertreter der HSP70 Familie in nahezu allen Zellkompartimenten, sogar im Extrazellularraum. Die folgende Tabelle zeigt Schlüsselpublikationen zur Lokalisation von HSP70:

Lokalisation von Mitgliedern der HSP70 Familie	Referenzen
Intrazellularraum (ER, Zytosol, Mitochondrien, Nucleus)	(Morimoto, 1998) (Jolly et al., 2002) (I.G. Haas, 1994)
Zellmembran	(Multhoff et al., 1995) (Multhoff et al., 2011)
Extrazellularraum	(Feige et al., 1994) (Asea et al., 2000) (Vega et al., 2008) (Pockley et al., 2008)

Tabelle 17 Intra- und extrazelluläre Lokalisation von Mitgliedern der HSP70 Familie eigene Zusammenstellung siehe Referenzen

Die Expression von Hsp70 wird maßgeblich durch Transkriptionsfaktoren, die sogenannten Hitzeschockfaktoren (HSFs=heat shock factors), gesteuert. Es werden vier humane HSFs in der Literatur beschrieben. Am besten verstanden sind die Hitzeschockfaktoren HSF1 und HSF2. Bei gleichen molekularen Wirkmechanismen reagiert HSF1 auf Hitze und Chemikalien mit einer schnellen Aktivierung. HSF2 zeigt hingegen eine langsamere und weniger effektive Wirkung (Mathew et al., 2001).

Das induzierbare Hsp70 Protein besteht aus 641 Aminosäuren (AS) und besitzt zwei Hauptdomänen, die ATPase und die Substratbindedomäne. Die folgende Abbildung zeigt die ATPase Domäne im N-terminalen Teil von etwa 44kDa und die C-terminale Domäne von etwa 30kDa (Kiang et al., 1998; Nollen et al., 2002).

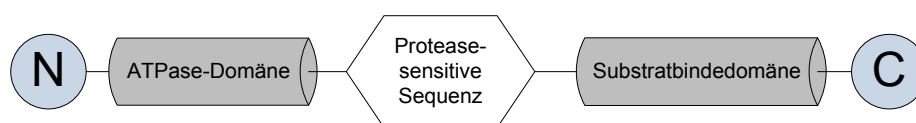


Abbildung 7 **schematische Struktur von Hsp70 Protein** eigene Zusammenstellung (Kiang et al., 1998; Nollen et al., 2002). Hsp70 mit N-terminaler ATPase Domäne und C-terminaler Substratbindedomäne. Zwischen den beiden Domänen befindet sich die proteasesensitive Sequenz.

Die Fähigkeit, andere Proteine zu binden, ist ATP abhängig. Somit reguliert unter anderem das ATP/ ADP Angebot die Hsp70 Funktion (Höhfeld et al., 1997). Die Substratbindefähigkeit sowie die ATPase Funktion ist von zusätzlichen Co-Chaperonen in der Zelle abhängig (Frydman et al., 1997; Höhfeld et al., 2001; Höhfeld et al., 1995).

Hsp70 besitzt vielseitige Aufgaben für intrazelluläre Prozesse. Es assistiert die korrekte Faltung von neusynthetisierten und von denaturierten Proteinen. Ebenfalls ist es am Abbau von Proteinen beteiligt (Hartl et al., 2002; Mathew et al., 1998).

Diverse Transportvorgänge innerhalb der Zelle sind von Mitgliedern der HSP70 Familie abhängig, wie beispielsweise der Transport von Proteinen in die Mitochondrien (Gupta et al., 2008; Stuart et al., 1994) oder in das ER (I. G. Haas, 1994; Nishikawa et al., 2005) oder in die Lysosomen (Mambula et al., 2006; Terlecky, 1994).

Mitglieder der HSP70 Familie besitzen mannigfaltige Funktionen, die durch Bindung anderer Cofaktoren in ihrer Funktion verstärkt werden. Die Proteinfaltung wird beispielsweise durch Bindung von Hsp70-interacting protein (Hip) und Hsp70-organizing protein (Hop) beeinflusst. Bindet der Carboxyl-terminus von Hsp70 interacting protein (CHIP), hat dies Einfluss auf den Proteinabbau durch Hsp70 (Hartl et al., 2002; Höhfeld et al., 1997; Meacham et al., 2001).

Eine weitere Schlüsselfunktion der Hsp70 Proteine ist die Beeinflussung der DNA-Replikation in der Zelle (Helmbrecht et al., 2000) und das Zellwachstum. Hsp70 interagiert mit Kontrollmolekülen des Zellzyklus, wie beispielsweise cyclinabhängige Kinasen oder mit dem Tumorsupressorprotein p53 (Zylicz et al., 2001).

Zusammenfassend ist Hsp70 in die komplexen Transport-, Synthese- und Steuerungsprozesse der Zelle eingebunden und wirkt sowohl regulierend als auch interagierend.

1.4.2 Rolle der HSP in der Onkologie und Immunologie

Hsp70 schützt Zellen vor Apoptose, die nach Stress Einwirkung eingeleitet werden. Tumorzellen haben im Gegensatz zu Normalzellen einen höheren Hsp70 Gehalt. Hohe Mengen von Hsp70 im Zytoplasma triggern anti-apoptotische Mechanismen und schützen somit die Tumorzelle (Gabai et al., 1998; Jaattela, 1999; Wei et al., 1995). Zum Schutz der Tumorzelle greift Hsp70 an verschiedenen Stellen des apoptotischen Signalweges ein, beispielsweise indem sie mit AIF (apoptosis inducing factor) interagieren (Jaattela, 1999; Jaattela et al., 1998; Ravagnan et al., 2001). So hat man beispielsweise die endogene Hsp70 Konzentration in Prostatakarzinom-Zellen gemessen. Sie belegten, dass Resistenzen gegenüber Medikamenten mit hohen Konzentrationen an HSp70 vergesellschaftet sind (Roigas et al., 1998). Des Weiteren weisen Tumorpatienten

und Plattenepithelkarzinome mit einer Hsp70 Membranexpression ein schlechteres Gesamtüberleben auf als Tumorpatienten mit Hsp70 Membran negativen Tumoren (Pfister et al., 2007).

Auch Tumore aus dem Kopf- und Hals- Bereich, Leukämien, Lungenkarzinome und kolorektale Karzinome weisen eine Hsp70 Membranexpression auf. Ein positiver Phänotyp korreliert auch hier mit einer negativen klinischen Prognose.

Die Arbeitsgruppe von Antonio De Maio zeigte, dass Tumorzellen Hsp70 auch ins extrazelluläre Milieu sezernieren können (De Maio, 1999, 2011). Im Folgenden soll ein Grundlagenverständnis über die Hsp70 Funktion auf Zell- und Rezeptorebene vermittelt werden, um den klinischen Kontext meiner Arbeit herzustellen.

Das angeborene Immunsystem kann durch Bindung von löslichem Hsp70 an Toll-Like-Rezeptoren (TLR2; TLR4) von Monozyten eine verstärkte Expression (Cluster of differentiation CD14 Signalweg) und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bewirken (Asea et al., 2000; Asea et al., 2002).

Hsp70 hat auch einen Effekt auf T-Zellen, antigenpräsentierende Zellen (APC) und natürliche Killerzellen (NK). Somit ist der Bezug zum adaptiven und angeborenen Immunsystem hergestellt. Hsp70 kann als Carriermolekül für antigene Peptide fungieren (Srivastava, 1994). Dieser Antigen-Hsp70-Komplex wird von virus- oder bakteriell befallenen Zellen und Tumorzellen in den extrazellulären Raum freigesetzt (Srivastava, 1994; Udono et al., 1994). Antigenpräsentierende Zellen (Makrophage, dendritische Zellen) nehmen den Komplex rezeptorvermittelt auf und präsentieren ihn nach intrazellulärem Processing (Cross Presentation) auf MHC-I-Molekülen. Hierdurch wird eine spezifische Immunantwort der CD8-positiven T-Zellen ausgelöst (Arnold-Schild et al., 1999; Basu et al., 2000; Schild et al., 1999; Singh-Jasuja et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe von Gabriele Multhoff konnte Hsp70 auf der Membran von Tumorzellen, nicht aber auf der Membran von gesunden Zellen nachweisen (Hantschel et al., 2000; Multhoff et al., 1995). Durch Hitzeschock und andere Stressfaktoren kann die Hsp70 Expression weiter verstärkt werden (Botzler et al., 1999). Die Menge des membrangebundenen Hsp70 korreliert positiv mit der Sensibilität gegenüber einer NK-Zell vermittelten Lyse (Botzler et al., 1996; Multhoff et al., 1997; Multhoff et al., 1995; Multhoff et al., 2000). Die NK-Zellen

docken an membrangebundenes Hsp70 an (Botzler et al., 1998) und entfalten ihre zytolytische Wirkung, über die Freisetzung von zytolytischen Enzymen wie z.B. Granzym B und Perforin. Durch Inkubation von NK-Zellen mit einem Hsp70-Peptid (14 AS lange Sequenz der SBD des Hsp70) und Interleukin 2 kann die lytische Aktivität gegen Hsp70 Membran positive Tumorzellen weiter gesteigert werden. Hsp70 Membran positive Tumore können aktiv Hsp70 in Vesikeln freisetzen (Botzler et al., 1998; Multhoff et al., 2001). Abschließend gilt zu diskutieren, ob der von mir eingesetzte R&D ELISA Hsp70 in der Lage ist, lösliches Hsp70 und vesikulär verpacktes Hsp70 im Serum nachzuweisen.

1.5 ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay)

ELISA steht für Enzym-linked Immunosorbant Assay. Es handelt sich hierbei um ein antikörperbasiertes quantitatives Nachweisverfahren von löslichen Faktoren.

1971 wurde die ELISA Technik zeitgleich durch zwei Arbeitsgruppen in Schweden entwickelt (Engvall et al., 1971; Van Weemen et al., 1971).

Mit dieser Messmethode können Proteine (z.B. Antikörper), Viren und andere niedermolekulare Verbindungen in löslicher Form quantitativ bestimmt werden. Die zu messenden Proteine können sowohl im Blutserum, Urin oder als Pufferlösung vorliegen und verarbeitet werden.

Für die ELISA Technik benötigt man Mikrotiterplatten und Antikörper die gegen das bestimmte Protein gerichtet sind. Der Antikörper wird auf die Platte aufgebracht, um das Protein zu binden. Mit Hilfe eines weiteren enzymgekoppelten Antikörpers, der gegen den Antikörper-Protein-Komplex gerichtet ist, wird eine Farbreaktion katalysiert. Dieser Farbumschlag kann daraufhin mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden. Durch die Erstellung einer Eichkurve kann der photometrisch bestimmte Wert quantitativ berechnet werden. Aufgrund der Schichtung zweier Antikörper wird der ELISA, auch Sandwich ELISA genannt. Es gibt auch einen Antikörper ELISA bei dem die zu messende Probe direkt an die Platte bindet (Goldsby et al., 2003; Löffler et al., 1998). Auf den genauen Aufbau des Hsp70 ELISA wird im Kapitel Material und Methoden eingegangen.

1.6 Intention und Zielsetzung

Laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten am Robert-Koch-Institut und der Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregisters in Deutschland erkrankten im Jahr 2008 469.800 Menschen in Deutschland neu an Krebs. Das sind etwa 43.000 Patienten mehr als 2006 registriert wurden. Schätzungen und Hochrechnungen zur Folge werden für das Jahr 2012 rund 486.000 neue Krebserkrankungen in Deutschland erwartet. Dafür wurden die Schätzungen für das Jahr 2008 auf Prognosen zur Bevölkerungsentwicklung des Jahres 2012 übertragen (GEKID, 2012; Robert Koch Institut Zentrum für Krebsregisterdaten Kaatsch, 2012). Diese Zahlen zeigen, dass die Notwendigkeit einer intensiven Forschung in der Onkologie besteht. Nur durch ein gutes Verstehen und Klassifizieren von Tumorerkrankungen kann eine individuelle, spezifische und damit hocheffiziente Tumorthherapie für den einzelnen Patienten eingeleitet werden. Um dies zu erreichen, müssen zeit- und kostensparende sowie patientenschonende Methoden entwickelt werden, um das Staging, Grading und Monitoring von Tumorerkrankungen zu verbessern.

Auf dem Gebiet der Tumorerkrankungen hat die Immunologie in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen und die Familie der Hitzeschockproteine wurde stark beforscht. Unter physiologischen Bedingungen sind die Hitzeschockproteine bei Prozessen der Proteinfaltung, des Proteintransports und der Proteindegradation beteiligt und schützen somit die Zelle bei Einflüssen wie Hitze, Stresseinwirkung, Anoxie und Chemikalien. Im Normalgewebe kommt Hsp70 nur im Zellinneren vor. Eine tumorspezifische Translokation von zytosolischem Hsp70 an die Zelloberflächen eröffnet neue diagnostische und therapeutische Optionen (Botzler et al., 1996; De Maio, 1999; Hantschel et al., 2000; Multhoff et al., 1995; Multhoff et al., 2000).

Ziel dieser Arbeit war es, eine Arbeitstechnik (Hsp70 Protein- und anti-Hsp70 Antikörper ELISA) zu etablieren, um Hsp70 Protein und anti-Hsp70 Antikörper im Blut messen zu können. Eine zweite Aufgabe bestand darin, Blutseren von Krebspatienten zu vermessen und sie mit denen Gesunder zu vergleichen. Schlussendlich wurden bereits etablierte Grading- und Staging Faktoren mit dem Hsp70 Protein und Antikörperlevel von Knochentumor, HNO-Tumor und Prostatatumor Kollektiven verglichen, um das Potential des Hsp70 Proteins als

potentiellen prognostischen Parameter in Blut von Tumorpatienten zu evaluieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Kit

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
Albumine, bovine serum, BSA, A 9647-100G	96%	Sigma, MO, USA
Albumine, bovine serum, BSA, A 7030-100G	98%	Sigma, MO, USA
Aqua ad injectabilia		Delta Select, Dreieich, D
EDTA	0,4 M	Invitrogen, NY, USA
Ethanol	70%	Apotheke der Klinikums rechts der Isar
Isopropanol		Apotheke der Klinikums rechts der Isar
Natriumcarbonat	m=105,99g/mol	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	99,5%, m=84,01g/mol	Merck, Darmstadt, D
Substrat Reagent Pack		R&D Systems, MN, USA
Sulfuric acid	99,99%	Sigma, MO, USA
Triton X-100		Sigma, MO, USA
Tween 20		Calbiochem, CA, USA

Tabelle 18 **Chemikalien und Reagenzien** Hsp70 Protein und Antikörper ELISA

Bezeichnung Kit	Hersteller
DuoSet IC Human/Mouse/Rat Total Hsp70	R&D Systems, MN, USA

Tabelle 19 Verwendetes **Kit Hsp70 Protein ELISA**

BSA, DuoSet Total Hsp70 und Substrat Reagent Pack wurden bei +4°C im Kühlschrank gelagert, die übrigen Reagenzien bei Raumtemperatur.

Kitlösungen	Herstellung
Diluent No.1	1%BSA in PBS; pH=7,2-7,4
Diluent No.4	1mM EDTA zusammen mit 0,5%Triton X-100 in PBS; pH=7,2-7,4
H ₂ SO ₄ 2N	5,6ml 100% H ₂ SO ₄ ad 100ml sterilem Wasser
Sodium Carbonat Puffer 0,1M	2,12g Na ₂ CO ₃ in 100ml sterilem Wasser gelöst (Lösung 1); 3,36g NaHCO ₃ in 200ml sterilem Wasser gelöst (Lösung 2); 8ml Lösung 1+ 17ml Lösung 2 + 25ml sterilem Wasser; steril filtriert; bei Raumtemperatur gelagert; pH=9,6
Substrat	Substrat Reagent Pack;1:1 Mixtur aus Color Reagent A (H ₂ O ₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidin)
PBS/T;Waschpuffer 0,05%	0,05%Tween®20 in PBS; pH=7,2-7,4

Tabelle 20 **Kitlösungen** und Herstellung Hsp70 Protein und Antikörper ELISA

2.1.2 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller	Verwendung
Phosphate Buffered Saline (PBS)	gem. Hersteller	Invitrogen, Paisley, UK	Standardpuffer

Tabelle 21 **Puffer** Hsp70 Protein und Antikörper ELISA

PBS wurde bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.3 Antikörper und Protein

Bezeichnung (Klon)	Ursprung	Isotyp	Konjugat	Firma
Anti Human	Goat	IgG	Peroxidase conjugated	Sigma, MO, USA
anti-Hsp70, AF1663	Rabbit	IgG		R&D Systems, MN, USA
Anti h/m/r Hsp70, MAB1663	Mouse	Monoclonal IgG 2a		R&D Systems, MN, USA
Hsp70 Protein 1.6mg/ml; recombinant human				Assay Designs,

Tabelle 22 **Antikörper und Protein** Hsp70 Protein und Antikörper ELISA

Alle Antikörper und das Protein wurden bei -20°C gelagert.

2.1.4 Plastikmaterial

Artikel	Hersteller
96Well EIA/RIA Plate	Costar, NZ, USA
96Well Nunc-immuno Plate	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Einmalhandschuhe S/M/L	Sempermed, Vienna, A
Einwegpipette 1ml/2ml/5ml/10ml/25ml/50ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einwegpipettenspitzen 10µl/200µl/300µl/1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Falcontubes 15ml	TPP
Falcontubes 50ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Flüssigkeitsreservoirs 200ml	Roth, Karlsruhe, D
Reaktionsgefäße 1,5ml/2ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
SealPlate	Roth, Karlsruhe, D

Tabelle 23 **Plastikmaterial** allgemeine Verwendungszwecke

2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
ELISAreader	BioTek, VT, USA
Incubator	Heraeus, Hanau, D
Pipette 10ml/100ml/1000ml	Eppendorf, Hamburg, D
Pipette 12-Kanal	BioHit Proline,
Pipette 8-Kanal	Roth, Karlsruhe, D
Tischzentrifugen	Heraeus, Hanau, D

Tabelle 24 **Geräte und Hersteller**

2.1.6 Blutserum Patienten und Probanden

Material	Ursprung	Serum wurde entnommen von	Projektzeitraum
Serum	Normalkollektiv	gesunden Probanden	11.04.2008-04.02.2010
Serum	Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen	Patientenmaterial des Universitätsklinikums rechts der Isar	29.03.2008-noch offen
Serum	Patienten mit Prostatakarzinom	Patientenmaterial des Universitätsklinikums rechts der Isar	16.11.2001-18.08.2003
Serum	Patienten mit Tumoren des Binde-/ Stützgewebes	Patientenmaterial des Universitätsklinikums rechts der Isar	16.02.2009-20.08.2010

Tabelle 25 **Patientenkollektive**

Für alle Kollektive genehmigte die Ethikkommission die Entnahme der Blutproben. Die Patienten wurden über die Probenentnahmen aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis. Den Patienten wurde im Rahmen einer präoperativen oder diagnostischen Biopsie Gewebe entnommen. Die histologischen Diagnosen stellte das Pathologische Institut des Klinikums rechts der Isar nach Erhalt des resezierten Gewebes bzw. einer Stanze oder Biopsie. Kollektivspezifisch wurde den Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung Serum und EDTA-Blut abgenommen. Die Verarbeitung erfolgte jeweils zeitnah nach der Entnahme. Die originale Patienteninformation, Datenschutzerklärung

und Patienteneinwilligung befinden sich im Anhang. Alle Daten wurden in Datenbanken dokumentiert (Microsoft Excel Versionen ab 2007).

2.1.7 Sonstiges Material und sonstige Geräte

Sonstiges Material und nicht erwähnte Geräte wurden über entsprechende Firmen, wie Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) oder Laborcenter bezogen und waren als „für wissenschaftliche Zwecke geeignet“ ausgewiesen.

Die Inkubationsschränke (Heraeus, Hanau, D) und Tischzentrifugen (Roth GmbH, Karlsruhe, D), sowie sämtliche Arbeitsgeräte wurden regelmäßig sterilisiert und gewartet.

2.2 Methoden

2.2.1 Materialgewinnung

Es wurden den Patienten/ Probanden eine oberflächlich gelegene Vene punktiert und Blut mit dem dafür vorgesehenen Entnahmesystem (Butterfly-Kanüle, Serumröhrchen siehe Abbildung 8) gewonnen. Dreimal 15ml Blutprobe wurden unmittelbar bei Raumtemperatur ins Labor transportiert.

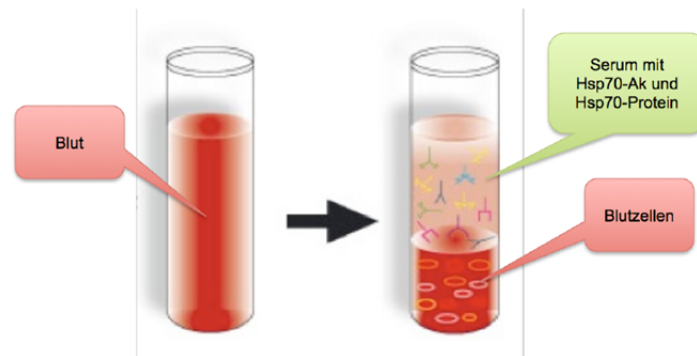


Quelle: http://www.apparategemeinschaft.de/07_r02.jpg

Abbildung 8 **Butterfly-Kanüle** zur venösen Blutentnahme (links), **Serumröhrchen** zur Gewinnung, Transport und Verarbeitung der Blutprobe (rechts)

2.2.2 Serumgewinnung und Protokoll

Für die Hsp70-Analyse des Blutes mittels ELISA verwendet man Blutserum, kurz Serum genannt. Hierbei handelt es sich um den flüssigen Anteil des Blutes, den man als Überstand nach Zentrifugieren der Blutprobe im Serumröhrchen erhält. Abhängig von der Lipidverunreinigung ist der Serumüberstand klar bis trübe. Bilirubin verursacht die gelbliche Färbung des Serums. Hsp70 Antikörper und Hsp70 Protein befinden sich in gelöster Form im Serum wie in der Abbildung 9 dargestellt.



Quelle: <http://212.227.241/imupro-at/media/images/content/blut-01.jpg>

Abbildung 9 **Zusammensetzung Blutserum**; Abbildung modifiziert Quelle siehe Abbildung

Direkt nach der Blutabnahme und Eintreffen im Labor wurden die Proben in 15ml Falconröhrchen oder Eppendorftubes überführt und bei 750g bei Raumtemperatur für 10min zentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde möglichst schnell suspendiert und in Aliquots von 100 bis 500µl in Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren.

Die Proben wurden gesammelt, die geplanten ELISA-Analysen wurden jeweils gesammelt analysiert, um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten.

2.2.3 Allgemeine Arbeitsanweisungen

Alle Arbeitsschritte wurden an der Sterilbank ausgeführt um mikrobielle Kontamination auszuschließen. Alle Materialien, die mit dem Patientenmaterial in Berührung kamen, wurden als potentiell infektiös eingestuft. Leserlich genaue Beschriftung der Probe mit ID, Menge, Inhalt, Datum und Kürzel des Wissenschaftlers wurde standardisiert durchgeführt.

2.2.4 ELISA

Die Abkürzung ELISA steht für **Enzym Linked Immunosorbent Assay**. Es handelt sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren (Assay), das sich enzymatische Farbreaktion zunutze macht, um Proteine in löslicher Form zu quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden ELISAs benutzt um Hsp70 Protein und Hsp70 Antikörper nachzuweisen.

2.2.4.1 Allgemeine Arbeitsanweisungen

Als Arbeitsutensilien werden bevorzugt Einmalartikel verwendet. Einmalhandschuhe wurden bei allen Schritten getragen.

Bedingt durch die Sensitivität des ELISAs wurde zu Beginn des Arbeitens der Arbeitsplatz von eventuellen Proteinspuren mit Ethanol gereinigt.

Für jede Inkubation wurde die Platte mit einem Sealer verschlossen und in eine Plastikbox mit Deckel gelegt. Die Inkubatortemperatur war standardmäßig auf 27°C festgelegt.



Abbildung 10 **ELISAplatten mit Sealer** verschlossen zum Inkubieren (links); **Inkubator mit Inkubationsbox** (rechts)

Chemikalien wurden auf ihre Haltbarkeit geprüft und Parameter wie beispielsweise der pH-Wert von Pufferlösungen regelmäßig überprüft (Bsp. Natrium Carbonat Puffer 0,1M pH=9,6). Alle Reagenzien und Verdünnungen siehe Materiallisten wurden bei Raumtemperatur bearbeitet und wenn nicht unverzüglich verwendet, danach auf Eis gestellt (4°C).

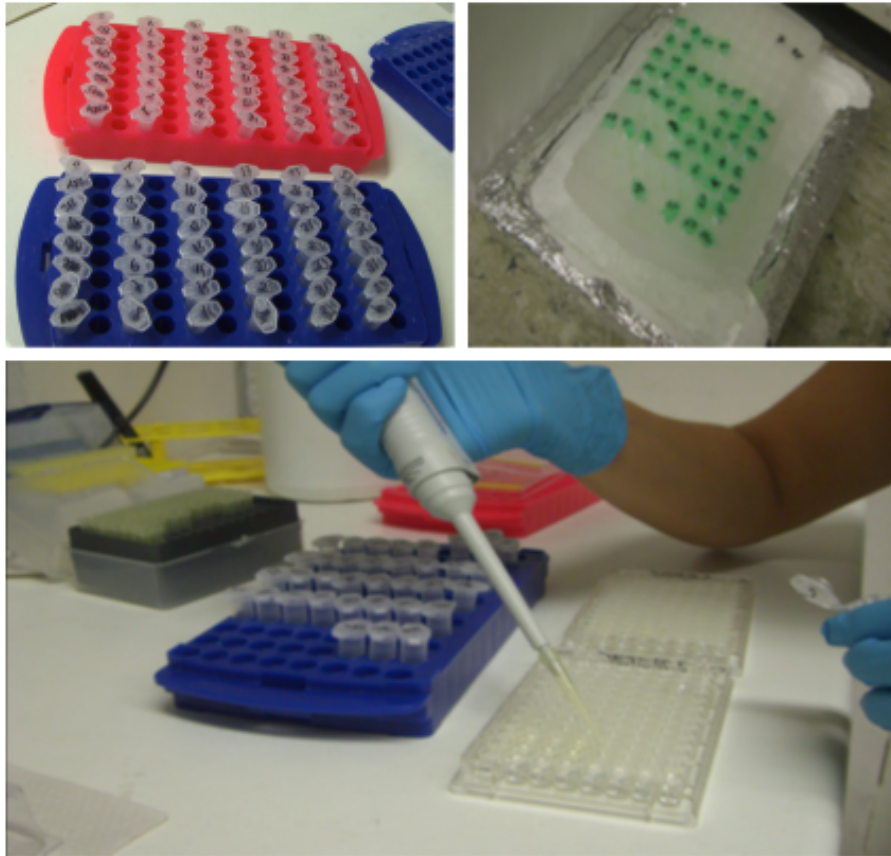


Abbildung 11 **Tubes zur Probenverdünnung** (oben links); **Proben verdünnt auf Eis** (oben rechts); **Pipettierschritt Proben** (unten)

Bevor die ELISAplatten mittels ELISAreader ausgelesen werden, müssen alle enzymatischen Reaktionen mit 2N Schwefelsäure gestoppt werden. Dies ist optisch durch einen Farbumschlag von blau auf gelb gekennzeichnet. Dieser Stoppvorgang ist äquivalent für den Hsp70 Protein ELISA und Hsp70 Ak ELISA.

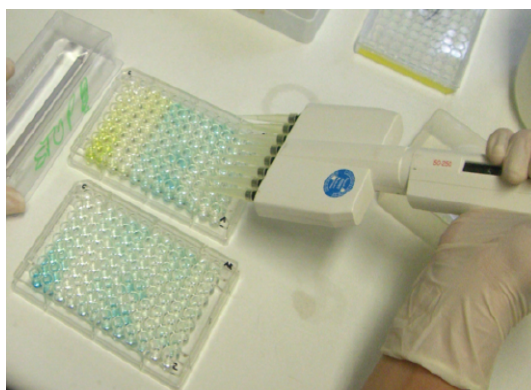


Abbildung 12 **Pipettierschritt Stoppvorgang** mit 2N Schwefelsäure

Final werden die Platten mithilfe eines ELISReaders (Photometer) der Firma BioTek EL 808 ausgelesen. Durch die Erstellung einer Eichkurve kann der photometrisch bestimmte Wert quantitativ berechnet werden. Die Quantifizierung erfolgt aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen. Statistische Auswertungen wurden mit Microsoft Excel oder IBM SPSS-Statistics® angefertigt.

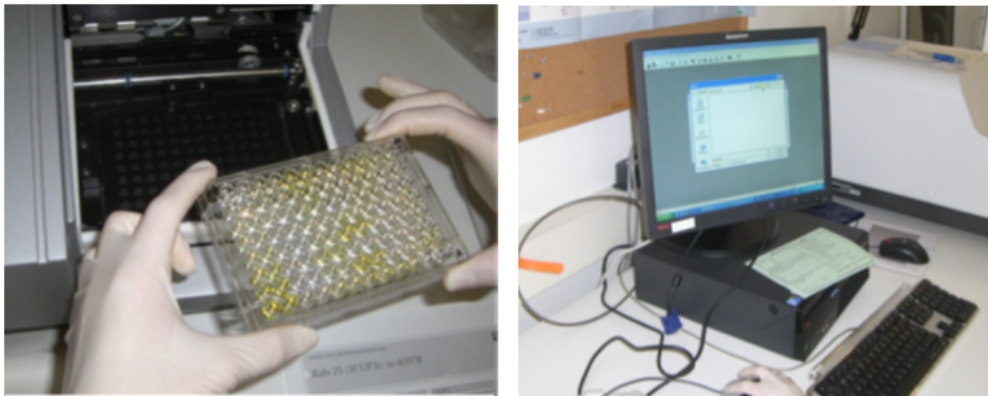


Abbildung 13 **ELISReader** mit einzusetzender ELISAPlatte (oben) und dazugehöriger **Computer** (unten)

2.2.4.2 Protokoll Hsp70 Antikörper ELISA

Für die Messung des Hsp70 Ak habe ich einen eigenen ELISA entwickelt.

Folgende Schritte wurden nacheinander durchgeführt:

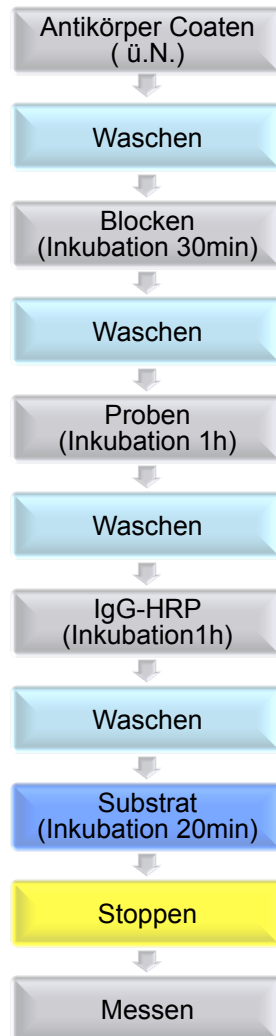


Abbildung 14 Arbeitsschritte des Hsp70 Antikörper ELISAs eigene Zusammenstellung

Die Arbeitsschritte des Hsp70 Ak ELISA (siehe Abbildung 14) werden im Folgenden näher erläutert. Die genaue Beschreibung (Firma/ Konzentration/ Herstellung) der Chemikalien kann dem Teil 2.1 Material entnommen werden.

Rekombinantes humanes Hsp70 wurde 1:2000 in Carbonatpuffer (0,1M; pH = 9,6) verdünnt. 96-Well-Platten wurden mit 100µl dieser Lösung pro Well ge-coated und ü.N. bei +4°C im Kühlschrank inkubiert.

Nach 12-24h wurde die Platte dreimal mit dem Waschpuffer PBS/ T 0,05% (250µl/Well) gewaschen. Geblockt wurde mit 150µl/Well Diluent No.1 (1%BSA in PBS) für 30 min im Inkubator bei 27°C. Die Serumproben wurden 1:100 in PBS bei 4°C vorverdünnt. Der Standard Hsp70-Ak wurde ebenfalls bei 4°C vorverdünnt (1:800; 1:400;...1:12,5). Die Platten wurden erneut dreimal mit dem Waschpuffer PBS/ T 0,05% (250µl/Well) gewaschen. Dann wurden 100µl/Well der 1:100 verdünnten Probe aufgetragen und daraufhin die Platten für 1h im Inkubator bei 27°C platziert. Abermals wurde dreimal mit dem Waschpuffer PBS/ T 0,05% (250µl/Well) gewaschen. IgG-HRP (=horseradish peroxidase) wurde 1:10.000 in PBS/ T verdünnt und 100µl/Well aufgetragen. Erneut wurde für 1h im Inkubator bei 27°C inkubiert. Ein letztes Mal wurde dreimal mit dem Waschpuffer PBS/ T 0,05% (250µl/Well) gewaschen. Daraufhin wurde 100µl/Well Substrat Solution aufgetragen und die Platten für 20min in den Inkubator gestellt. Die Farbreaktion wurde mit 2N Schwefelsäure (50µl/Well) gestoppt. Die Samples wurden bei der Wellenlängen 450nm und gegen die Referenzwellenlänge 570nm am ELISAreader gemessen.

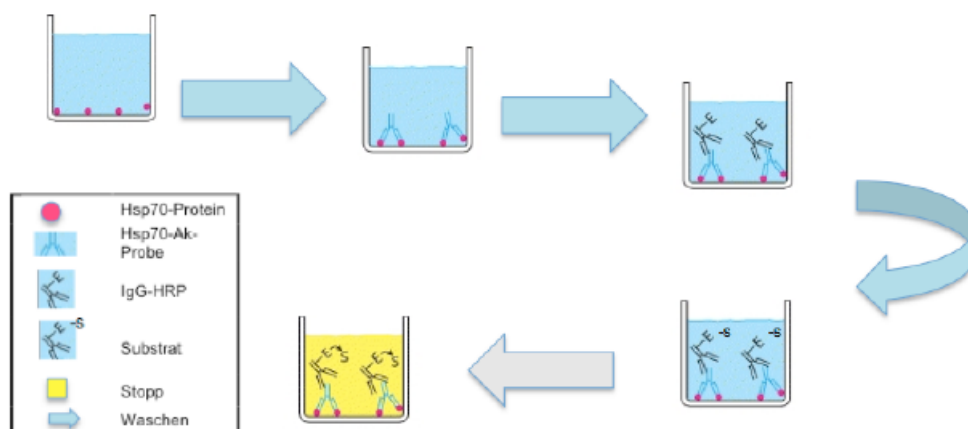


Abbildung 15 **Übersicht Hsp70 Ak ELISA** modifizierte Abbildung
(<http://exploreable.files.wordpress.com/2011/05/ch4f35.jpg>)

Zusammenfassend sind in Abbildung 15 die Kernschritte des Hsp70 Ak ELISA graphisch dargestellt.

2.2.4.3 Protokoll Hsp70 Protein ELISA

Für die Hsp70 Proteinmessung wurde das DueSet IC Human/Mouse/Rat Total Hsp70 von der Firma R&D Systems, MN, USA verwendet. Es wurden die Anweisungen des Kits befolgt. Eine Kopie der Kitanweisung befindet sich im Anhang. Zur Messung von Serumproben wurden folgende Modifikationen im Test vorgenommen :

- 1) Standardisieren der Inkubationstemperatur bei 27°C anstelle von Raumtemperatur.
- 2) Standardisieren der Inkubationsboxen und Verwenden von Sealern bei allen Inkubationsschritten.
- 3) Zur Kontrolle wird immer eine Hsp70 Protein (siehe auch 2.1.3) Probe als Vergleichswert mit analysieren, in der Konzentration 2500pg/ml.
- 4) Benutzung der gleichen Messpipetten bei jedem Versuch (siehe auch 2.1.4).
Sowie benutzung der gleichen 96 Well Platten der Firma Costar. (siehe auch 2.1.4)

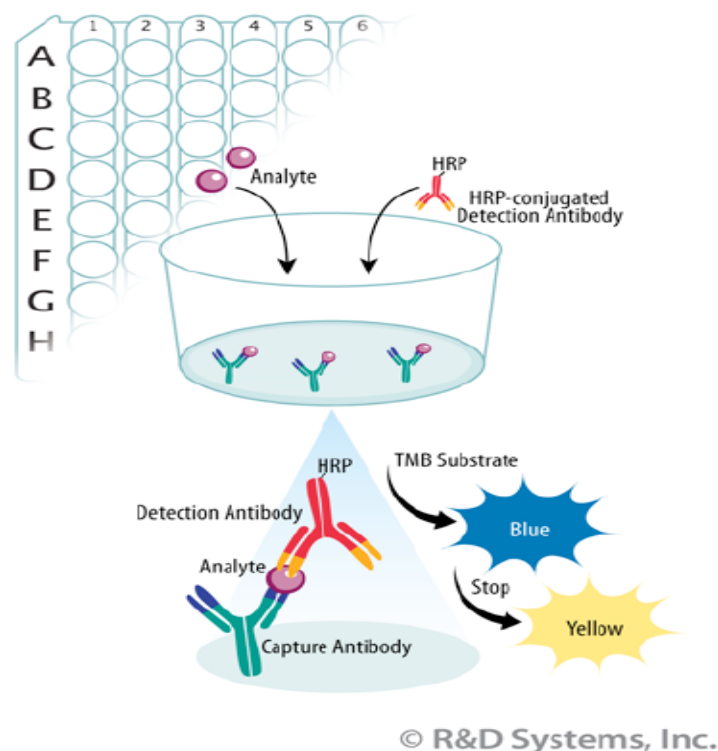


Abbildung 16 **Übersicht Hsp70 Protein ELISA** (Quelle R&D Sytem) Oben links angeschnitten dargestellt, die 96-Well-Platte. Die lilafarbenen Analyte stellen das zu analysierende Protein

dar. Dieses bindet an den, auf dem Boden der Platte befindlichen, grün/blauen Antikörper (Capture Antibody). Um die enzymatische Farbreaktion zu nutzen, wird ein Antikörper (Detection/rot) benötigt, der mit HRP (=horseradish peroxidase) konjugiert wurde. Mit Hilfe dieser Reaktion kann farb kodiert, durch das Substrat (blue), der Hsp70 Proteingehalt dargestellt werden. Nach 20 min wird die enzymatische Reaktion mit 2N Schwefelsäure gestoppt (yellow) und die Platte am Reader ausgelesen.

Folgende Arbeitsschritte wurden nacheinander ausgeführt:

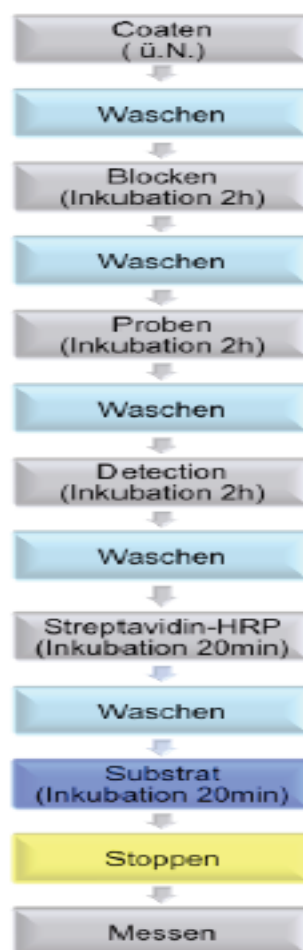


Abbildung 17 **Arbeitsschritte Hsp70 Protein ELISA** eigene Zusammenstellung

Im Folgenden werden diese Arbeitsschritte genauer erläutert. Die genaue Beschreibung (Firma/Konzentration/Herstellung) der Chemikalien kann dem Teil 2.1 Material entnommen werden. Zum Coaten wurde der Capture-Antikörper

2,0µg/ml in PBS verdünnt, 100µl/Well wurden ü.N. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 12-24h wurde zuerst dreimal mit 300µl Waschpuffer gewaschen. Geblockt wurde mit Diluent No.1 250µl/Well dann wurden die Platten für 2h im Inkubator bei 27°C platziert. Proben und Standard wurden in Diluent No.4 (0,5% Triton X-100 und 1mM EDTA in PBS) verdünnt. Die Verdünnung wird so eingestellt, dass die Probe in einem linearen Normbereich der Standardkurve liegt. Der höchste Standard war 10.000pg/ml und wurde in sieben Schritten herunter verdünnt. 100µl/Well wurden aufgetragen und für 2h in den Inkubator 27°C gestellt. Abermals wurde dreimal mit 300µl Waschpuffer gewaschen. Der Detection-Antikörper wurde in die Konzentration 100ng/ml in Diluent No.1 (1%BSA in PBS) gebracht. 100µl/Well wurden für weitere 2h im Inkubator 27°C belassen. Abermals wurde dreimal mit 300µl Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurde 1,0ml Streptavidin in Diluent No.1 verdünnt und 100µl/Well für 20 min in den Inkubator 27°C gestellt. Abermals wurde dreimal mit 300µl Waschpuffer gewaschen, daraufhin wurden 100µl/Well der Substrat Solution für 20 min im Inkubator bei 27°C gelagert. Die Farbreaktion wurde mit 2N Schwefelsäure (50µl/Well) gestoppt. Danach werden die Samples bei der Wellenlängen 450nm und gegen die Referenzwellenlänge 570nm am ELISAreader gemessen.

Die oben aufgeführten Arbeitsschritte sind in Abbildung nochmals grafisch dargestellt.

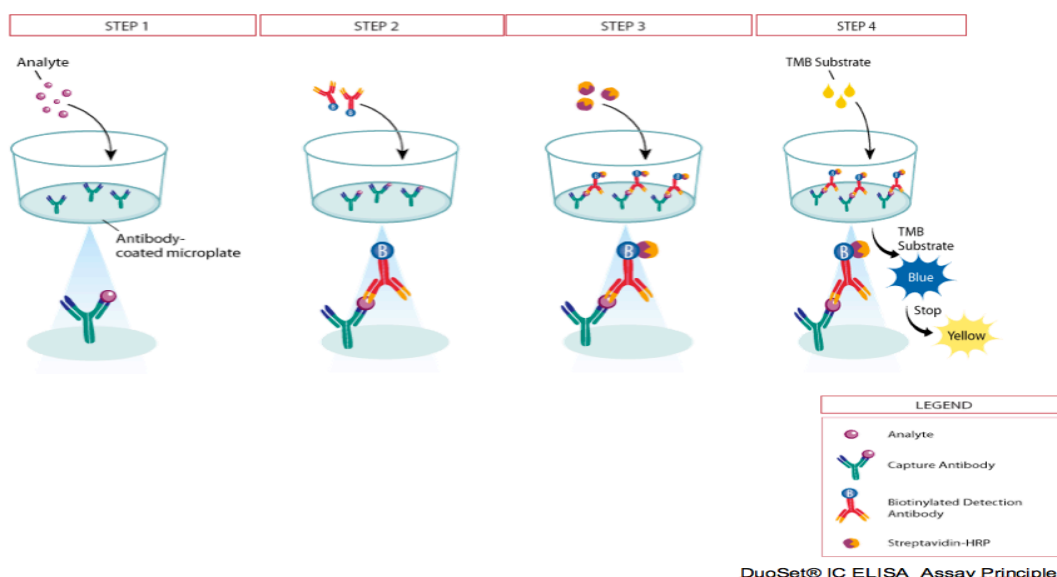


Abbildung 18 Arbeitsschritte Hsp70 Protein ELISA modifizierte Abbildung R&D Systems

2.2.5 Standard Laborparameter

Bei allen im Ergebnisteil aufgeführten Laborparametern handelt es sich um Standard Parameter des klinischen Alltags. Sie wurden vom Institut für klinische Chemie des Klinikums rechts der Isar erhoben. Sie unterliegen dem deutschen Standard für Labordiagnostik.

2.2.6 Bildbearbeitung

Bildaufnahmen wurden mit einer Digitalkamera von Casio gemacht. Anschließend auf einen PC übertragen und mit Adobe Photoshop oder Paint bearbeitet. Graphen und Schaubilder wurden mit Microsoft Excel, Sigma Plot oder IBM SPSS-Statistics® hergestellt.

2.2.7 Statistik

Die Fehlerbalken resultieren aus dem SEM (Standardfehler), die Quantifizierung erfolgt aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen, zu meist jedoch mehr. Statistische Auswertungen wurden mit Microsoft Excel oder IBM SPSS-Statistics® angefertigt.

Anderweitige statistische Auswertungen wurden mit Hilfe des Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie am Klinikum Rdl der Technischen Universität München erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung ELISA

Im Zeitraum 2008-2009 wurde in unterschiedlichen Versuchsanordnungen des ELISAs (Hsp70-Ak & Hsp70-Protein) versucht, die bestmöglichen Versuchsanordnungen zu ermitteln. Folgende Parameter wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen (n=3) untersucht.

- *Konzentration und Art des Antikörpers (Ak)* beim Hsp70-Ak-ELISA (MAB 1663 1:2.000; AF 16631:5.000; 1:2.000; 1:2.500, anti rabbit IgG 1:10.000, anti mouse IgG1:10.000
>Siehe hierzu Einblick Etablierung Hsp70-Ak-ELISA 3.1.1.
- *Konzentration des Waschpuffers* (Tween®20 in PBS 0,00%, 0,05% und 1,00%)
>Zu starkes Waschen führte zu Abschwächung in der zu messenden OD (optischen Dichte).
- *Verschiedene Reinheitsgrade BSA* (siehe 2.1.1 A 9647- 96%; A 7030- 98%)
>Je unreiner das BSA desto höher waren beim Blockvorgang die unspezifischen Bindungen und desto mehr Störeinflüsse auf den ELISA konnten festgestellt werden (bis zu 120% Abweichung um Blank).
- *Typ/ Firma der verwendeten Platte* (siehe 2.1.3 Costar EIA/RIA Platten; Nunc immuno Plate Thermo Fisher Scientific)
>Verschiedene Bindungsaffinitäten der Platte konnten detektiert werden, deshalb wurde schlussendlich immer dieselbe Firma verwendet (Costar). Hier konnte die beste Bindungsaffinität zum Erlangen der OD im Normalrange reproduziert werden.
- *Verwendung der Sealer bei Inkubationsvorgängen*
>Verdunstungsvorgänge während der Inkubationszeit konnten so minimiert werden.

- *Art der Inkubation* (Ort, Zeit, Temperatur, Box)
 - > Die Raumtemperatur stellte sich als nicht zuverlässige Größe dar, deshalb wurde in einem Inkubator bei 27°C Standard inkubiert. Eine lichtdichte Box wurde gewählt, um Lichtinterferenzen zu vermeiden.
- *Pipettieren des Versuchs* durch vier verschiedene Labormitarbeiter
 - > Unterschiedlich genaues Arbeiten und Differenzen in der Schnelligkeit der Verarbeitung und der Erfahrung erbrachten verschiedene Ergebnisse bei gleichen Versuchsbedingungen am gleichen Tag.
- *Pipettieren des Versuchs mit verschieden Eppendorfpipetten* (Einzel-/Mehrfacheppendorfpipetten siehe 2.1.1)
 - > Eppendorf Pipetten sollten möglichst neu sein und nur für ELISA Technik angewendet werden, da bereits geringe Verunreinigungen des Filters den ELISA stören.
- *Evaluieren einer immer mitzumessenden Vergleichsprobe* für den Hsp70-Protein-ELISA : Hsp70 Protein 1,6mg/ml recombinant human von Assay Design >2.500pg/ml
 - > Die Vergleichbarkeit der Testergebnisse untereinander steigt und grobe sowie systematische Messfehler können so schnell erkannt werden.
- *Verdünnungskonzentration der Proben*
 - > In Vorversuchen wurde der Range der Proben evaluiert, damit schlussendlich die Eichkurve auf unsere Proben angepasst werden konnte.
- *Auftauverfahren der Proben*
 - > Das Abweichen vom Herstellungsprotokoll für Serum und zu warmes Lagern von Proben konnten oftmals mit einem Ausreißerwert in Zusammenhang gebracht werden.

Im Folgenden möchte ich nun anhand ausgewählter Beispiele einen kurzen Einblick in die Entwicklung geben. Ein vollständiges Darlegen des Datenmaterials ist aufgrund des Datenvolumens nicht möglich. Das letztendlich verwendete Protokoll findet man unter dem Kapitel Material und Methoden. Wenn keine

Konzentrationen oder Inkubationszeiten o.ä. angegeben sind, gilt immer die Angabe aus dem Kapitel Material und Methoden.

3.1.1 Einblick Etablierung Hsp70 Ak ELISA

2008-09-02

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	BSA	Hsp 70 protein 100ng/ml	AB	AB	0	0
B	25ng/ml 1:32 37,5+1162, 5	25ng/ml 1:32 37,5+1162, 5	25ng/ml 1:32 37,5+1162, 5	25ng/ml 1:32 37,5+1162, 5	25ng/ml 1:32 37,5+1162, 5	25ng/ml 1:32 37,5+1162, 5	BSA	Hsp 70 protein 100ng/ml	GM	GM	25ng/ml 1:32 37,5+1162, 5	25ng/ml 1:32 37,5+1162, 5
C	50ng/ml 1:16 75+1125	50ng/ml 1:16 75+1125	50ng/ml 1:16 75+1125	50ng/ml 1:16 75+1125	50ng/ml 1:16 75+1125	50ng/ml 1:16 75+1125	BSA	Hsp 70 protein 100ng/ml	AL	AL	50ng/ml 1:16 75+1125	50ng/ml 1:16 75+1125
D	100ng/ml 1:8 150+1050	100ng/ml 1:8 150+1050	100ng/ml 1:8 150+1050	100ng/ml 1:8 150+1050	100ng/ml 1:8 150+1050	100ng/ml 1:8 150+1050	BSA	Hsp 70 protein 100ng/ml	CB	CB	100ng/ml 1:8 150+1050	100ng/ml 1:8 150+1050
E	200ng/ml 1:4 300+900	200ng/ml 1:4 300+900	200ng/ml 1:4 300+900	200ng/ml 1:4 300+900	200ng/ml 1:4 300+900	200ng/ml 1:4 300+900	BSA	Hsp 70 protein 100ng/ml			200ng/ml 1:4 300+900	200ng/ml 1:4 300+900
F	400ng/ml 1:2 600+600	400ng/ml 1:2 600+600	400ng/ml 1:2 600+600	400ng/ml 1:2 600+600	400ng/ml 1:2 600+600	400ng/ml 1:2 600+600	BSA	Hsp 70 protein 100ng/ml			400ng/ml 1:2 600+600	400ng/ml 1:2 600+600
G	800ng/ml 1:1	800ng/ml 1:1	800ng/ml 1:1	800ng/ml 1:1	800ng/ml 1:1	800ng/ml 1:1	BSA	Hsp 70 protein 100ng/ml			800ng/ml 1:1	800ng/ml 1:1
H	blank	blank	blank	blank	blank	blank	BSA	Hsp 70 protein 100ng/ml			blank	blank
	MAB1663 1:2000 AF1663 1:5000 anti rabbit IgG 1:10000		MAB1663 1:2000 AF1663 1:2000 anti rabbit IgG1:10000		AF1663 1:2500 cmHsp70.1 1:1000 anti mouse IgG1:2000							

Abbildung 19 Beispiel Versuchslayout Hsp70 Ak ELISA 2008. Das Layout zeigt die Versuchsanordnung einer der ersten 96 Well Platten (Ak-Messung). Die Reihen wurden mit A-H beschriftet, die Spalten mit 1-12. In der Spalte 1-6 wurde jeweils Hsp70 AK in der beschriebenen Konzentration aufgetragen. Unter der Tabelle lässt sich die in diesem Bereich variierende Konzentration des primären und sekundären Ak ablesen. In Spalte 7 wurde durchgängig BSA aufgetragen, in Spalte 8 Hsp70 Protein. Spalte 9/10 wurde für humane Proben verplant. In die 11 und 12 Spalte wurde wiederum die Standardkurve aufgetragen. Alle nicht beschriebenen Konzentrationen und Angaben beziehen sich auf das Standardprotokoll.

Durch das Variieren der Antikörper Typen (MAB1663; AF 1663; cmHsp70.1) und deren Konzentrationen, bei gleichbleibenden Standardkurven, konnte ausgetestet werden, welche Kombination am besten geeignet ist, dies wurde anhand einer Eichkurve und einer definierten Menge Antikörper definiert. Die BSA-Kontroll-Spalte wurde aufgetragen, um zu sehen, ob es zu unspezifischen, nicht gewünschten Proteinbindungen kommt. BSA wird im Versuch als Puffer

an verschiedenen Schritten der beiden ELISAs angewendet. Hier wurde durch Ausprobieren verschiedener Reinheitsstufen des BSA (80-99% Reinheitsgrad) am Ende eine OD von Null erreicht (sprich keine Beeinflussung des Hsp70 Ak-Protein Ergebnis im Serum). Die Ergebnisse konnten für den Hsp70 Protein ELISA ebenfalls reproduziert werden. Es wurde BSA der Reinheitsstufe 99% fortan in beiden ELISAs verwendet. Die in Spalte 9 und 10 aufgetragenen humanen Testproben gesunder und kranker Spender zeigten uns erste Ergebnisse realer Proben. Nach Etablierung des Protokolls wurden hier diverse Verdünnungsreihen angefertigt um bei immer gleich bleibender Verdünnung der Probe, mit unserem Ergebnis immer im optimalen Bereich der Messkurve zu liegen. Das mehrfache Auftragen des Blank (Pufferlösung ohne Proteingehalt) sollte zeigen, ob es einerseits zu unspezifischen Proteinbindungen und ob es andererseits zu Verunreinigung durch Pipettieren innerhalb der Platte kommt. Jede Probe und jede Standardkurve wurden immer neu und in einfacher Ausführung angefertigt. So konnte gezeigt werden, dass bereits die standardmäßige Pipettiergenauigkeit zu größeren Messbeeinträchtigungen führt und Folgefehler so verhindert werden.

Zuletzt konnte folgende Eichkurve erzielt werden:

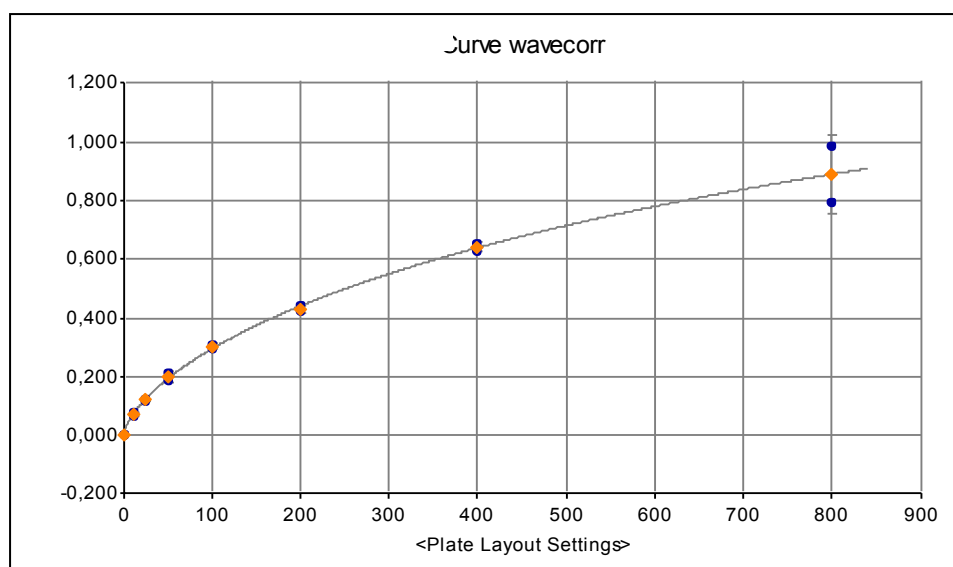


Abbildung 20 Beispiel einer **Hsp70 Ak ELISA Kurve nach Optimierung** x-Achse Werte der Standardkurve , y-Achse OD. Die Curve Fitting Results (Berechnungsparameter) diese Kurve sind $R^2=0,999$. Es wurde die Formel $(Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D)$ mit $A=0,00453$, $B=0,833$ und $R=0,999$ für die Kurv wave correction benutzt.

Die Abbildung zeigt eine optimierte Standardkurve. Das Bestimmtheitsmaß sollte im Optimalfall $R^2 = 1$ sein. Ich konnte erreichen, dass die Messung nach Optimierung immer in einem Bereich von 0,8-1,3 OD als Maximum Wert liegt. Nur wenn die Standardkurven in einem ähnlichen Bereich liegen, können Proben miteinander verglichen werden. Der Messbereich von ca. 1 OD hat sich sowohl vom Messverhalten als auch von der Lage der Konzentrationen der Proben als optimaler Bereich herauskristallisiert.

Die Tabelle zeigt erste Messergebnisse humaner Proben, errechnet aus der oben abgebildeten Standardkurve.

Probe	Well	Count	Mean Hsp70 Ak (ng/ml)	SD Abw.	SD Abw. (%)
Test 1.1	G3/G4	2	25,1	0,3	1,3
Test 1.2	H3/H4	2	24,4	2,0	8,2
Test 1.3	A5/A6	2	26,4	0,0	0,0
Test 1.4	B5/B6	2	38,3	0,0	0,0
Test 2.1	C5/C6	2	58,0	4,2	7,2
Test 2.1	D5/D6	2	59,4	6,1	10,3
Test 2.2	E5/E6	2	41,7	0,8	1,9
Test 2.2	F5/F6	2	37,2	3,1	8,3
Test 2.3	G5/G6	2	43,8	4,5	10,4
Test 2.3	H5/H6	2	45,5	0,4	0,9

Tabelle 26 Beispiel einer **Testmessung humaner Proben Hsp70 Ak**. Unter Probe sind die Nummern der beiden Testpersonen aufgelistet. Unter Well ist die Lage auf der ELISA-Platte gekennzeichnet. Count 2 bedeutet, dass jeweils die Probe in Duplikaten gemessen wurde. Unter Mean ist der Wert der Ak Konzentration in ng/ml angegeben. Die letzten beiden Spalten bieten eine Übersicht über die Standardabweichung sowie die Standardabweichung in %.

Der Testperson 1 wurde zu 4 Zeitpunkten Blut entnommen, jeweils mit 4 Wochen Abstand. Das Blut wurde in Aliquots eingefroren und gemessen, wie bereits beschrieben. Die Ergebnisse zeigen einen gleichbleibenden Spiegel über die ersten drei Abnahmen, danach einen 52%igen Anstieg der Konzentration an Hsp70 Ak. Testperson 2 wurde an drei Zeitpunkten Blut entnommen und gemessen. Zu Qualitätskontrolle wurden die Proben jeweils doppelt auf die ELI-

SAplatte aufgetragen. Das Hsp70 Ak Level der Testperson 2 liegt immer höher und zeigt allenfalls einen leichten Abfall der Konzentration über die Messungen hinweg. In diesem Beispiel liegt der Range der Standardabweichung in % (SEM%) im Bereich von 0,0-10,4%. Diese Werte sind repräsentativ für alle Messungen über alle Jahre hinweg. Bei der Auswertung wurde dieser Standard immer eingehalten und im Zweifelsfalle wurden die Proben erneut gemessen.

3.1.2 Einblick Etablierung Hsp70 Protein ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB	AB
B	156	156	10000	BLK	AB	KH	KH	0	10000	156	156	AB
C	312,5	312,5	5000	BLK	AB	KH	KH	0	5000	312,5	312,5	AB
D	625	625	2500	0	AB	KH	KH	0	2500	625	625	AB
E	1250	1250	1250	0	AB	KH	KH	0	1250	1250	1250	AB
F	2500	2500	625	0	AB	KH	KH	0	625	2500	2500	AB
G	5000	5000	312,5	0	AB	KH	KH	0	312,5	5000	5000	AB
H	10000	10000	156	0	AB	0	0	0	156	10000	10000	AB

Tabelle 27 Beispiel **Versuchslayout Hsp70 Protein ELISA 31-10-2008**. Das Layout zeigt die Versuchsanordnung einer 96 Well Platte (Protein ELISA). Die Zeilen werden mit A-H beschriftet die Spalten von 1-12. Die Zahlen beziehen sich jeweils auf die Verdünnungseinheiten des Standards, dieser wurde an verschiedenen Stellen aufgetragen und jeweils separat verdünnt. AB und KH sind humane Proben gesunder Probanden aus ein und demselben eingefrorenen Aliquot an verschiedenen Stellen der Platte aufgetragen.

Zu Beginn der Etablierung des Hsp70 Protein ELISA wurde das von R&D Systems vorgegebene Protokoll streng eingehalten und lediglich durch Standardisierung von Temperatur, Lagerung und Arbeitsprozessen ergänzt. Mit dieser Methode konnten verlässlich Standardkurven erzielt werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen, dass anfänglich ein Plattenshift (Ansteigen bzw. Abfallen der Konzentration), je nach Lage der Probe auf der Platte, Probleme bereitet.

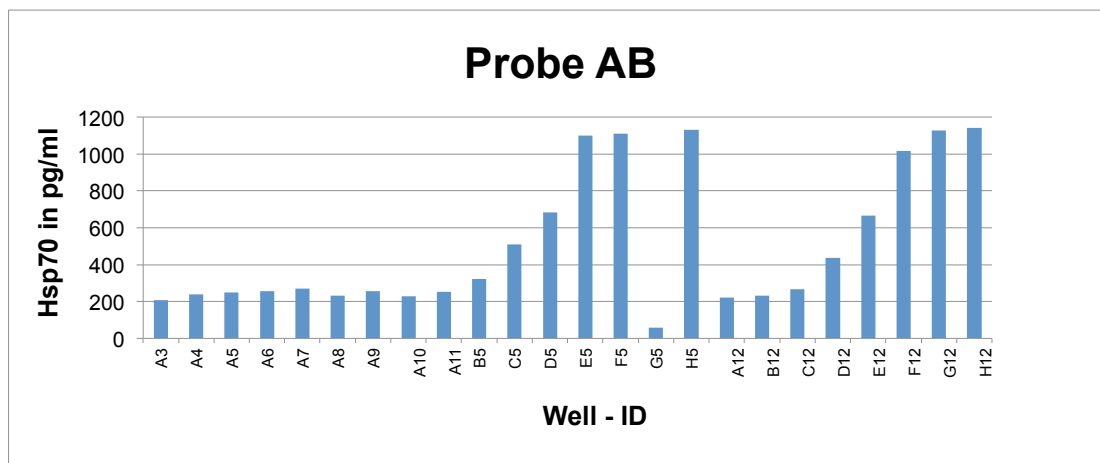


Abbildung 21 Testmessung Hsp70 Protein humane Probe AB

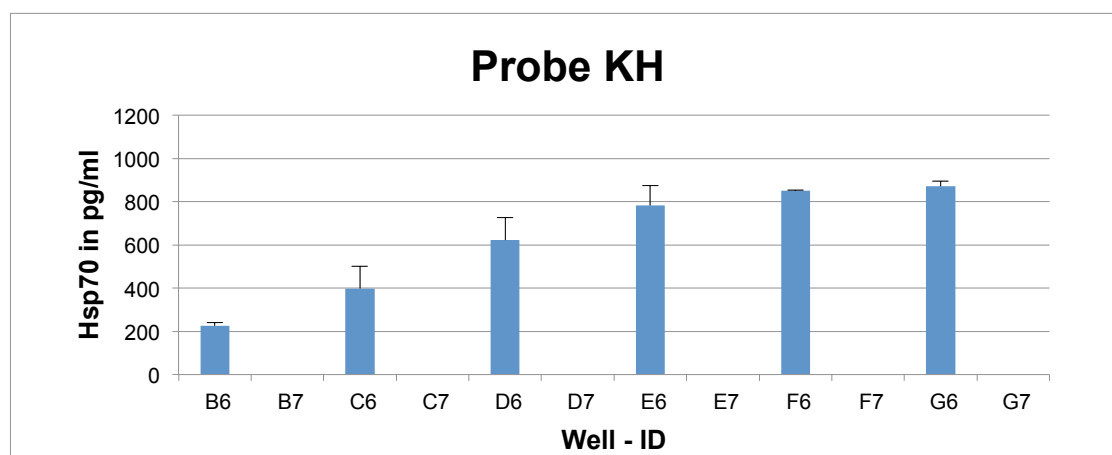


Abbildung 22 Testmessung Hsp70 Protein humane Probe KH. Auf der x-Achse beschrieben ist die Lage der Proben auf der 96 Well Platte. Es zeigt sich, dass die Konzentration der Probe variiert, obwohl an allen Stellen die gleiche Probe mit der gleichen Verdünnung aufgetragen wurde. Es liegt ein systemischer Fehler in der Messung von Zeile A nach H zunehmend, nicht jedoch in den Spalten 1-12 vor (= Plattenshift).

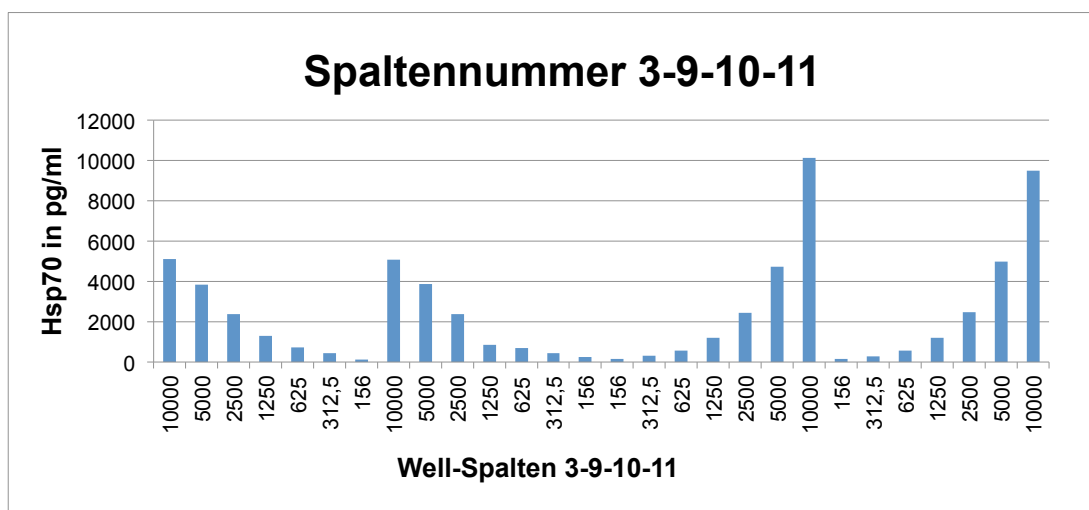


Abbildung 23 **Testmessung Hsp70 Protein Standardreihe**. Obgleich immer die gleichen Verdünnungsreihen (Standardreihe) als Probe aufgetragen wurden, zeigte sich der oben beschriebene „Plattenshift“.

Um das beschriebene Problem des „Plattenshifts“ zu beheben, habe ich folgende Techniken durch empirisches Austesten in mehrfachen Versuchsreihen erarbeitet:

- Sealer bei den Inkubationschritten verwenden um die Verdunstung der Proben zu minimieren, sowie die Inkubation der Platten in Plastikboxen.
- Die Platten der Firma Costar haben sich als optimal erwiesen.
- Beim Waschen der Platte wird diese bei jedem Schritt um 90°gedreht, um so einen systematischen Pipettierfehler auszuschließen.
- Das Auftragen der Ak erfolgt mit einer Mehrkanalpipette unter optischer Kontrolle der Koni in den Pipettenspitzen.

Durch diese Techniken konnte das Problem mit dem „Plattenshift“ ausgeschlossen werden. Schlussendlich konnten Standardabweichungen im Range von 0-10 SEM% erreicht werden.

3.1.3 Vergleichskollektiv und Schwellenwerte

Eine Gruppe von gesunden Spendern bildet das Vergleichskollektiv zu den Patientenproben. Im Folgenden wird diese Gruppe auch manchmal als Normalkollektiv oder Kontrollgruppe bezeichnet. Die Altersverteilung stellt sich wie folgt dar.

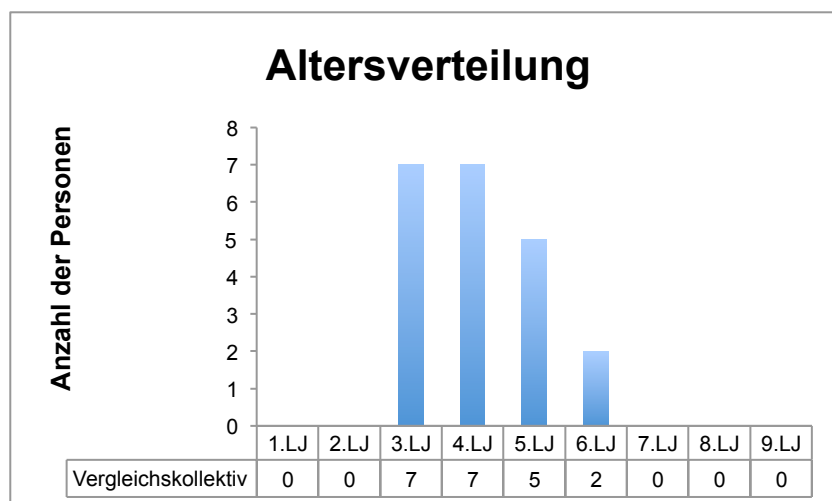


Abbildung 24 **Altersverteilung des Vergleichskollektivs** (n=21). Angegeben ist die Anzahl der Patienten pro Lebensjahrzent. Der Median und Mittelwert der Kontrollgruppe liegen bei 37 Jahren und der Range liegt zwischen 24 und 56 Jahren.

Die Einschlusskriterien waren vollständige Gesundheit und keine regelmäßige Medikamenteneinnahme. Das schlussendliche Vergleichskollektiv besteht aus 19 Probanden in der Antikörper Gruppe und 20 Probanden in der Protein Gruppe. Der Peak des Alters liegt zwischen dem 3. Lebensjahrzent und dem 5. Lebensjahrzent. Die Verteilung der Geschlechter liegt in der Ak Gruppe bei 13 Frauen (68%) und 6 Männern (32%) in der Protein Gruppe bei 13 Frauen (65%) und 7 Männern (35%).

Es wurde den Probanden dreimal 5ml Blut entnommen. Initial zum Start der Vermessung sowie nach 4 und 8 Wochen. Bei drei Probanden floss additiv ein Jahreswert ein.

beide Geschlechter	Hsp70 Protein (pg/ml)	Hsp70 Ak (ng/ml)
Mean	2.579,7	139,8
Median	2.623,6	46,9
Min	1.720,7	21,3
Max	4.294,8	817,1
2,5te Perzentil	1.733	22
97,5te Perzentil	3.887	748
SD	674,3	213,1
SEM	150,8	48,9
SEM%	5,8	35,0
Min	20	19

weiblich	Hsp70 Protein (pg/ml)	Hsp70 Ak (ng/ml)
Mean	2.665,9	130,0
Median	2.732,0	53,1
Min	1.746,3	21,3
Max	4.294,8	817,1
SD	731,9	212,9
SEM	203,0	59,1
SEM%	7,6	45,4
n	13	13

männlich	Hsp70 Protein (pg/ml)	Hsp70 Ak (ng/ml)
Mean	2.419,5	161,0
Median	2.432,8	45,2
Min	1.720,7	23,2
Max	3.314,8	664,0
SD	567,6	250,8
SEM	214,5	102,4
SEM%	8,9	63,6
n	7	6

Tabelle 28 **Übersicht Vergleichskollektiv**. Die Tabelle bietet eine Übersicht über die wichtigsten Parameter des Vergleichskollektivs. Es wurde den Probanden dreimal 5ml Blut entnommen. Initial zum Start der Vermessung sowie nach 4 und 8 Wochen. Bei drei Probanden floss additiv ein Jahreswert ein. Der errechnete Meanwert errechnet sich aus den jeweiligen Meanwerten der Mehrfachmessung der Einzelnen. Zunächst wurden alle Probanden zusammen betrachtet, danach wurde eine Unterteilung nach Geschlechtern vorgenommen. Zwischen den Geschlechtern gibt es keine signifikanten Unterschiede. Die Werte folgen einer Normalverteilung.

Als Mittelwert des Hsp70 Protein Wertes bei Normal Spendern ergab sich der Wert **2.579,7pg/ml**. Im Ergebnisteil wird dieser Wert als Referenzwert und Vergleichswert herangezogen. Im Folgenden wird er auch Threshold bezeichnet.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen nochmals die Werte für die Hsp70 Antikörpergehalte bei Normal Spendern:

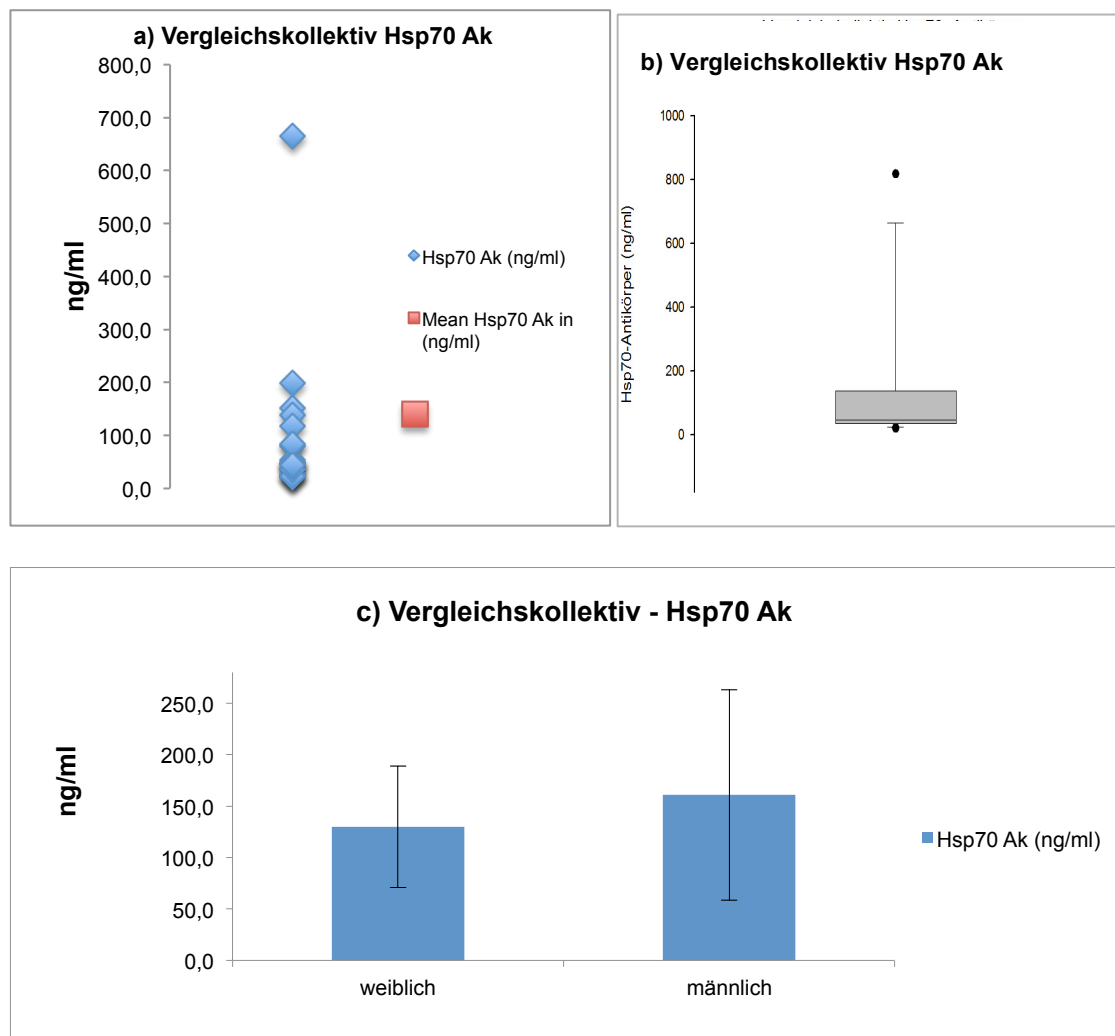


Abbildung 25 a-c **Werte für die Hsp70 Antikörpergehalte bei Normal Spendern** a) Streudiagramm der Hsp70 Ak Werte b) Boxplot der Hsp70 Ak Werte c) Mittelwerte und SEM% des Hsp70 Ak Werte geschlechterspezifisch. Mittelwert, Median, Min/ Max, die Perzentilen und SEM sowie SEM% sind Tabelle Nummer 27 zu entnehmen.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen nochmal die Hsp70 Protein Werte im Normalspenderkollektiv:

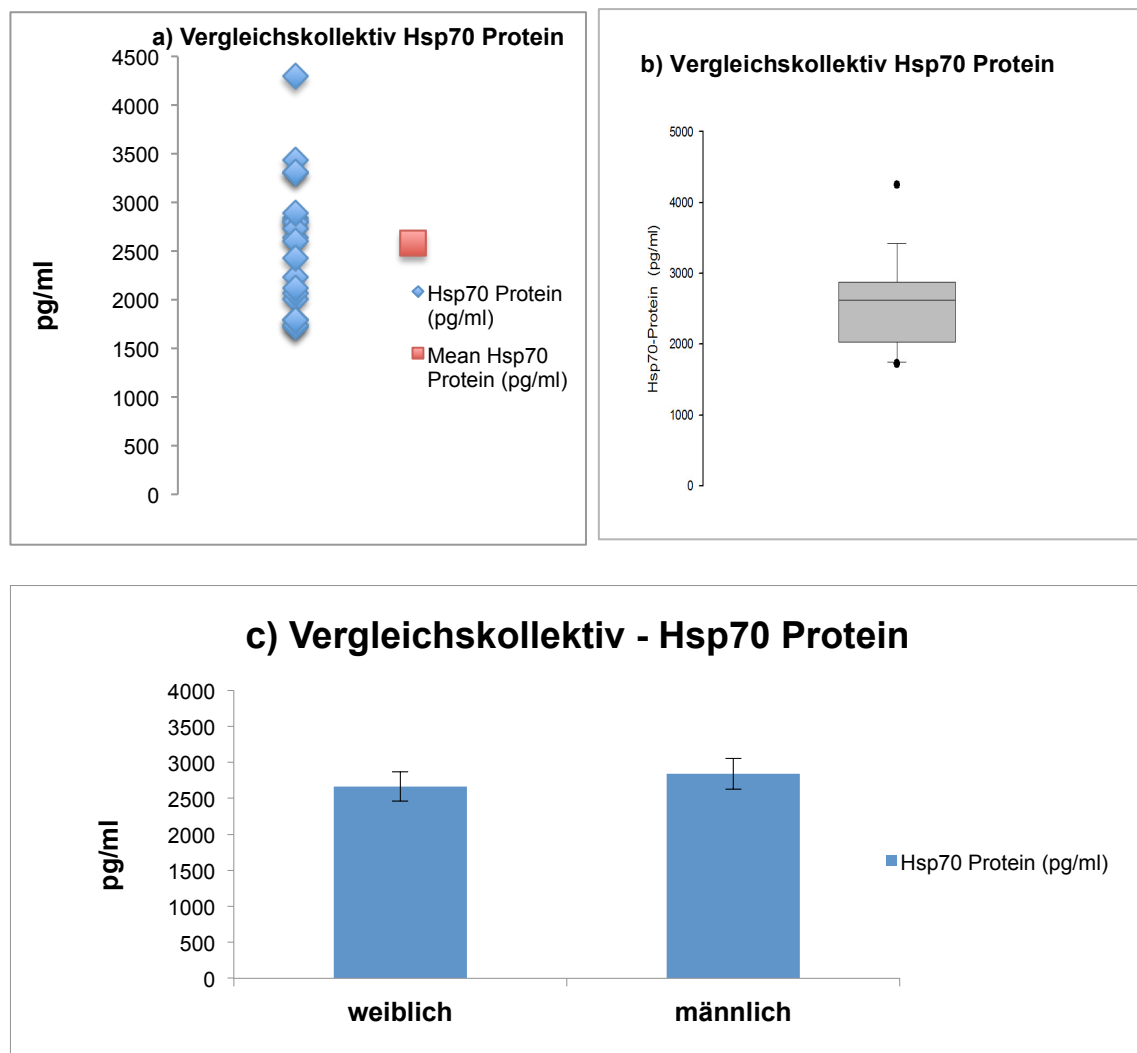


Abbildung 26 a-c **Hsp70 Protein Werte im Normalspenderkollektiv** a) Streudiagramm des Hsp70 Proteingehalts b) Boxplot des Hsp70 Proteingehalts c) Mittelwerte und SEM% des Hsp70 Protein geschlechterspezifisch. Mittelwert, Median, Min/Max, die Perzentilen und SEM sowie SEM% sind Tabelle Nummer 27 zu entnehmen.

3.2 Tumorkollektive

3.2.1 Darstellung Kollektiv Orthopädie/ Patienten mit Tumoren des Binde- und Stützgewebes

Im Zeitraum 2009 - 2010 wurden in der Klinik für Orthopädie und Klinik für Plastische Chirurgie des Klinikums rechts der Isar die Blutproben und Daten von Patienten mit Tumoren des Bindegewebes gesammelt.

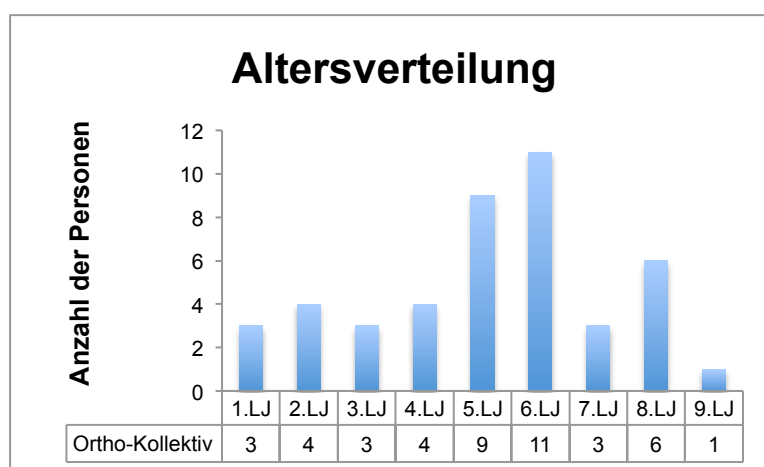


Abbildung 27 **Altersverteilung Tumorpatienten des Binde- und Stützgewebe** (n=44). Angegeben ist die Anzahl der Patienten pro Lebensjahrzent. Der Mittelwert des Alters der Patienten beträgt 47 Jahren, der Median liegt bei 48 Jahren. Das Alter der Patienten liegt im Range von 7 bis 82 Jahren.

Die Altersverteilung des Kollektivs zwischen dem 1. und 9. Lebensjahrzent ist normalverteilt. Ein Peak ist im 5. und 6. Lebensjahrzent zu beobachten. Diese Angaben decken sich mit der in der Literatur beschriebenen Altersverteilung für diese Patientenkollektive (siehe Einleitung 1.1). Das gesamte Kollektiv besteht insgesamt aus 134 Patienten mit 53% Frauen und 47% Männer. Den Patienten wurden vor der Operation sowie nach 3 und 6 Monaten nach der Operation dreimal 5ml Blut abgenommen. In dem von mir untersuchten Kollektiv wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen alle drei Blutabnahmen erfolgten.

Initial wurden alle Patienten mit Verdacht auf einen mesenchymalen Tumor in die Studie aufgenommen. Die Diagnose wurde postoperativ durch histopathologische Befundung festgelegt. Deshalb umfasst das initiale Kollektiv auch nicht

mesenchymale Tumore und Differentialdiagnosen (DD) tumoröser Erkrankungen (DD Osteomyelitis).

Die folgenden Auswertungen umfassen die Entitäten Osteosarkome, Liposarkome, Chondrosarkome, Enchondrome sowie Lipome. Zum Zeitpunkt der Erhebung fehlte für die übrigen Entitäten eine ausreichende Datenlage, um relevante Tendenzen ableiten und statistische Berechnungen anfertigen zu können. Alle klinischen Parameter dieses Kollektivs wurden uns von der Abteilung für Orthopädie zur Verfügung gestellt.

Zunächst werden die präoperativen Ergebnisse der benignen mesenchymalen Tumore im Vergleich zum Normalkollektiv dargestellt.

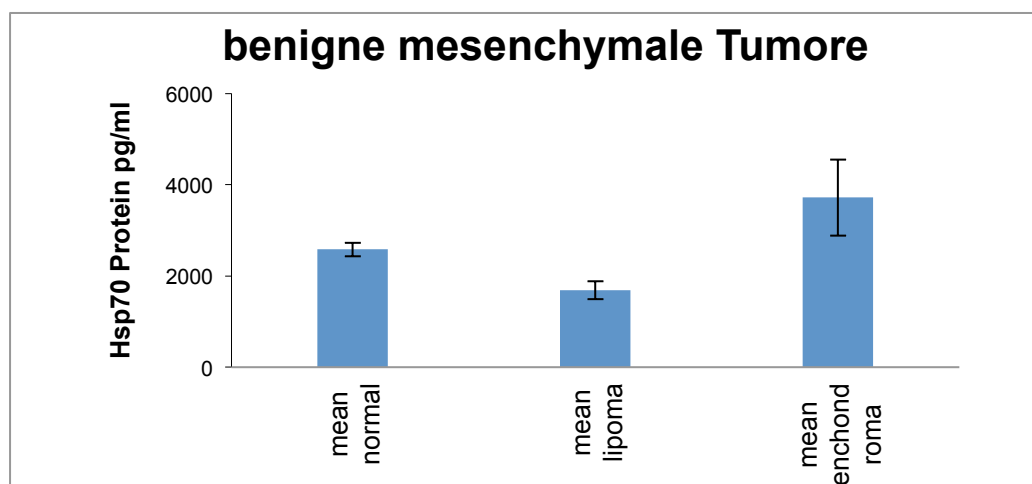


Abbildung 28 **Hsp70 Protein Meanwerte** in pg/ml bei **benignen Tumoren des Binde-/ Stützgewebes** (n=32). Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels des R&D Hsp70 Protein ELISAs untersucht. Dabei handelt sich um präoperative Serumwerte. Der Meanwert des Normalkollektivs liegt bei 2.579,7pg/ml mit einer SEM% von 5,8%. Die Meanwerte/ SD/ n/ SEM sowie SEM% der Tumore lassen sich in folgender Tabelle ablesen.

	Lipom	Enchondrom	alle benignen Tumore
Mean (pg/ml)	1.688,46	3.715,78	2.828,83
SD	520,43	2.495,37	2.123,26
n	7	9	16
SEM	196,70	831,79	530,81
SEM%	11,65	22,39	18,76

Tabelle 29 **Hsp70 Proteingehalt im Serum von Patienten mit benignen mesenchymalen Tumoren**

Es zeigt sich, dass die Hsp70 Proteinwerte der Patienten mit Lipomen noch unter dem Level des Normalkollektivs liegen. Die Patientengruppe der Enchondrome zeigt einen erhöhten Meanwert, jedoch auch eine erhöhte SD. Hier verweise ich auf die Literatur, in der beschrieben wird, dass sich bei Enchondromen oftmals die Dignität nicht einfach bestimmen lässt (Freyschmidt et al., 2010). Diese Inhomogenität im Bereich der Enchondrome in Bezug auf ihre Dignität, könnte den höheren Hsp70 Protein Wert mancher Patienten sowie die dadurch verursachte größere Streuung der Werte erklären. Betrachtet man den Hsp70 Meanwert aller benignen Tumore (2.828pg/ml), so zeigt sich, dass dieser im Range des Vergleichskollektivs (2.579pg/ml) angesiedelt ist.

Es lässt sich somit feststellen:

Der Hsp70 Protein Wert im Serum benigner mesenchymaler Tumorpatienten ist im Vergleich zu gesunden Spendern nicht erhöht. Im Folgenden wird deshalb unter dem Ortho-benigne Kollektiv nur die Entität der Lipome verstanden.

In der folgenden Abbildung sind die Serum Hsp70 Protein Werte aller malignen mesenchymalen Tumorpatienten dargestellt:

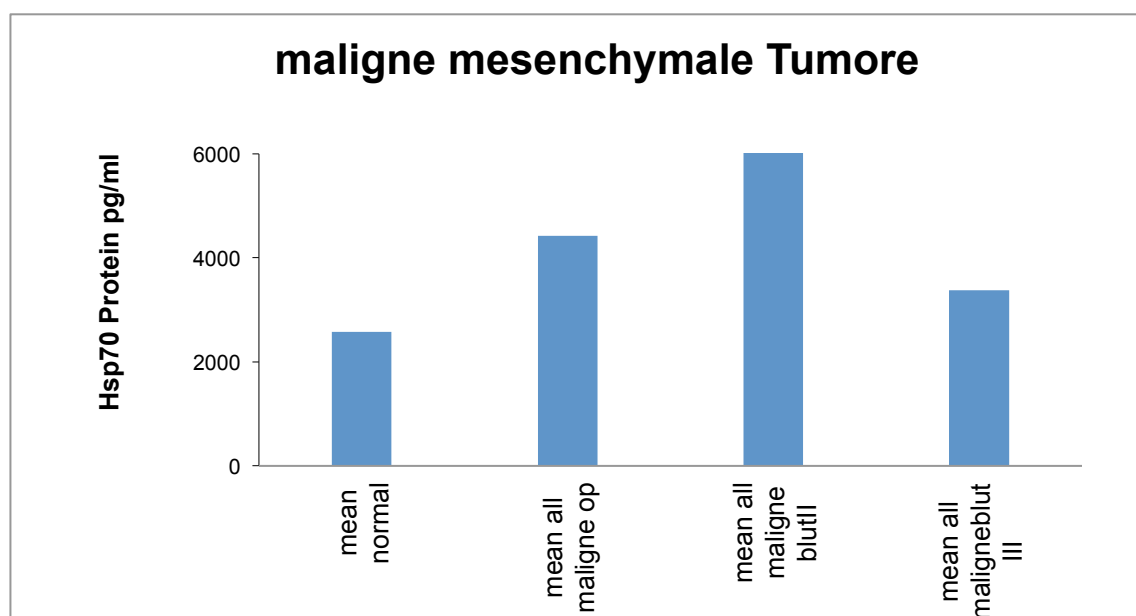


Abbildung 29 **Hsp70 Protein in pg/ml bei Patienten mit malignen mesenchymalen Tumoren des Binde- und Stützgewebes (alle Messungen)**. Es wurden die Serumproben von Tumorpatienten hinsichtlich ihrer Hsp70 Proteinwerte mittels R&D Hsp70 Protein ELISAs untersucht. Dabei handelte es sich um die Serumwerte aller Patienten vor der Operation, sowie nach 3 (II) und 6 (III) Monaten nach der Operation. Der Meanwert des Normalkollektivs (mean normal) liegt

bei 2.579,7pg/ml mit einer SEM% von 5,8%. Der Mean (all maligne op) liegt bei 4.428pg/ml, der Mean (all maligne Blut II) bei 6.152pg/ml sowie der Mean (all maligne Blut III) liegen bei 3.378pg/ml. SD/n/SEM sowie SEM% der Tumore lassen sich in folgender Tabelle ablesen. Die Meanwerte berechnen sich jeweils aus allen drei Tumorentitäten. Es ist zu beachten, dass die jeweiligen Werte mit einer unterschiedlichen n-Zahl in die Berechnung eingehen. Deshalb erfolgte keine Berechnung der SD oder SEM% für die Meanwerte-all.

Chondrosarkom

	vor Operation	Blut II	Blut III
Mean (pg/ml)	4.329,1	8.675,3	3.900,8
SD	1.779,1	9.417,0	1.044,3
n	14,0	9,0	9,0
SEM	475,5	3.139,0	348,1
SEM%	11,0	36,2	8,9

Liposarkom

	vor Operation	Blut II	Blut III
Mean(pg/ml)	5.900,7	4.252,3	3.309,6
SD	8.103,9	1.230,5	1.489,2
n	13,0	6,0	4,0
SEM	2.247,6	502,4	744,6
SEM%	38,1	11,8	22,5

Osteosarkom

	vor Operation	Blut II	Blut III
Mean (pg/ml)	3.162,1	4.537,2	2.494,1
SD	1.466,1	3.880,9	717,9
n	14,0	7,0	5,0
SEM	391,8	1.466,8	321,1
SEM%	12,4	32,3	12,9

Tabelle 30 Hsp70 Protein im Serum bei Patienten mit malignen mesenchymalen Tumoren alle Messungen aufgelistet nach Entitäten (vor Operation, 3 und 6 Monate nach Operation)

Zum Vergleich folgt eine Darstellung der Hsp70 Proteinwerte aller Patienten mit malignen mesenchymalen Tumoren bei denen ein vollständiger Verlauf vorlag, d.h. dass alle drei Blutabnahmen erfolgt sind:

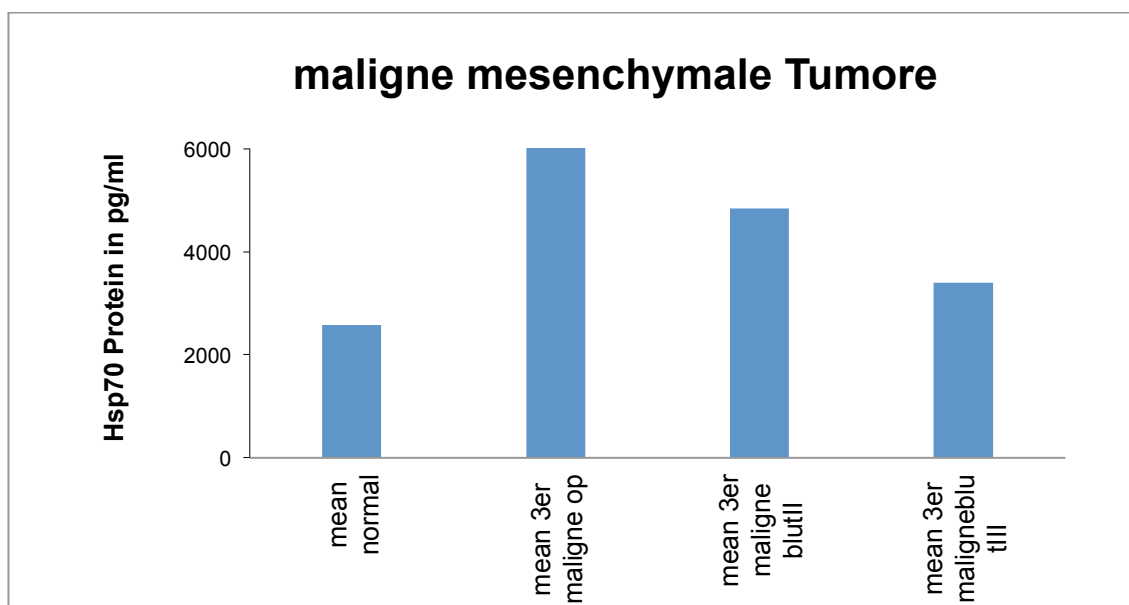


Abbildung 30 **Hsp70 Protein** in pg/ml bei Patienten mit **malignen mesenchymalen Tumoren des Binde- und Stützgewebes mit vollständigem Verlauf** (vor Operation, 3 (II) und 6 (III) Monate nach Operation). Die Serumproben wurden hinsichtlich ihres Hsp70 Proteingehalts mittels R&D Hsp70 Protein ELISAs untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor der Operation, sowie nach 3 und 6 Monaten nach der Operation, bei denen ein vollständiger Verlauf vorlag. Der Meanwert des Normalkollektiv (mean normal) liegt bei 2.579,7pg/ml mit einer SEM% von 5,8%. Der Mean (3er maligne Operation) liegt bei 6.626pg/ml, der Mean (3er maligne Blut II) bei 4.843pg/ml sowie der Mean (3er maligne Blut III) bei 3.398pg/ml. SD/n/SEM sowie SEM% der Tumore lassen sich in folgender Tabelle ablesen. Die Meanwerte berechnen sich jeweils aus allen drei Tumorentitäten. Es ist zu beachten, dass die jeweiligen Werte mit einer unterschiedlichen n-Zahl in die Berechnung eingehen. Deshalb erfolgte keine Berechnung der SD oder SEM% für die Meanwerte mit vollständigem Verlauf.

Chondrosarkom

	vor Operation	Blut II	Blut III
Mean (pg/ml)	5.909,3	6.132,1	3.900,8
SD	1.693,1	2.651,2	1.044,3
n	5,0	5,0	5,0
SEM	757,2	1.185,6	348,1
SEM%	12,8	19,3	8,9

Liposarkom

	vor Operation	Blut II	Blut III
Mean (pg/ml)	10.702,7	4.423,3	3.309,6
SD	14.230,1	1.455,3	1.489,2
n	4,0	4,0	4,0
SEM	7.115,0	727,6	744,6
SEM%	66,5	16,4	22,5

Osteosarkom

	vor Operation	Blut II	Blut III
Mean (pg/ml)	3.446,7	3.653,0	2.356,1
SD	1.907,4	1.168,9	694,0
n	4,0	4,0	4,0
SEM	404,6	584,5	347,0
SEM%	15,9	16,0	14,7

Tabelle 31 **Hsp70 Proteingehalt** von Patienten mit **malignen mesenchymalen Tumoren – mit vollständigem Verlauf** (vor Operation, 3 und 6 Monate nach Operation)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle Proben vor der Operation und 3 Monate nach der Operation über dem Hsp70 Protein Wert des Normalkollektivs liegen. Die Probe aller Messungen vor der Operation im Vergleich zum Normalkollektiv hat einen Anstieg von 71%, die Proben mit vollständigem Verlauf vor der Operation einen 156%igen Anstieg. Die Proben aller Messungen Blut II haben einen 139%igen Anstieg im Verhältnis zum Vergleichskollektiv. Die Proben Blut II mit vollständigem Verlauf dagegen einen 88%igen Anstieg. Die 6 Monatsproben beider Gruppen liegen nur noch mit einer leichten Erhöhung von 31% über dem Normallevel.

Patienten mit malignen mesenchymalen Tumoren liegen mit ihrem Serum Hsp70 Proteinwerten über dem von gesunden Probanden. Die folgende Abbildung zeigt dies nochmals exemplarisch für Chondrosarkompatienten.

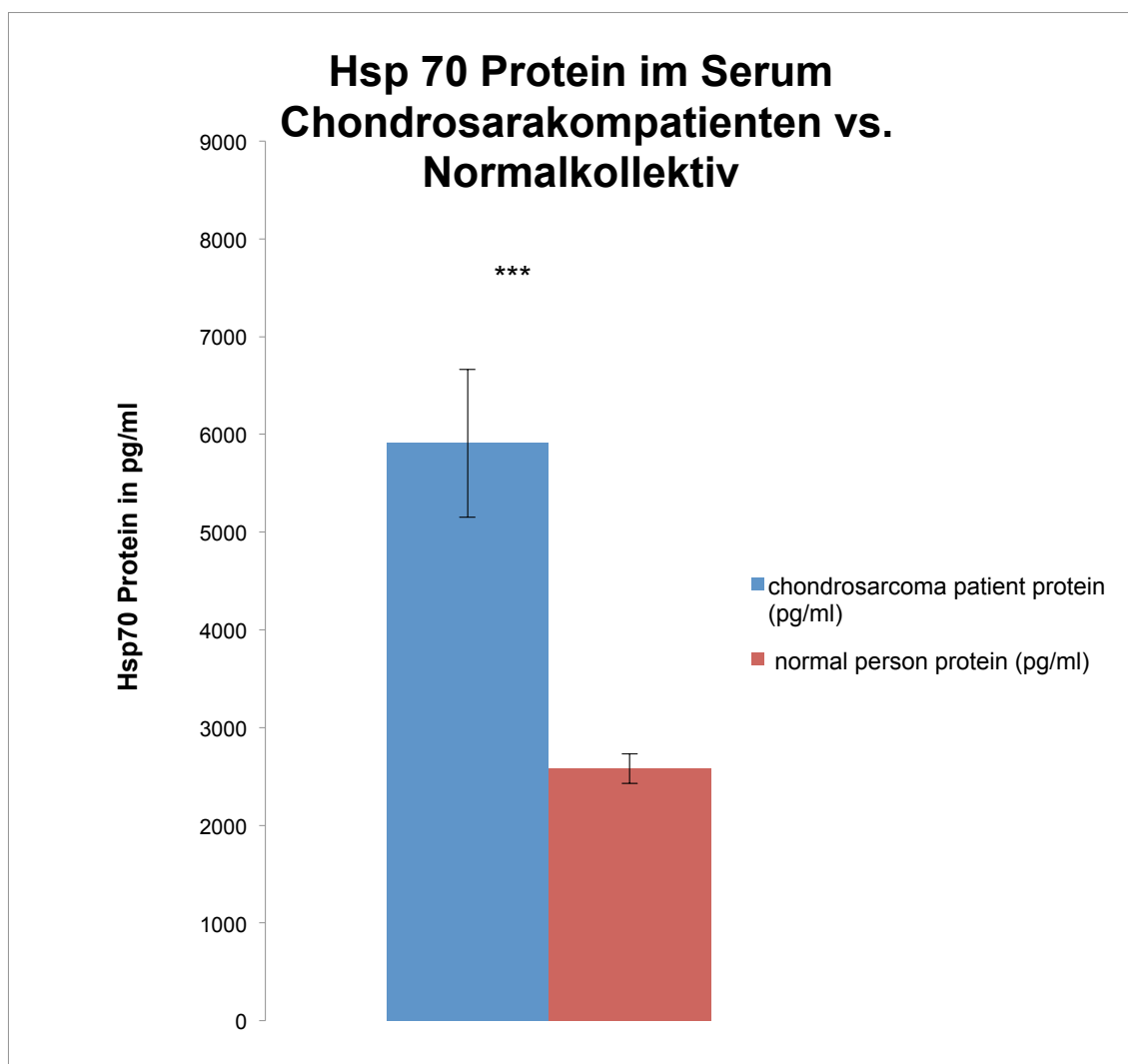


Abbildung 31 **Hsp70 Protein im Serum vor der Operation von Patienten mit einem Chondrosarkom (n=5) vs. Hsp70 im Serum des Vergleichskollektivs (n=20)**. Der p-Wert beträgt $2,96274E^{-07}$ und ist somit hoch signifikant ***. Das Chondrosarkomkollektiv (n=5) hat den Wert von 5.909,34pg/ml Hsp70 Protein im Serum. Das Normalkollektiv (n=20) liegt bei 2.579pg/ml im Serum. Die Abbildung zeigt, dass die Hsp70 Protein Serumwerte der Chondrosarkompatienten präoperativ hochsignifikant über dem Hsp70 Protein Serumlevel des Vergleichskollektivs liegen.

Im Folgenden werden die Werte der Hsp70 Proteinmessung der Patienten mit mesenchymalen Tumoren in Bezug zum Tumolvolumen gesetzt. Das Tumolvolumen der mesenchymalen Tumore wurden durch unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Orthopädie erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Hierbei wurden die präoperativ angefertigte CT Bilder vermessen.

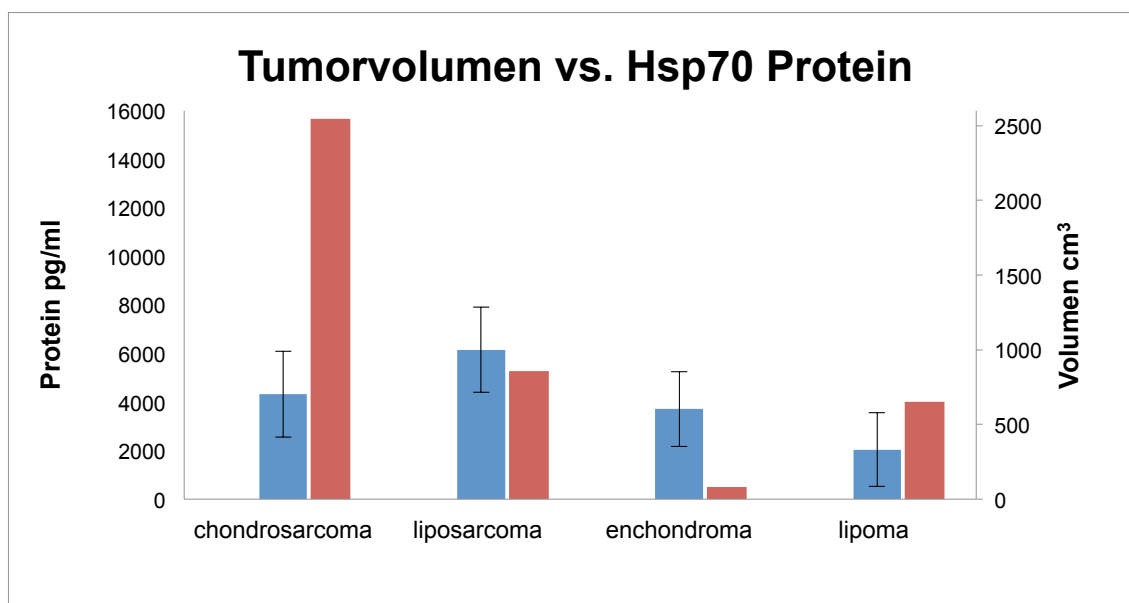


Abbildung 32 **Hsp70 Protein (blau) in Bezug zum Tumorzvolumen (rot) von Patienten mit mesenchymalen Tumoren.** Es wurden die Serumproben von Patienten mit malignen mesenchymalen Tumoren auf Hsp70 Protein mittels R&D Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor der Operation. Der Mean des Hsp70 Proteins vor der Operation liegt bei Patienten mit Chondrosarkomen bei 4.329pg/ml, bei Patienten mit Liposarkomen bei 6.153pg/ml sowie bei Patienten mit Enchondromen bei 3.715pg/ml und bei Lipomen bei 2.036pg/ml. Die Tumorzvolumina liegen bei Chondrosarkompatienten bei 2.544cm³, bei Liposarkompatienten bei 856,7cm³, bei Enchondrompatienten bei 82cm³ sowie bei Patienten mit Lipomen bei 651cm³.

Der Range des Hsp70 Proteins sowie des Tumorzvolumens lassen sich in der folgenden Tabelle ablesen. Zu beachten gilt, dass die jeweiligen Werte in einer unterschiedlichen n-Zahl einfließen.

	Chondrosarcoma	Liposarcoma	Enchondroma	Lipoma
Mean Protein pg/ml	4.329,1	6.153,8	3.715,8	2.036,4
Range min	1.774,7	1.757,5	1.543,5	1.511,2
Range max	7.973,6	3.1959,3	10.038,9	2.609,6
Mean Tumor cm³	2.544,6	856,7	82,2	651,9
Range min	6,4	25,8	7,4	33,0
Range max	24.504,4	4.054,7	294,1	1.357,2
n	14	12	9	3

Tabelle 32 **Hsp70 Protein und Tumorzvolumen mesenchymaler Tumore**

Es zeichnet sich ab, dass das Tumorumfang von Patienten mit mesenchymalen Tumoren in dem aktuell vorliegenden Kollektiv in keinem Zusammenhang mit der Höhe des gemessenen Hsp70 Protein Wertes im Serum steht. Höhere Volumina können mit einem höheren präoperativen Hsp70 Proteinlevel einhergehen, jedoch kann man dies nicht durchgängig belegen. Maligne Entitäten der mesenchymalen Tumore haben, wie bereits dargelegt, höhere Level als benigne Entitäten mesenchymaler Tumore. Genauere statistische Auswertungen lassen sich aufgrund der niedrigen n-Zahl und der erhobenen Datenlage nicht anfertigen. Hier gilt es, eine Analyse in einem größeren Kollektiv anzufertigen, um Aussagen treffen zu können.

3.2.2 Darstellung Kollektiv HNO/ Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen

Im Zeitraum 2008 - 2010 wurden in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Klinikums rechts der Isar die Blutproben und Daten von Patienten mit Tumoren des Kopf- und Hals-Bereiches gesammelt.

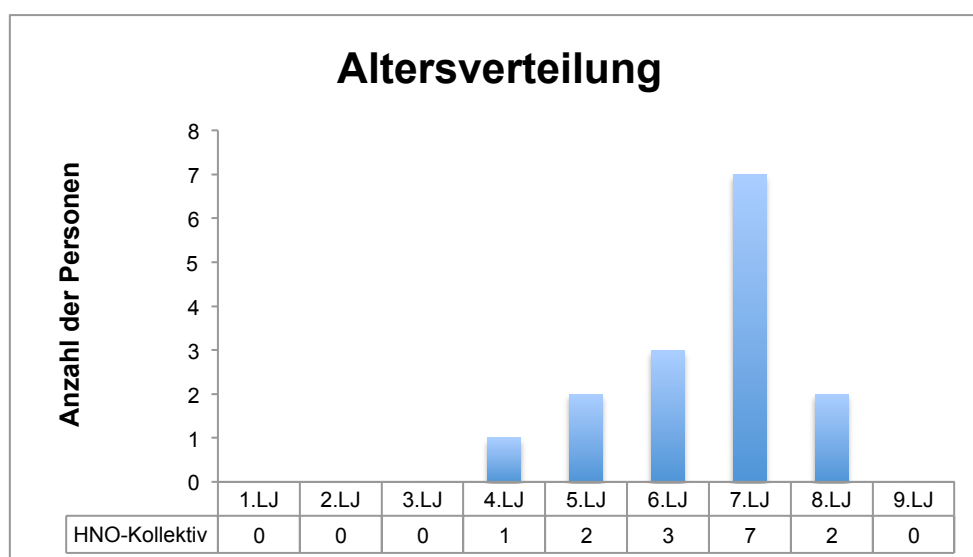


Abbildung 33 **Altersverteilung der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren** (n=15). Angegeben ist die Anzahl der Patienten pro Lebensjahrzent. Der Mittelwert des Alters der Patienten liegt bei 61 Jahren, der Median liegt bei 64 Jahren. Das Alter der Patienten liegt im Range von 36 bis 78 Jahren.

Die Altersverteilung des Kollektivs der Kopf-Hals-Tumore liegt zwischen dem 4. und 8. Lebensjahrzent und ist normalverteilt. Im 7. Lebensjahrzent ist ein Peak zu beobachten. Das Kollektiv setzt sich aus 7% Frauen (n=1) und 93% Männer (n=14) zusammen. Diese Angaben decken sich mit der in der Literatur beschriebenen Alters-/ Geschlechterverteilung (siehe Einleitung 1.2) der Kopf-Hals-Tumore. Den Patienten wurden vor der Therapie, sowie nach ca. 3, 6 und 12 Monaten nach der Therapie dreimal 5ml Blut abgenommen.

Es wurden Patienten mit folgenden Diagnosen, die histopathologisch bestätigt wurden, eingeschlossen: Larynxkarzinome (n=7), Oropharynx-/ Hypopharynxkarzinome (n=3), Tonsillenkarzinome (n=2), Zungenkarzinome (n=2), Nasennebenhöhlenkarzinome (n=1). Die folgende Auswertung befasst sich mit verschiedenen Untergruppen dieses Gesamtkollektivs, da nicht immer alle Daten erfasst werden konnten und zum Teil die Anzahl für statistische Auswertungen oder Tendenzen zu klein war. In zwei Darstellungen wurde das Kollektiv um (n=2) Larynxkarzinompatienten erweitert. Diese wurden erst später in die Berechnung eingeschlossen, um die mathematische Richtigkeit und Aussagekraft zu erhöhen. Die neu eingeschlossenen Patienten unterliegen den gleichen Studieneinchlusskriterien, die bereits oben beschrieben wurden. Alle klinischen Parameter dieses Kollektivs wurden uns von der Abteilung für HNO-Heilkunde zur Verfügung gestellt.

In den folgenden Abbildungen 34 bis 38 wird insbesondere auf die Hsp70 Proteinlevel im Serum von Kopf-Hals-Karzinompatienten im Vergleich zu gängigen Einteilungen der Klinik von Kopf-Hals-Tumoren eingegangen (T-Stadien, Grading, etc.). Es soll der Bezug des Hsp70 Proteins Serumwertes zu bereits etablierten Einteilungskriterien von Karzinomen hergestellt werden.

Das Tumorumfangen der Kopf-Hals-Tumore wurde durch unsere Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Strahlentherapie erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Hierbei wurden die initial angefertigte CT Bilder vermessen.

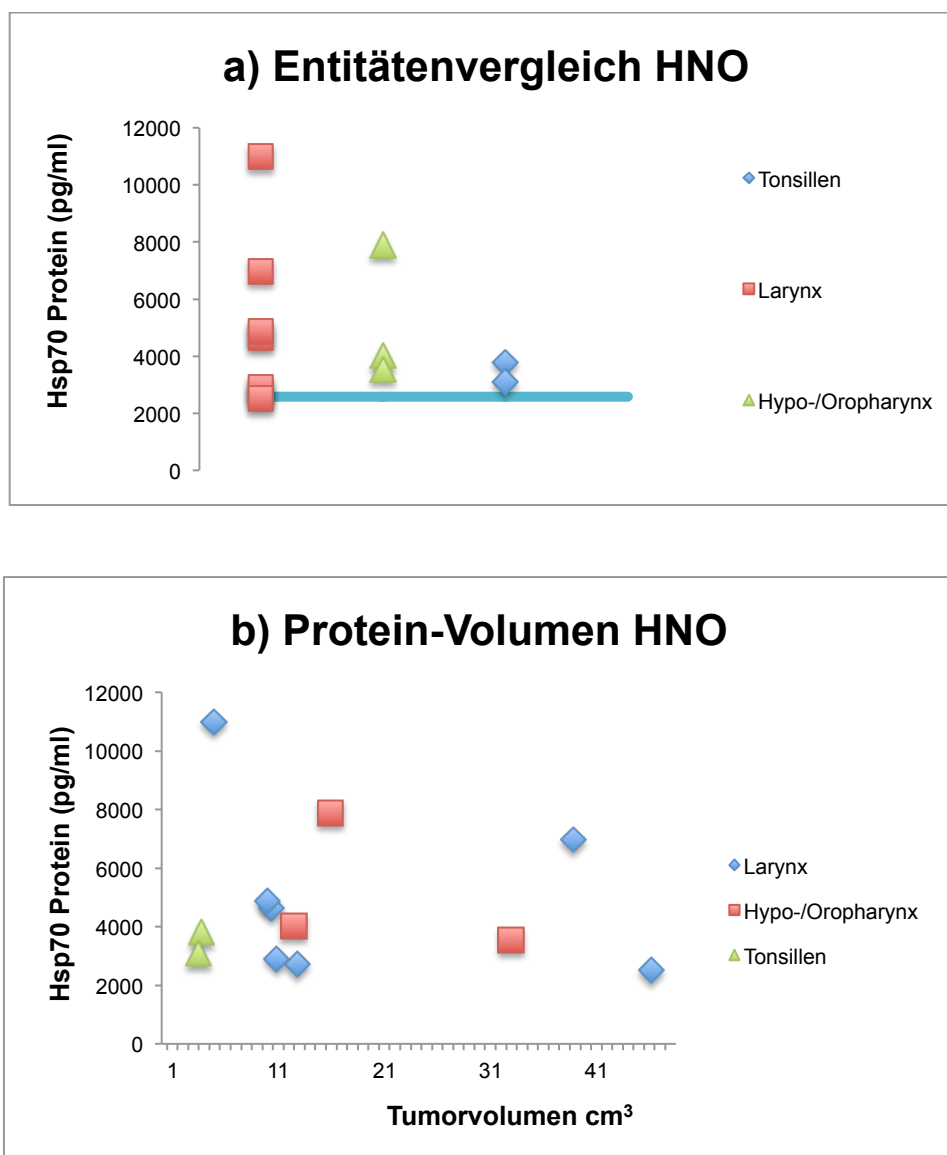


Abbildung 34 a-b **Hsp70 Proteinlevel im Serum von Kopf und Hals-Karzinompatienten** a) Hsp70 Proteinlevel im Serum von Karzinompatienten- HNO-Entitäten im Überblick b) Hsp70 Proteinlevel im Serum/ Tumorvolumen der Karzinompatienten-HNO-Entitäten im Überblick. Die Serumproben von Tumorpatienten wurden auf Hsp70 Protein mittels R&D Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor der Therapie, bei denen ein vollständiger Verlauf (Proben vor Therapie sowie 3/ 6/ 12 Monate nach Therapie) vorlag. Der Meanwert des Hsp70 Proteins im Serum des Normalkollektivs (mean normal) liegt bei 2.579,7pg/ml mit einer SEM% von 5,8% und ist durch die blaue Line des Thresholds in Abbildung a gekennzeichnet. Mean, n sowie SEM lassen sich in folgender Tabelle ablesen.

Tumor Entität	Hsp70 Protein (pg/ml)	SEM	Tumorvolumen cm ³
Larynxkarzinom	6.971,4	1.238,3	38,8
	4.640,0	663,0	10,34
	11.001,8	2.433,0	4,91
	2.708,8	473,6	12,77
	4.866,0	613,0	10,02
	2.913,4	696,5	10,85
	2.507,7	708,9	46,19
Hypo-/Oropharynxkarzinom	4.020,4	307,6	12,46
	3.547,5	562,7	32,96
	7.888,8	648,8	15,9
Tonsillenkarzinom	3.797,3	344,5	3,75
	3.093,5	412,6	3,49

Tabelle 33 **Hsp70 Protein Serumwerte vor Therapie und Tumorvolumen der HNO Tumore** (Larynx n = 7, Hypo-/ Oropharynx n = 3, Tonsillen n = 2)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle Hsp70 Protein Serumwerte der Tumore der Kopf-Hals-Karzinome über dem Wert des Normalkollektivs liegen. Hsp70 Protein Serumwerte sind bei Patienten maligner Tumore des Larynx/ Hypo-/ Oropharynx sowie der Tonsillen im Vergleich zu Gesunden erhöht. Aufgrund einer zu geringen n-Zahl kann man nicht von statistisch signifikant sprechen. Die Datenlage deutet jedoch sehr stark auf eine Signifikanz bei steigender n-Zahl hin.

Man kann ebenfalls erkennen, dass es im Bereich der von uns untersuchten HNO-Tumoren keinen direkten proportionalen Zusammenhang zwischen Tumorgröße und Hsp70 Protein Serum Level gibt. Es zeigt sich, dass die Tonsillentumore unserer Studie in Bezug auf Hsp70 Serum Proteinlevel und Tumorgröße fast identische Werte aufweisen. Larynx und Hypo-/ Oropharynx streuen in ihren Werten bezüglich Hsp70 Protein im Serum und Tumorvolumina. Der Range des Tumorvolumens dieser Gruppen liegt zwischen 10,02cm³ und 46,19cm³, der Range der Hsp70 Proteins liegt zwischen 2.507pg/ml und 11.001,8pg/ml. Daraus ergibt sich eine bis zu ca. 4,6 fache Steigerung des Tumorvolumens der Kopf-Hals-Tumore. Der Range der Tumorgröße der Kopf-Hals-Tumore ist jedoch im Verhältnis zu anderen Tumoren, beispielsweise die

der mesenchymalen Tumoren des Binde- und Stützgewebes ($6,4\text{cm}^3$ bis $24.504,4\text{cm}^3$) eher gering. Aus diesem Grund ist die Streuung eher zu vernachlässigen. Weitere Auswertungen und Vergleiche zwischen den Kollektiven finden sich im Kapitel 3.3.1.

Die folgenden Abbildungen und Tabellen zeigen die Verteilung des Tumorumfanges und des Hsp70 Proteins im Serum präoperativ von Hals-Kopf-Karzinompatienten in Bezug auf ihr T-Stadium. Für diese Darstellung wurden alle Untergruppen (Entitäten) der HNO-Tumore vereint.

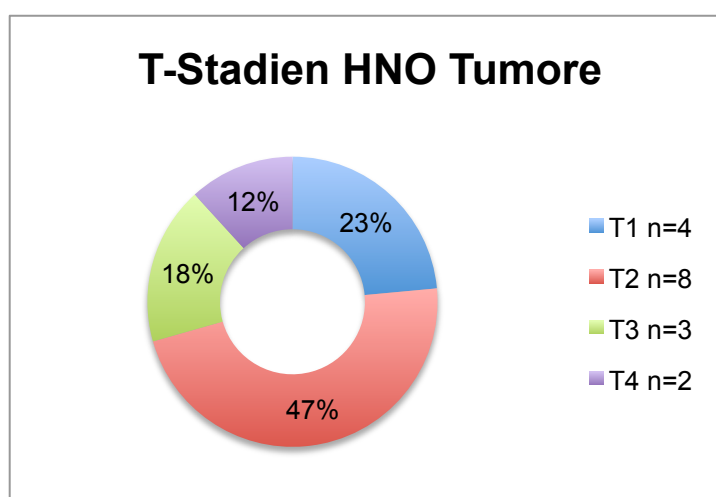


Abbildung 35 **Prozentualer Anteil der T-Stadien am Gesamtkollektiv HNO-Tumore.** Die größte Gruppe der T-Stadien der Kopf-Hals-Tumore bildet die T2 Gruppe mit $n=8$ und 47% Anteil am gesamten Kollektiv. Zweitgrößte Gruppe ist die T1 Gruppe mit $n=4$ und 23% Anteil am Gesamten Kollektiv. Schlusslicht bildet die Gruppe der T3 Tumore mit $n=3$ und 18% sowie die Gruppe der T4 Tumore mit $n=2$ und 12% Anteil am Gesamtkollektiv.

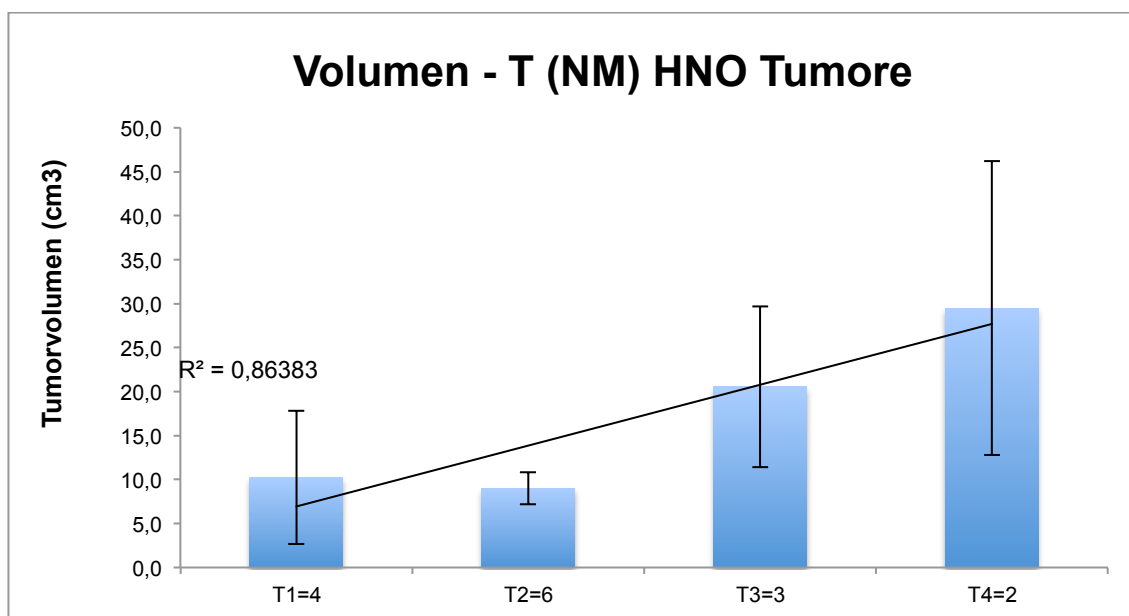


Abbildung 36 **Tumorvolumen der verschiedenen T-Stadien HNO Tumore Gesamtkollektiv** (alle Entitäten). Das Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2=0,86$.

Angaben bzgl. des Tumorvolumens der Kopf-Hals-Tumore sowie statistische Werte zur Abbildung befinden sich in der folgenden Tabelle:

T-Stadium	Mittelwert Tumorvolumen cm^3	SD	n = 15	SEM	min	max
T1	10,3	15,2	4	7,5	0,9	33,0
T2	9,0	4,5	6	1,8	3,5	15,9
T3	20,5	15,9	3	9,1	10,3	38,8
T4	29,5	23,6	2	16,7	12,8	46,2

Tabelle 34 **Tumorvolumen und T-Stadien HNO Tumore Gesamtkollektiv**

Abbildung 36 und Tabelle 33 verdeutlichen, dass mit steigendem T-Stadium der HNO-Tumore das Tumorvolumen ansteigt. Im T1 Stadium ist der Mittelwert $10,3\text{cm}^3$, im T4 Stadium $29,5\text{cm}^3$. Dies ist einen Anstieg des Volumens der Kopf-Hals-Tumore vom T1 zum T4 Stadium um das 2,9-fache. Das Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2=0,86$. Der T-Test ergab folgende Werte:

T-Test Tumorvolumen im Vergleich: T1/T2 ($p=0,88$); T1/T3 ($p=0,43$); T1/T4 ($p=0,44$)

Zusammenfassend bedeutet dies, dass das von uns untersuchte Kollektiv der Kopf-Hals-Tumore in Bezug auf das Tumolvolumen normalverteilt ist. Trotz kleiner n-Zahl des Gesamtkollektivs folgt es den allgemeinen Standards der TNM-Klassifikation, da mit der Größe des Tumolvolumens das T-Stadium einher geht. Im Folgenden werden analog die T-Stadien des Gesamtkollektivs auf das Hsp70 Protein Serum Level präoperativ abgenommen, dargestellt.

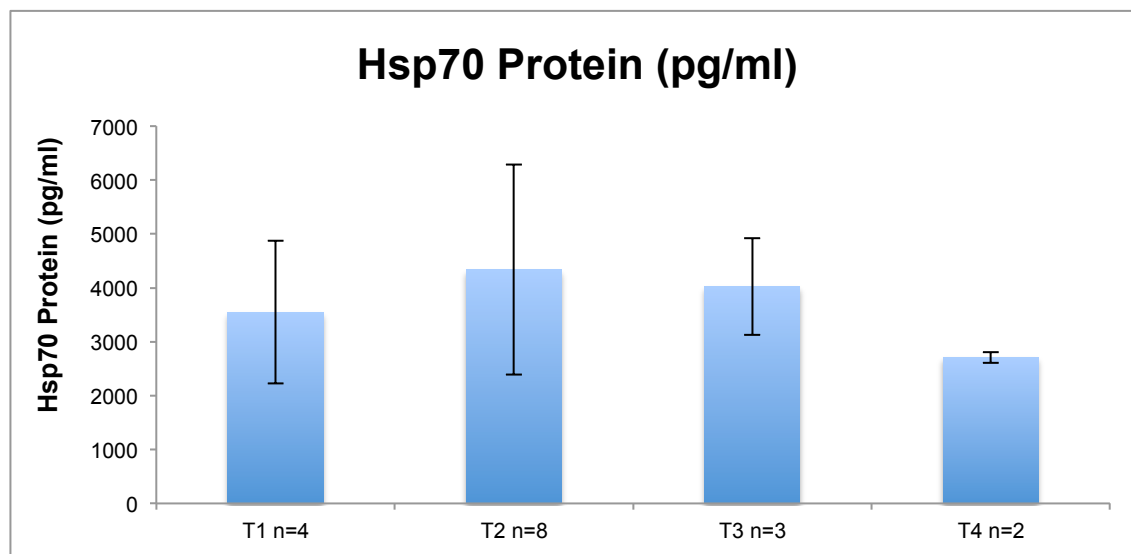


Abbildung 37 **Hsp70 Protein im Serum vor Therapie in den T-Stadien der HNO Tumore Gesamtkollektiv**

Angaben bzgl. des Hsp70 Proteinlevels sowie statistische Werte zur Abbildung sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

T-Stadium	Hsp70-Protein (pg/ml) Mean	Mw (pg/ml)	SD	n = 17	SEM	min	max
T1	3.547,4	3.547,4	2.641,2	4	1.320,6	1.827,9	8.041,4
T2	4.336,0	6.608,6	5.515,0	8	1.949,8	948,2	17.821,0
T3	4.020,3	5.210,6	1.556,0	3	898,3	4.020,3	6.971,3
T4	2.708,8	2.608,2	142,2	2	100,5	2.507,6	2.708,8

Tabelle 35 **Hsp70 Protein im Serum vor Therapie in den T-Stadien der HNO Tumore Gesamtkollektiv**

Es lässt sich zusammenfassen, dass bei unserem Kollektiv der Kopf-Hals-Tumore der Hsp70 Protein Serumspiegel Tendenzen eines Peaks im T2 Stadium (4.336pg/ml) aufweist. Ein leichten Abfall des Hsp70 Protein Serumwertes im T4 Stadium (2.708pg/ml) ist ebenfalls zu verzeichnen. Unter Berücksichtigung des SEM und der n-Zahl kann keine statistische Auswertung mittels Signifikanztests erfolgen. Der T-Test für die Stadien T1/ T2 in Bezug auf Hsp70 Protein weist den Wert $p=0,35$. Dies entspricht einem nicht signifikanten Anstieg des Hsp70 Protein Serumlevels vom T1 zum T2 Serumspiegel unseres Kollektivs der Kopf-Hals-Tumore.

Es lässt sich subsumieren, dass das Hsp70 Serum Proteinlevel präoperativ in allen Tumorstadien T1 bis T4 der Kopf-Hals-Tumore über dem Threshold, sprich Normalkollektiv liegt. Karzinompatienten aus dem Bereich der HNO haben damit einen erhöhten Hsp70 Serumspiegel im Vergleich zu gesunden Menschen. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem präoperativen Hsp70 Protein Wert und dem Tumorumfang lässt sich in unserem Kollektiv der Kopf-Hals-Tumore nicht finden.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Zusammenhang zwischen Hsp70 Protein im Serum präoperativ und dem Grading der HNO Tumore unseres Kollektivs.

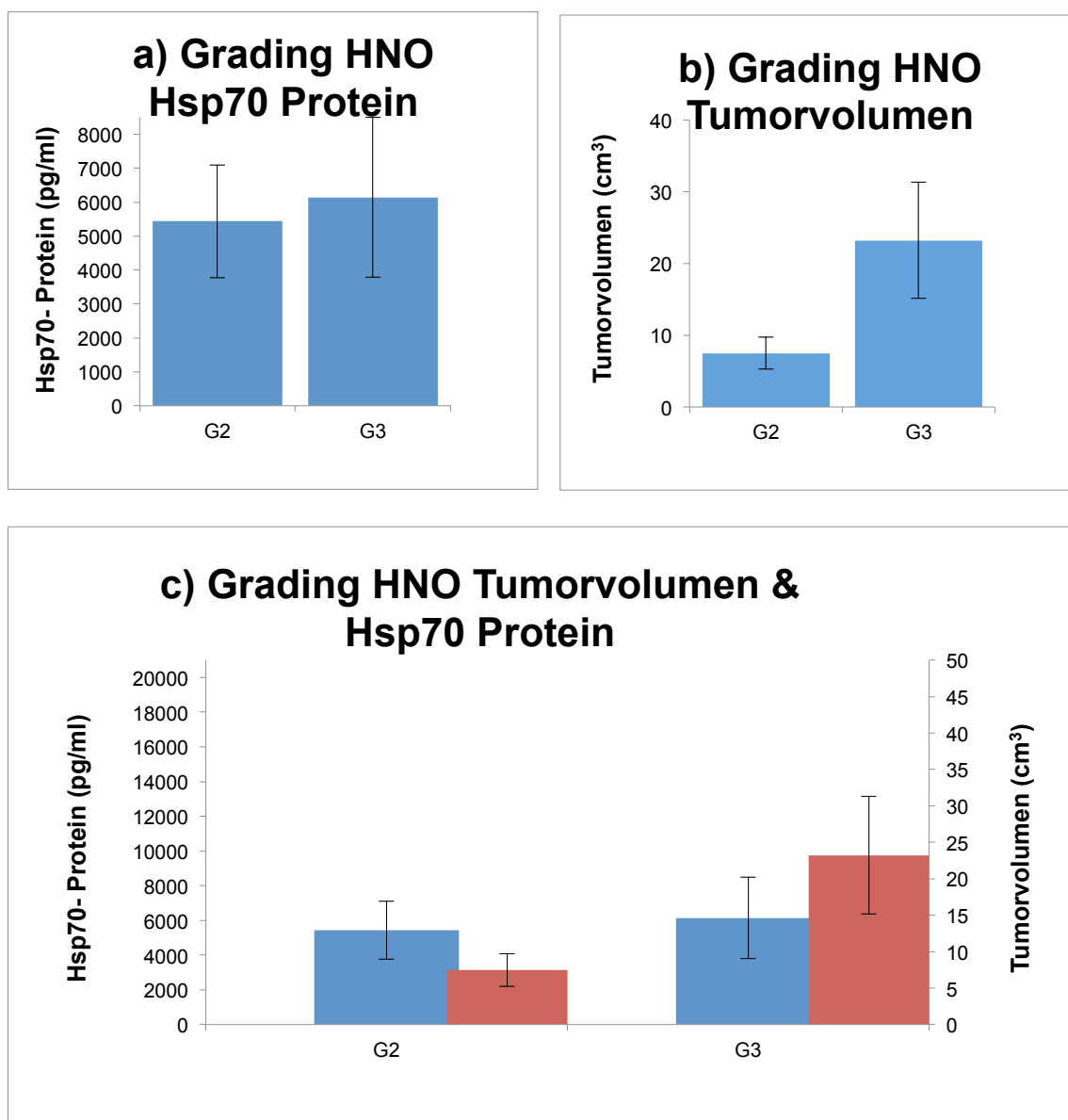


Abbildung 38 a-c **Hsp70 Protein im Serum vor Therapie (blau) und Tumorvolumen (rot), aufgeteilt in die Gradingstufen der HNO Tumore** unseres Kollektivs. a) Grading und Hsp70 Protein b) Grading und Tumorvolumen c) Grading Hsp70 Protein und Volumen. Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor der Therapie. Das Normalkollektiv wurde nicht dargestellt, da es hier keine zu vergleichenden Werte gibt. Der Mean des Hsp70 Proteins liegt im G2 Stadium bei 5.436pg/ml und im G3 Stadium bei 6.145pg/ml. Die Tumorvolumina liegen im G2 Stadium bei 7,5cm³ und im G3 Stadium bei 32,2cm³.

Weitere statistische Berechnungen bezüglich der obigen Abbildung 38 lassen sich der folgenden Tabelle 35 entnehmen:

	MW Tumor Volumen (cm ³)	Mw Pro- tein vor Therapie (pg/ml)	SD Volu- lu- men	SD Protein	n = 12	SEM Protein	SEM Vo- lumen
G2	7,5	5.436,9	5,5	4.081,8	6,0	1.666,4	2,2
G3	23,2	6.145,9	19,8	5.774,5	6,0	2.357,4	8,1

Tabelle 36 **HNO Tumore Grading und Hsp70 Protein und Tumorvolumen**

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl die G2 als auch die G3 gegradeten Kopf-Hals-Tumore über dem Threshold von 2.579pg/ml liegen. Es zeigt sich hier eine deutliche Erhöhung des Hsp70 Proteins im Serum vor Therapie, in dem G2 Stadium (5.436pg/ml) sowie dem G3 Stadium (6.145 pg/ml). Gleiches gilt für das Volumen: Ein G3 gegradeter Tumor ist im Schnitt größer als ein G2 gegradeter Tumor. Im Bezug auf das Tumorvolumen entspricht das der Normalverteilung. Es lassen sich im T-Test keine statistisch relevante Unterschiede zwischen G2 und G3 herausarbeiten: T-Test G2/ G3-Protein $p=0,81$; T-Test G2/ 3- Volumen $p=0,21$.

Schlussendlich entspricht somit eine Erhöhung des Differenzierungsgrads einer Erhöhung des Hsp70 Protein Serumlevels.

3.2.3 Darstellung Kollektiv Prostata/ Patienten mit Prostatakarzinomen

Im Zeitraum 2001 - 2003 wurden in der Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie des Klinikums rechts der Isar die Blutproben und Patientendaten mit Tumoren der Prostata gesammelt.

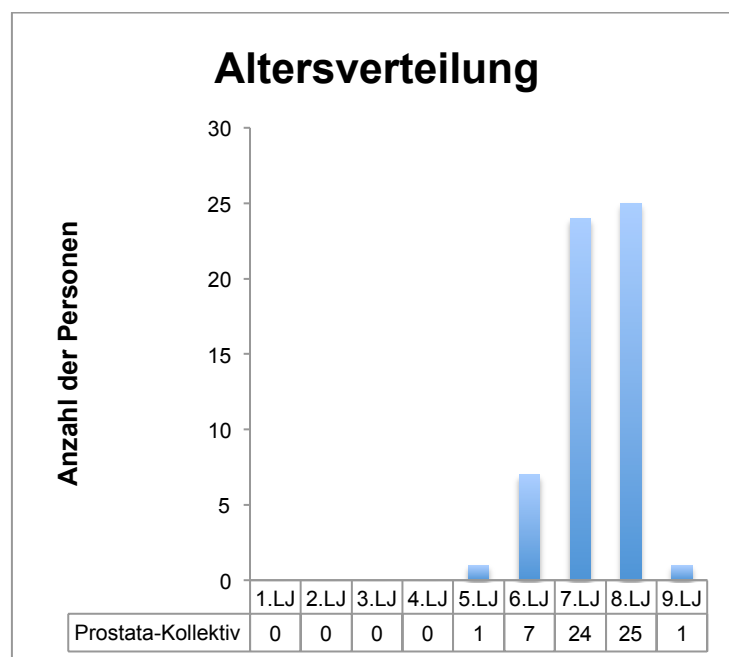


Abbildung 39 **Altersverteilung Tumorpatienten mit Prostatatumoren** (n=58). Angegeben ist die Anzahl der Patienten pro Lebensjahrzent. Der Mittelwert des Alters der Patienten liegt bei 86 Jahren, der Median liegt bei 69 Jahren. Das Alter der Patienten liegt im Range von 48 bis 86 Jahren.

Die Altersverteilung des Kollektivs zwischen dem 5. und 9. Lebensjahrzent ist normalverteilt. Ein Peak ist im 7. und 8. Lebensjahrzent zu beobachten. Diese Angaben decken sich mit der in der Literatur beschriebenen Altersverteilung (siehe Einleitung 1.3). Das Gesamtkollektiv besteht insgesamt aus 58 Männern (100%).

Eingeschlossen in unsere Studie wurden alle Patienten mit der Diagnose Prostatakarzinom, welche histopathologisch gesichert wurde. Den Patienten wurden vor der Strahlentherapie (RT=Radiotherapie) nach ca. 4 und 8 Wochen sowie nach 12 Monaten dreimal 5ml Blut abgenommen. Dies entspricht vor RT (01), während RT (02), nach RT (03) und in der Erholungsphase (05).

Alle klinischen Parameter dieses Kollektivs wurden uns von der Abteilung für Strahlentherapie zur Verfügung gestellt.

Die folgende Auswertung befasst sich mit verschiedenen Untergruppen dieses Gesamtkollektivs, da nicht immer alle Daten erfasst werden konnten und zum Teil die Anzahl der Patienten für valide statistische Auswertungen oder Ten-

denzen zu klein war. Im Folgenden wird auf die Hsp70 Serum Proteine und Antikörper Werte der ELISA Messung in Bezug auf verschiedene klinische Parameter eingegangen. Der Übersicht halber werden wenige exemplarisch ausgewählte klinische Parameter dargestellt, obgleich mehr untersucht wurden. Beispielsweise wurden klinische Parameter im Blut wie Leukozyten, Erythrozyten, C-reaktives Protein untersucht. Die erhobene Datenlage war aufgrund des langen Zeitraums zu lückenhaft, um valide Aussagen treffen zu können.

Folgende Abbildung zeigt den Hsp70 Protein im Serumwerte von Prostatakarzinompatienten vor der RT in Bezug zum Lebensalter.

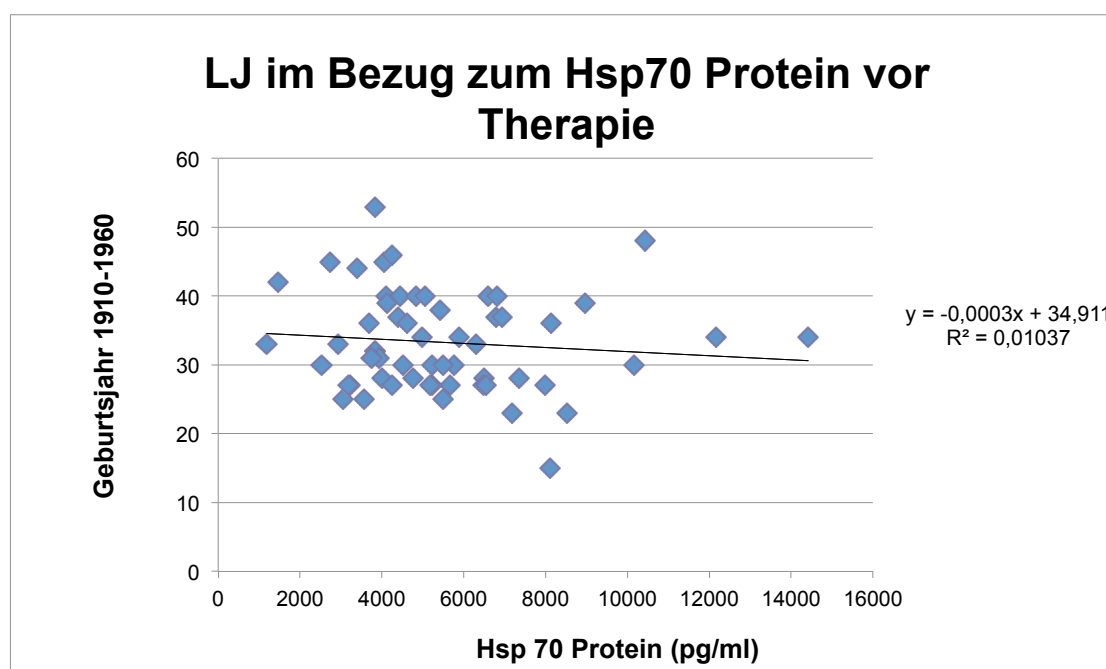


Abbildung 40 **Hsp70 Protein vor Therapie (01) im Bezug zum Lebensjahr**. Die Abbildung zeigt alle 01 (vor Therapie) Messungen des Kollektivs als Punktdiagramm (n=58). Jeder Punkt entspricht einem Patienten-Serumwert. Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Systems Hsp70 Protein ELISA untersucht. Der Meanwert des Normalkollektiv (mean normal) liegt bei 2.579,7pg/ml mit einer SEM% von 5,8% und ist diesmal nicht eingezeichnet. Auf der y-Achse kann man die Jahrzehnte der Geburtsjahre der Patienten ablesen (1910 bis 1960). Das Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2 = 0,01$.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass innerhalb unseres Kollektivs niedrige und hohe Hsp70 Protein Serumwertee nicht mit dem Alter der Karzi-

nompatienten korrelieren. Das heißt, das Alter ist bei unserem Kollektiv der Patienten mit Prostatakarzinomen eine unabhängige Variable.

Die folgende Abbildung zeigt eine Gesamtübersicht über das Prostatakarzinomkollektiv sowohl für Hsp70 Protein als auch für den Hsp70 Antikörper:

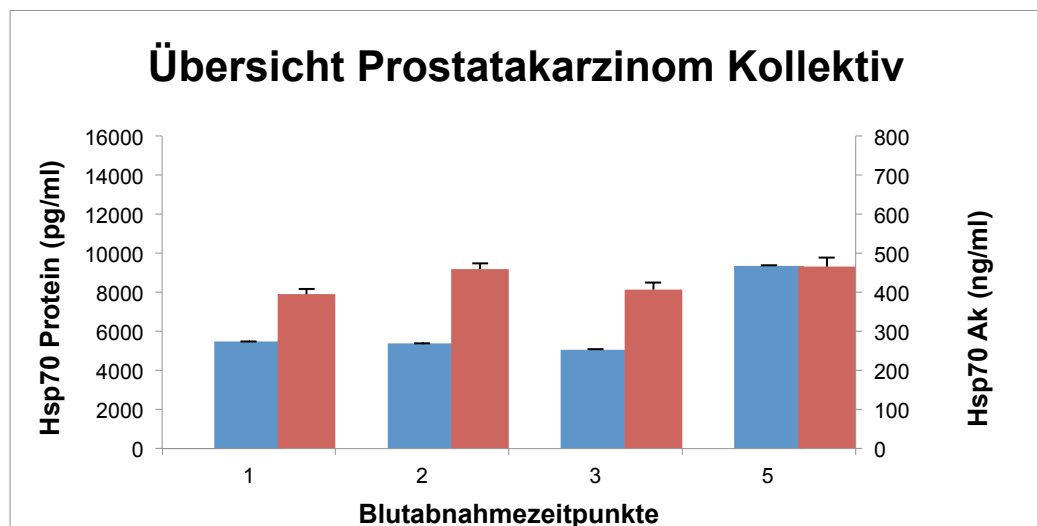


Abbildung 41 **Übersicht Prostatakarzinomkollektiv aller Messungen Hsp70 Protein (blau) und Hsp70 Ak (rot)**. Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Ak mittels selbst etabliertem Hsp70 Antikörper ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor RT (1), sowie nach 4 (2), 8 (3) Wochen und nach 12 (5) Monaten nach Therapie. Der Meanwert des Normalkollektivs für Hsp70 Protein (mean normal) liegt bei 2.579,7pg/ml mit einer SEM% von 5,8%. Der Meanwert des Normalkollektivs für den Hsp70 Ak bei 139,8ng/ml und einer SEM% von 35%. Mean/ SD/ n/ SEM sowie SEM% lassen sich in folgender Tabelle ablesen. Es ist zu beachten, dass die jeweiligen Werte mit einer unterschiedlichen n-Zahl in die Berechnung eingehen.

	1 = vor Therapie	2 = 4 Wochen	3 = 8 Wochen	5 = 12 Monate nach Therapie
Mean Protein (pg/ml)	5.484,0	5.392,4	5.074,5	9.369,7
SD	2.458,6	2.328,5	2.895,1	6.271,1
n	58	45	34	19
SEM	322,8	347,1	496,5	1.438,7
SEM%	5,89	6,44	9,78	15,35
Mean Ak (ng/ml)	395,4	459,2	407,4	465,7
SD	402,1	579,4	494,9	529,1
n	58	45	34	19
SEM	52,79	86,36	84,87	121,38
SEM%	13,13	14,91	17,15	22,94

Tabelle 37 **Übersicht Prostatakarzinomkollektiv alle Messungen Hsp70 Protein und Hsp70 Ak.** Der Mean ist eine Verrechnung aller Patientenproben einer Gruppe (1, 2, 3, 5). Der jeweilige einzelne Patientenwert wurde dreimal in voneinander unabhängigen ELISA Messungen in jeweils zweifacher Ausführung bestimmt .

Die Übersicht zeigt, dass alle erhobenen Hsp70 Protein Prostatakarzinomkollektivwerte über dem des Normalkollektivs liegen. Die Hsp70 Protein Serumwerte vor RT sowie die Werte 4 und 8 Monate nach Therapie liegen mit über 5.000pg/ml deutlich über dem Threshold des Normalkollektivs. Der Hsp70 Protein Serumwert 12 Monate nach Therapie ist mit über 9.000pg/ml nochmals deutlich gegenüber dem Normallevel erhöht. Sowohl SD als auch SEM% aller Messungen liegen in einem sehr niedrigen Bereich (siehe Tabelle 36).

Gleiches gilt für alle vier Abnahmezeitpunkte bezüglich des Hsp70 Ak Prostatakarzinomkollektivwertes. Er liegt immer über dem Threshold für Hsp70 Ak (139,8ng/ml). Die Werte streuen vor RT, 4,8 Wochen nach Therapie und 12 Monate nach Therapie um den Wert 400ng/ml. SD und SEM % liegen in einem tolerablen Bereich (siehe Tabelle).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass RT keinen Einfluss auf die Höhe des Hsp70 Protein Spiegels zu haben scheint, da die Werte Mean vor Therapie und Mean während Therapie (4 und 8 Wochen) auf einem Level sind (Range von 5.484,0pg/ml bis 5.074,5pg/ml). Die folgenden Abbildungen 42 a bis d zeigen den Hsp70 Protein Wert im Verlauf aller Patienten als Einzelwerte dargestellt.

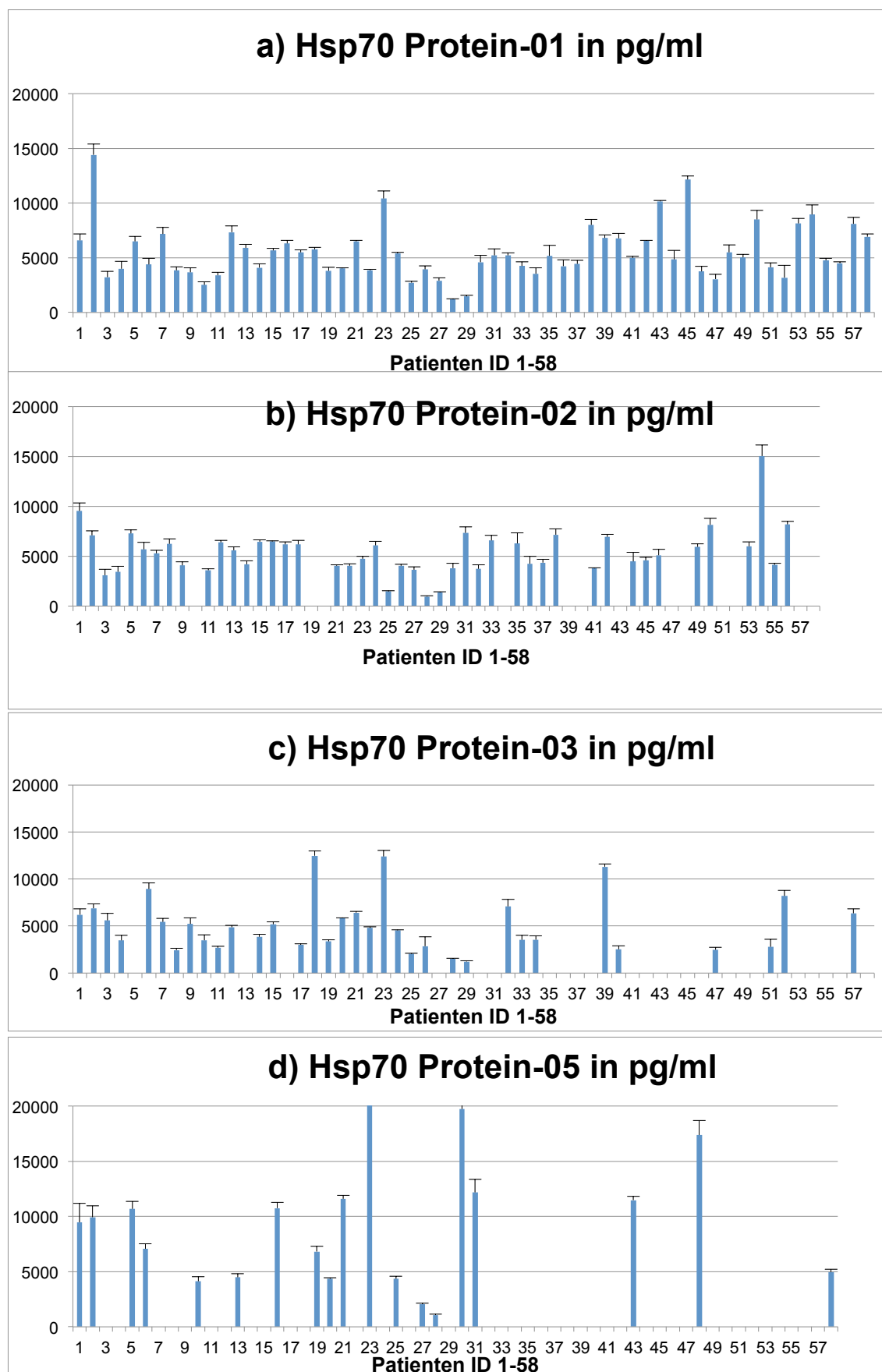


Abbildung 42 a-d Übersicht über Hsp70 Protein aller Patienten des Prostatakollektivs dargestellt als Einzelwert. a) Hsp70 Protein 01 b) Hsp70 Protein 02 c) Hsp70 Protein 03 d) Hsp70

Protein 05. Die Serumproben wurden auf Hsp70 Protein mittels R&D Hsp70 Protein ELISA, sowie auf Hsp70 Ak mittels selbst etabliertem Hsp70 Antikörper ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor RT (1), sowie nach 4 (2), 8 (3) und 12 (5) Monaten. Auf der x-Achse wurden die Patienten ID 1-58 und auf der y-Achse der Hsp70 Protein Wert (n=3 gemessen) in pg/ml aufgetragen.

Die Abbildungsreihe 42 a bis d veranschaulicht, dass im Verlauf der einzelnen Patientenhistorien eine große Variabilität zu verzeichnen ist. Aufgrund des Umfangs lassen sich leider nicht alle 58 Einzelverläufe als Einzelbalkendiagramme darstellen. Verfolgt man die Abbildung 42 a bis d, so kann man verschiedene Verläufe mit ansteigenden, abfallenden oder anderen Tendenzen erkennen. Für die Diskussion ist es wichtig, zwischen individuellen Verläufen und allgemeinen Tendenzen zu unterscheiden. Aufgrund der zu kleinen n-Zahl in der Gruppe 05 (12 Monate nach Therapie) und Lücken in der Dokumentation des klinischen Verlaufs ist eine exakte statistische Berechnung von Signifikanzen nicht erlaubt. Die 58 Protein Einzelverläufe wurden in Gruppen mit ansteigender, abfallender und gleichbleibender Tendenz in der Hsp70 Protein Konzentration unterteilt. Diese drei Verlaufsgruppen konnten keinem klinischen Korrelat wie Survival oder klinischen Blutparametern (Erythrozyten, Leukozyten, C-reaktives Protein, PSA, etc.) zugeordnet werden.

In den folgenden Abbildungen 43 a bis d wird in vier Streudiagrammen der Zusammenhang zwischen Hsp70 Protein und Hsp70 Antikörper über den Verlauf der vier Blutabnahmezeitpunkte dargestellt.

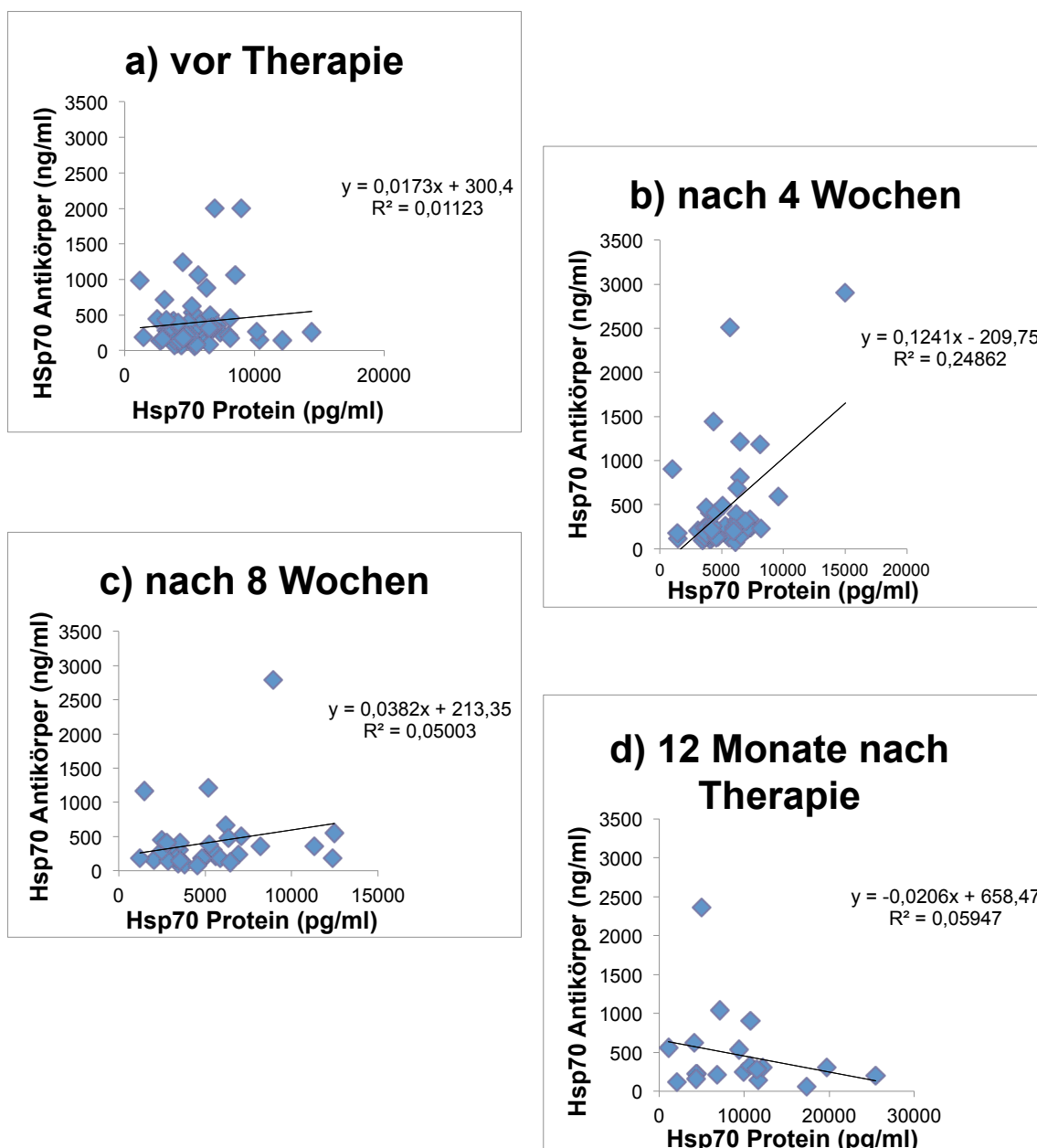


Abbildung 43 a-d **Zusammenhang des Hsp70 Proteins und des Hsp70 Antikörpergehalts im Gesamtverlauf des Prostatakarzinomkollektivs.** Auf der x-Achse aufgetragen die Hsp70 Protein in pg/ml . Auf der y-Achse dargestellt der Hsp70 Ak in ng/ml.

a) vor Therapie (01) b) nach 4 Wochen (02) c) Ak (03) vs. Protein (03) d) Ak (05) vs. Protein (05). Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein/ Ak mittels ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor RT, sowie nach 4, 8 und 12 Monaten. Auf der x-Achse aufgetragen die Hsp70 Protein in pg/ml . Auf der y-Achse der Hsp70 Ak in ng/ml. Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist in der jeweiligen Teilabbildung eingearbeitet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es keinen Zusammenhang in der Messung des Hsp70 Ak und des Hsp70 Protein Wertes gibt. Sie sind weder voneinander abhängig noch korrelieren sie. Es zeichnet sich auch kein Trend ab.

Die Abbildung 44 zeigt eine Aufsplitterung der Prostatakarzinom Patienten in primäre RT und adjuvante RT behandelte. Additiv wird das Kollektiv, das unter Zuhilfenahme eines rektalen Ballons bestrahlt wurde, dargestellt.

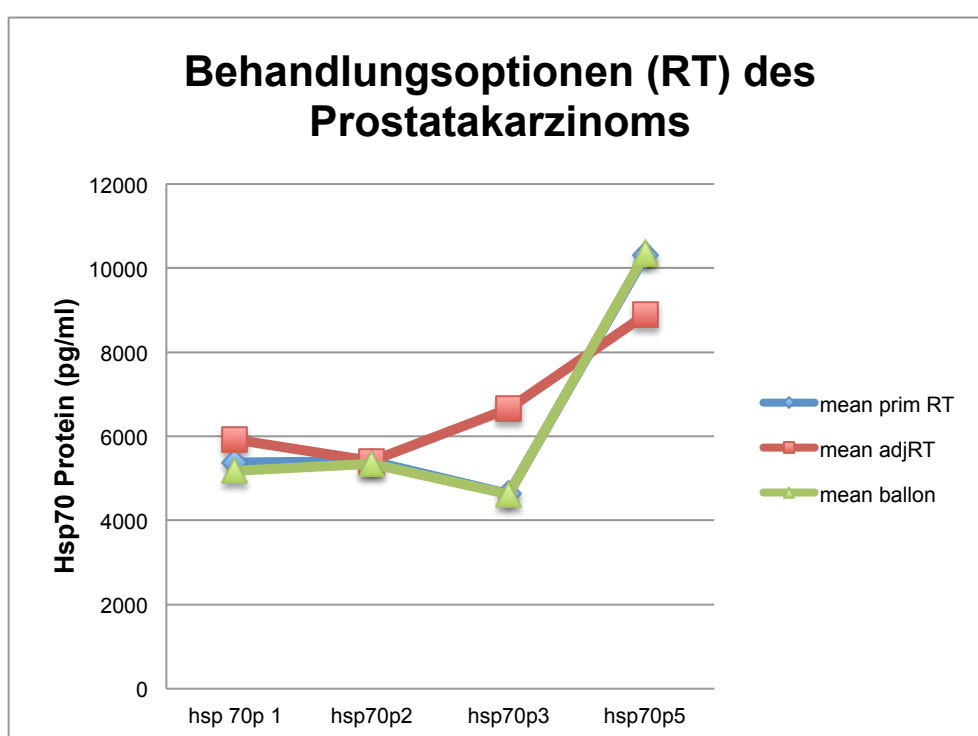


Abbildung 44 **Hsp70 Protein Werte der Prostatakarzinom Patienten unter primärer RT vs. adjuvanter RT und Ballonkollektiv.** Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Systems Hsp70 Protein ELISA untersucht. Dabei handelt es sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor RT, sowie nach 4 und 8 Wochen während der Therapie sowie 12 Monaten nach erster Blutabnahme. Meanwerte sowie n-Zahl können in der folgenden Tabelle abgelesen werden.

	Hsp70 Protein1 (pg/ml)	Hsp70 Protein2 (pg/ml)	Hsp70 Protein3 (pg/ml)	Hsp70 Protein5 (pg/ml)
Mean primRT	5.377	5.412	4.626	10.316
n	36	30	24	11
Mean adjRT	5.920	5.414	6.651	8.894
n	18	13	7	6
Mean Ballon	5.179	5.354	4.621	10.353
n	34	29	22	10

Tabelle 38 **Übersicht Hsp70 Protein Werte prim RT, adjuv RT und Ballonkollektiv** Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor RT (Protein1), sowie nach 4 (Protein2) und 8 (Protein3) Wochen während der Therapie sowie nach 12 Monaten (Protein5) nach erster Blutabnahme.

Die voran gegangene Abbildung 43 und Tabelle 37 veranschaulichen, dass die Therapieoption primäre vs. adjuvante RT keinen Einfluss auf das Hsp70 Proteinlevel haben. Auch eine lokale Manipulation durch den rektalen Ballon hat keinen sich abzeichnenden Einfluss auf die Hsp70 Proteinlevel. Hsp70 Protein ist somit nicht von der Art der RT abhängig.

Die Abbildung 45 zeigt den durchschnittlichen PSA Wert (prostataspezifisches Antigen) vor Therapie im Prostatakarzinomkollektiv:

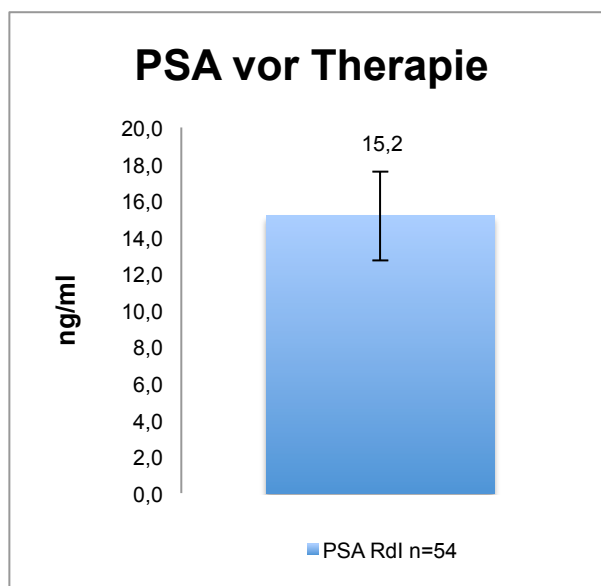


Abbildung 45 **PSA des Prostatakarzinomkollektivs in ng/ml vor Therapie**. Der Mean PSA vor Therapie liegt im Kollektiv bei 15,2ng/ml. Die SD Abw. liegt bei 17,9. Die n-Zahl beträgt 54, der SEM bei 2,4. Der Range des PSA Wertes reicht von 0,4pg/ml bis 90,2pg/ml.

Das Kollektiv zeigt damit im Durchschnittswert die typische Erhöhung des PSA Wertes bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms (siehe Einleitung 1.3). Die PSA Werte folgen der Normalverteilung. Aufgrund unserer Datenlage und der Betrachtung einzelner, individueller Verläufe des PSA und des Hsp70 Proteins konnte kein Zusammenhang zwischen den Hsp70 Protein Werten und dem PSA Level herausgearbeitet werden. Es besteht keine Korrelation zwischen Hsp70 Protein und PSA Level in unserem Kollektiv der Prostatakarzinome.

Der Gleason-Score ist ein weiterer wichtiger Prognosefaktor des Prostatakarzinoms (siehe auch Einleitung 1.3).

Abbildung 46 zeigt die Verteilungen des Gleason-Score in unserem Prostatakarzinomkollektiv:

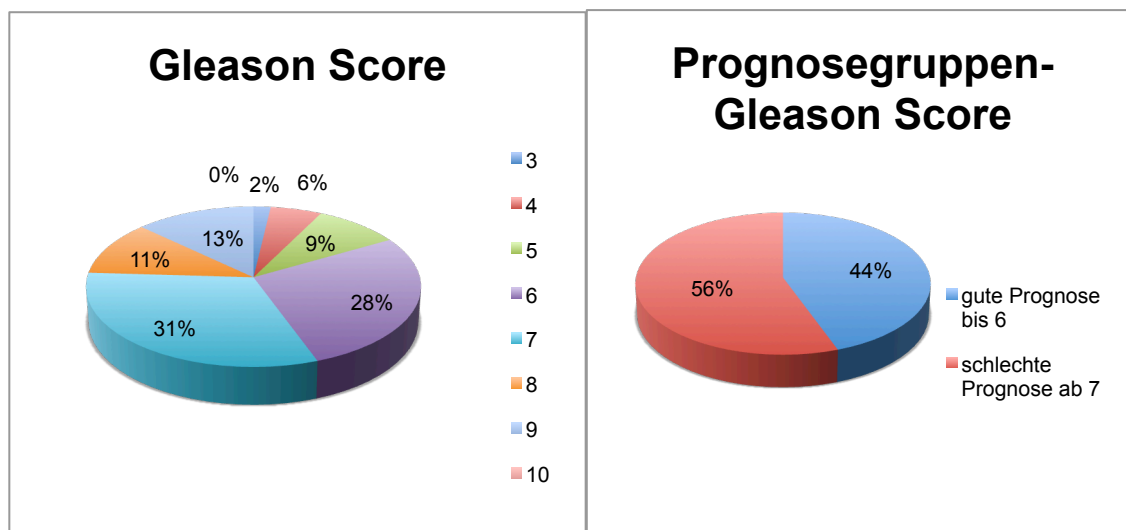


Abbildung 46 a-b **Gleason-Score Prostatakarzinomkollektiv** a) Gleason-Score Prostatakarzinom prozentuale Verteilung der Anzahl am Gesamtkollektiv b) Prognosegruppe Gleason-Score prozentuale Verteilung der Anzahl am Gesamtkollektiv. Die Verteilung des Gleason-Score setzt sich wie folgt zusammen: Gleason 3 n=1 mit 2%, Gleason 4 n=3 mit 6%, Gleason 5 n=5 mit 9%, Gleason 6 n=15 mit 28%, Gleason 7 n=17 mit 32%, Gleason 8 mit n=6 und 11%, Gleason 9 n=7 mit 13%, Gleason 10 nicht vorhanden. Als gute Prognosegruppe gilt der Gleason-Score bis 6 (n=24 und 44%), als schlechte Prognosegruppe der Gleason-Score ab 7 (n=30 und 56%).

Die Abbildung 47 zeigt die Verteilung des Hsp70 Proteins auf die verschiedenen Gruppen des Gleason-Score unseres Prostatakarzinomkollektivs:

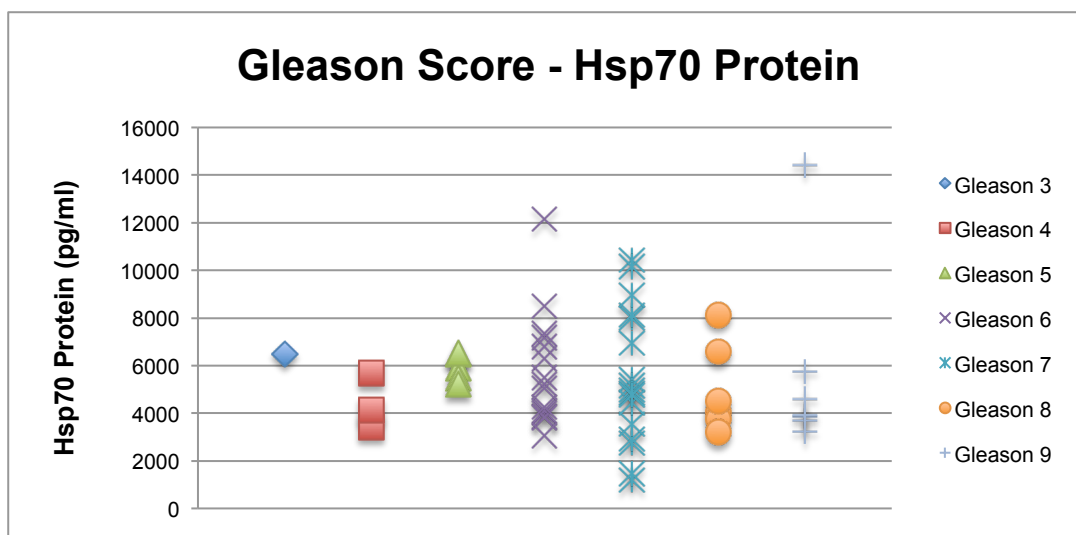


Abbildung 47 **Gleason-Score vs. Hsp70 Protein**. Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Systems Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Hsp70 Protein Serumwerte aller Patienten vor RT. Auf der y-Achse aufgetragen die Hsp70 Protein Werte in pg/ml als Einzelwerte (n-Zahl etc. siehe voraus gegangenen Abbildung und Tabelle). Auf der x-Achse aufgetragen die Gleason-Score in aufsteigender Reihenfolge.

Bei differenzierter Betrachtung der Untergruppen des Gleason-Score lässt sich keine Tendenz der Hsp70 Protein Serumlevels erkennen. Mit steigendem Gleason-Score kann man keinen Anstieg im Hsp70 Proteinlevel erkennen. Der Gleason-Score korreliert weder positiv noch negativ mit dem Hsp70 Proteinlevel. Deshalb folgt die gröbere Unterteilung in gute und schlechte Prognosegruppen des Gleason-Score (siehe hierzu auch Einleitung 1.3):

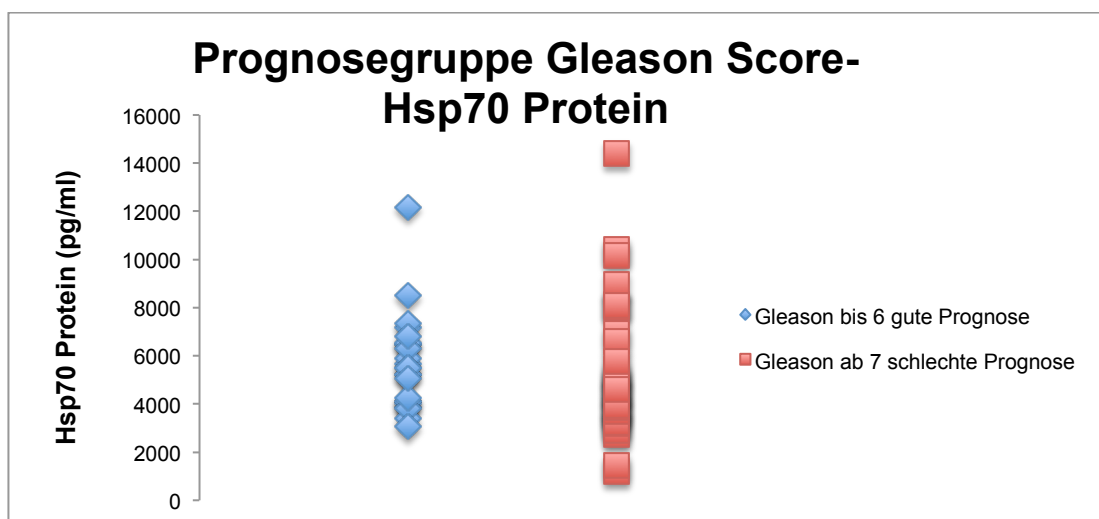


Abbildung 48 **Gleason-Score Prognosegruppe vs. Hsp70 Protein vor RT**. Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Hsp70 Protein Serumwerte aller Patienten vor RT. Auf der y-Achse aufgetragen die Hsp70 Protein in pg/ml als Einzelwerte (n-Zahl etc. siehe voraus gegangenen Abbildung und Tabelle). Auf der x-Achse wurde die Gleason Prognosescore aufgetragen. Die gute Prognosegruppe hat einen Mittelwert von 5.684pg/ml Hsp70 Protein und eine SD von 1.959, die n-Zahl beträgt 24 und der resultierende SEM ist 399. Das Hsp70 Protein der guten Prognosegruppe liegt im Range von 3.056pg/ml bis 12.161pg/ml. Die schlechte Prognosegruppe hat einen Mittelwert von 5.457pg/ml Hsp70 Protein und eine SD von 2.889, die n-Zahl beträgt 30 und der resultierende SEM ist 527. Das Hsp70 Protein der schlechten Prognosegruppe hat einen Range von 1.186pg/ml bis 14.414pg/ml.

Der Mittelwert der beiden Prognosegruppen des Gleason-Score zeigt keine Differenz, allenfalls der Range der schlechten Gruppe ist in unserem Kollektiv etwas erhöht, jedoch statistisch unerheblich. Das bedeutet, dass Hsp70 Protein Serumlevel in unserem Kollektiv keinen Zusammenhang mit dem Gleason-Score haben.

Die Abbildung 49 zeigt die Verteilung der T (NM) Stadien des Prostatakarzinomkollektivs:

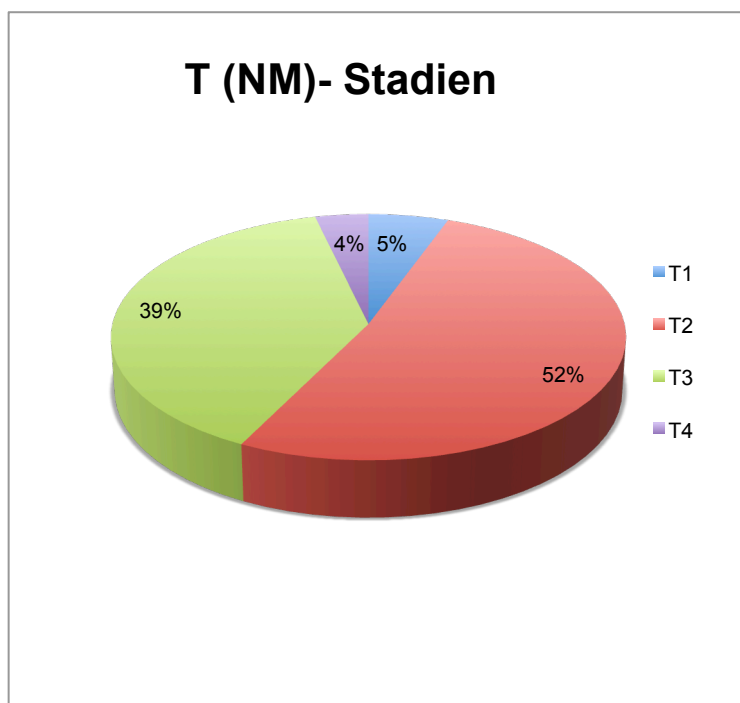


Abbildung 49 **T-Stadien Prostatakarzinomkollektiv vor Therapie** prozentuale Verteilung der Anzahl am Gesamtkollektiv. Die Verteilung der T-Stadien stellt sich wie folgt da: n=54. T1 mit n=3 und 6%, T2 mit n=28 und 52%, T3 mit n=21 und 39% sowie T4 mit n=2 und 4%.

Der prozentuale Hauptanteil der T-Stadien der Prostatakarzinom Patienten liegt im Bereich des Stadiums T2/ T3 (91%). Die Abbildung 50 zeigt nun die T-Stadien des Prostatakarzinomkollektivs in Bezug auf das Hsp70 Protein im Serum zunächst als Einzelzuordnung in Form eines Streudiagramms, danach als Gruppe in Form eines Balkendiagramms.

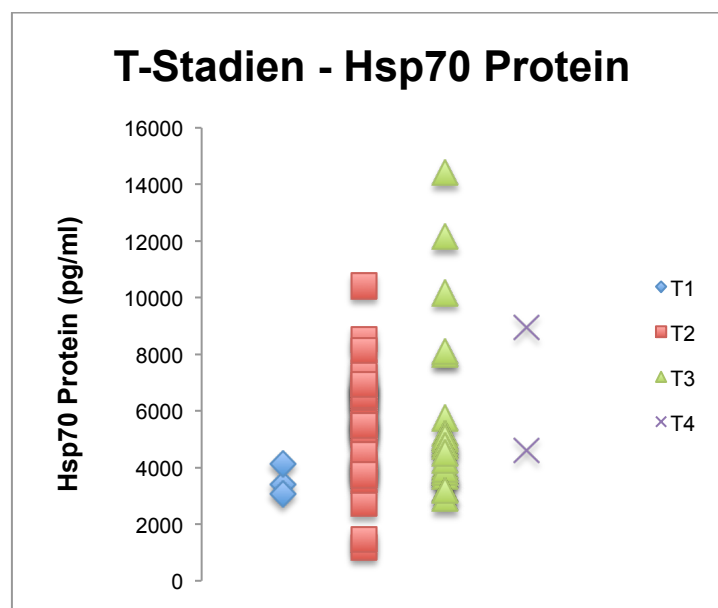


Abbildung 50 **Hsp70 Protein Einzelwerte** wurden den Stadien T1-T4 des Prostatakarzinoms zugeordnet. Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor RT. Auf der y-Achse aufgetragen die Hsp70 Protein in pg/ml als Einzelwerte (n-Zahl etc. siehe voraus gegangenen Abbildung und Tabelle). Auf der x-Achse aufgetragen T-Stadium in aufsteigender Reihenfolge.

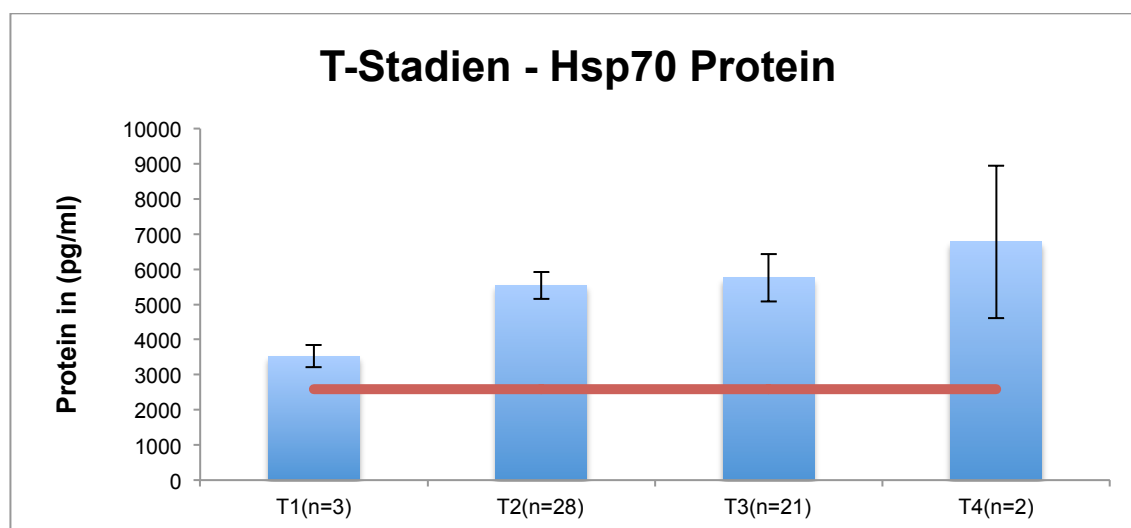


Abbildung 51 **Hsp70 Protein Meanwerte** wurden den Stadien T1-T4 des Prostatakarzinoms zugeordnet. Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Systems Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor RT als Meanwert mit der angegebenen n-Anzahl. Auf der y-Achse aufgetragen das Hsp70 Protein in pg/ml als Einzelwerte. Auf der x-Achse aufgetragen die T-Stadien in aufsteigender Reihenfolge. Die rote Hilfslinie zeigt den Threshold (rot) des Normalkollektivs bei 2.579,7pg/ml Hsp70 Protein. Alle weiteren Werte wie SD, SEM und Range können der folgenden Tabelle entnommen werden.

	T1 (n=3)	T2 (n=28)	T3 (n=21)	T4 (n=2)
Mittelwert	3.529,2	5.539,2	5.757,2	6.777,1
SD	546,3	2.045,1	3.097,6	3.074,7
n	3	28	21	2
SEM	315,4	386,5	676,0	2174,1
Min	3.055,7	1.186,2	2.914,6	4.603,0
Max	4.126,9	10.421,8	14.414,3	8.951,3

Tabelle 39 **Hsp70 Protein Meanwerte (Stadien T1-T4 des Prostatakarzinoms)**

Die Abbildung 50 und 51 sowie die Tabelle 38, zeigen einen Anstieg des Hsp70 Proteinlevels im Serum von Prostatakarzinompatienten mit steigendem T-Stadium. Je höher das T-Stadium desto höher die Hsp70 Proteinlevel im Serum der Prostatakarzinompatienten.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Serum Hsp70 Level im T1 Stadium bei 3.529pg/ml und damit wesentlich niedriger als im T4 Stadium mit 6.777pg/ml liegen. Aufgrund der geringen n-Zahl lässt sich aufgrund aktueller Datenlage keine Signifikanz errechnen, die Tendenz einer Signifikanz zeichnet sich jedoch entschieden ab.

3.2.4 Vergleich Kollektive

Das folgende Kapitel ist eine Zusammenschau aller bisher vorgestellten Kollektive (Patienten mit Tumoren des mesenchymalen Bindegewebes, Patienten mit Karzinomen des Kopf- und Hals-Bereiches, sowie Patienten mit Karzinomen der Prostata). Alle im Folgenden aufgeführten Werte wurden bereits einzeln dargestellt und mittels mathematischer Tests ausgewertet und näher analysiert. Das folgende Kapitel dient der Veranschaulichung der übergreifenden Rolle des Hsp70 Proteins in der Tumoronkologie. Die Volumendaten bzgl. der Tumorumfänge wurden nicht von mir erhoben und lediglich zum Vergleich mit meinen eigens erhobenen Hsp70 Protein Werten im Serum zur Verfügung gestellt.

Die Abbildungen 52 und 53 zeigen eine Übersicht der Initialwerte (Werte vor Therapie) aller oben genannten Kollektive im Vergleich zum Normalkollektiv:

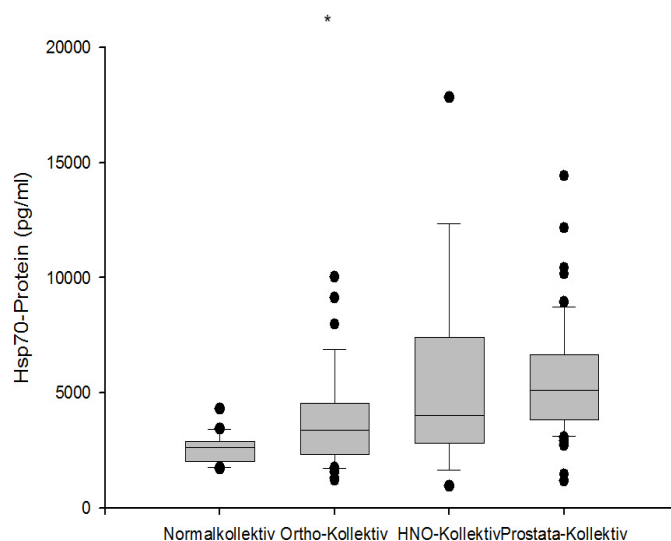


Abbildung 52 **Boxplot Übersicht Initialwerte vor Therapie aller Kollektive im Vergleich zum Normalkollektiv.** Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Systems Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor Therapie. Auf der y-Achse aufgetragen die Hsp70 Protein Serumwerte in pg/ml. Auf der x-Achse sind die Kollektive (Normalkollektiv, Ortho- maligne/ HNO-/ Prostatakollektiv) aufgetragen. Alle Werte können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

	Normal-kollektiv	Ortho-Kollektiv (benigne)	Ortho-Kollektiv (maligne)	HNO-Kollektiv	Prostatakollektiv
Mean (pg/ml)	2.579,7	1.688,5	4.329,9	5.348,9	5.558,2
SD Dev	674,3	520,4	4.470,7	4.114,3	2.499,2
SD Err	150,8	196,7	638,7	997,9	340,1
95%Conf	315,6	481,3	1284,2	2115,4	682,2
99%Conf	431,4	729,3	1713,2	2914,8	908,8
n	20	7	49	17	54
min	1.720,7	964,5	1191,8	948,2	1.186,2
max	4.294,8	2.609,6	31.959,3	17.821,0	14.414,3

Tabelle 40 **Werte für Boxplot Übersicht Initialwerte vor Therapie aller Kollektive im Vergleich zum Normalkollektiv**

Das Ortho-Kollektiv benigne (nur Lipome) wurde der Übersicht halber nicht dargestellt. Es lässt sich aber festhalten, dass es mit einem Mean von 1.688pg/ml Hsp70 Protein im Serum unter dem Threshold des Normalkollektivs anzusiedeln ist.

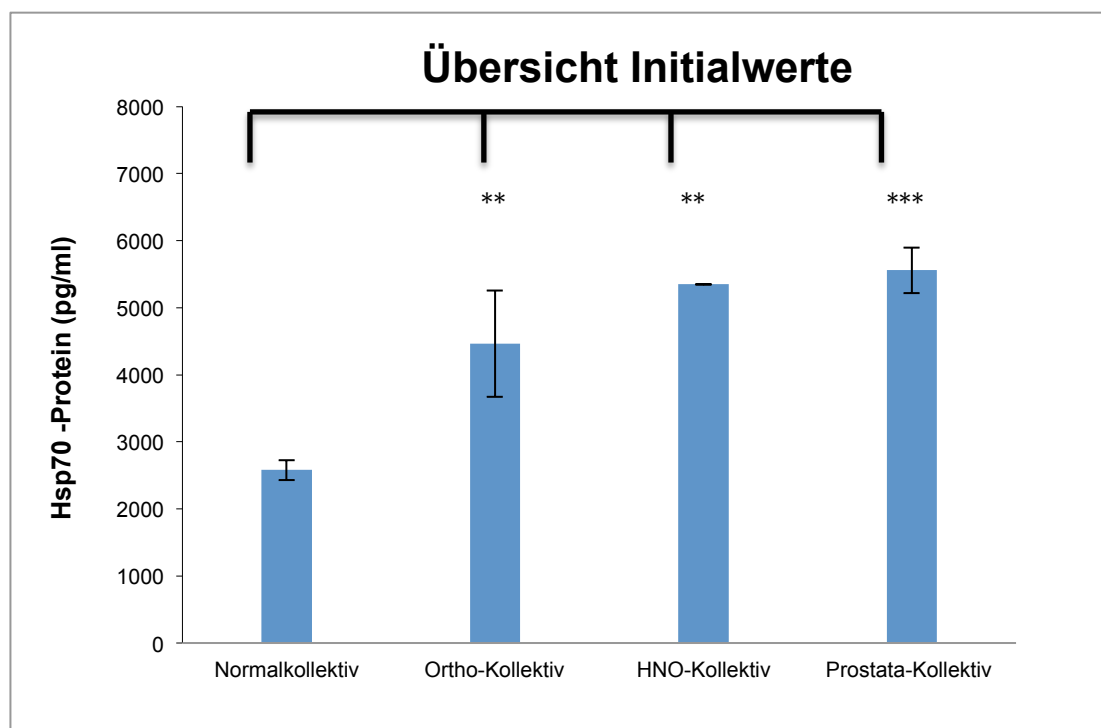


Abbildung 53 **Balkendiagramm Übersicht Initialwerte vor Therapie aller Kollektive im Vergleich zum Normalkollektiv.** Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Systems Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor Therapie. Auf der y-Achse wurden die Hsp70 Protein in pg/ml als Einzelwerte aufgetragen. Auf der x-Achse hingegen die Kollektive (Normalkollektiv, Ortho- maligne/ HNO-/ Prostata-kollektiv). Alle Werte können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden. Der T-Test der Kollektive ergab folgende Ergebnisse:

Normal/Ortho maligne	p=0,01	**
Normal/HNO	p=0,01	**
Normal/Prostata	p=2,04E ⁻¹¹	***

	Mean Protein (pg/ml)	SD	SEM	SEM%	n
Normalkollektiv	2.579,6	674,3	150,8	5,8	20
Ortho-Kollektiv ma- lign	4.464,0	1.374,2	793,4	17,8	41
HNO-Kollektiv	5.348,9	4.114,3	4,1	0,1	17
Prostatakollektiv	5.558,2	2.499,2	340,1	6,1	54

Tabelle 41 Werte für Balkendiagramm Übersicht Hsp70 Protein Initialwerte aller Kollektive

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle malignen Tumorkollektive (Normalkollektiv, Ortho-/ HNO-/ Prostatakollektiv) gegenüber dem Vergleichskollektiv, in ihrer Hsp70 Protein im Serum Konzentration erhöht sind. Alle drei Tumorkollektive sind signifikant erhöht in ihrem Hsp70 Proteinlevel vor Therapie gegenüber dem Normalkollektiv. Das Ortho-Kollektiv maligne und HNO-Kollektiv weisen einen Korrelationskoeffizient von 0,01** auf, das Prostatakollektiv einen Korrelationskoeffizienten von $2,04E^{-11***}$. Unser benignes Ortho-Kollektiv liegt unterhalb des Wertes des Thresholds des Normalkollektivs.

Somit kann man festhalten, dass im Vergleich zu dem benignen Kollektiv Orthopädie, alle malignen Kollektive einen erhöhten Hsp70 Protein Serumspiegel vor Therapie aufweisen.

Es folgt nun die Betrachtung des Tumorumfanges der verschiedenen Kollektive im Vergleich zueinander. Danach erfolgt die Zusammenschau der Hsp70 Protein Konzentration im Serum vor Therapie der verschiedenen Kollektive.

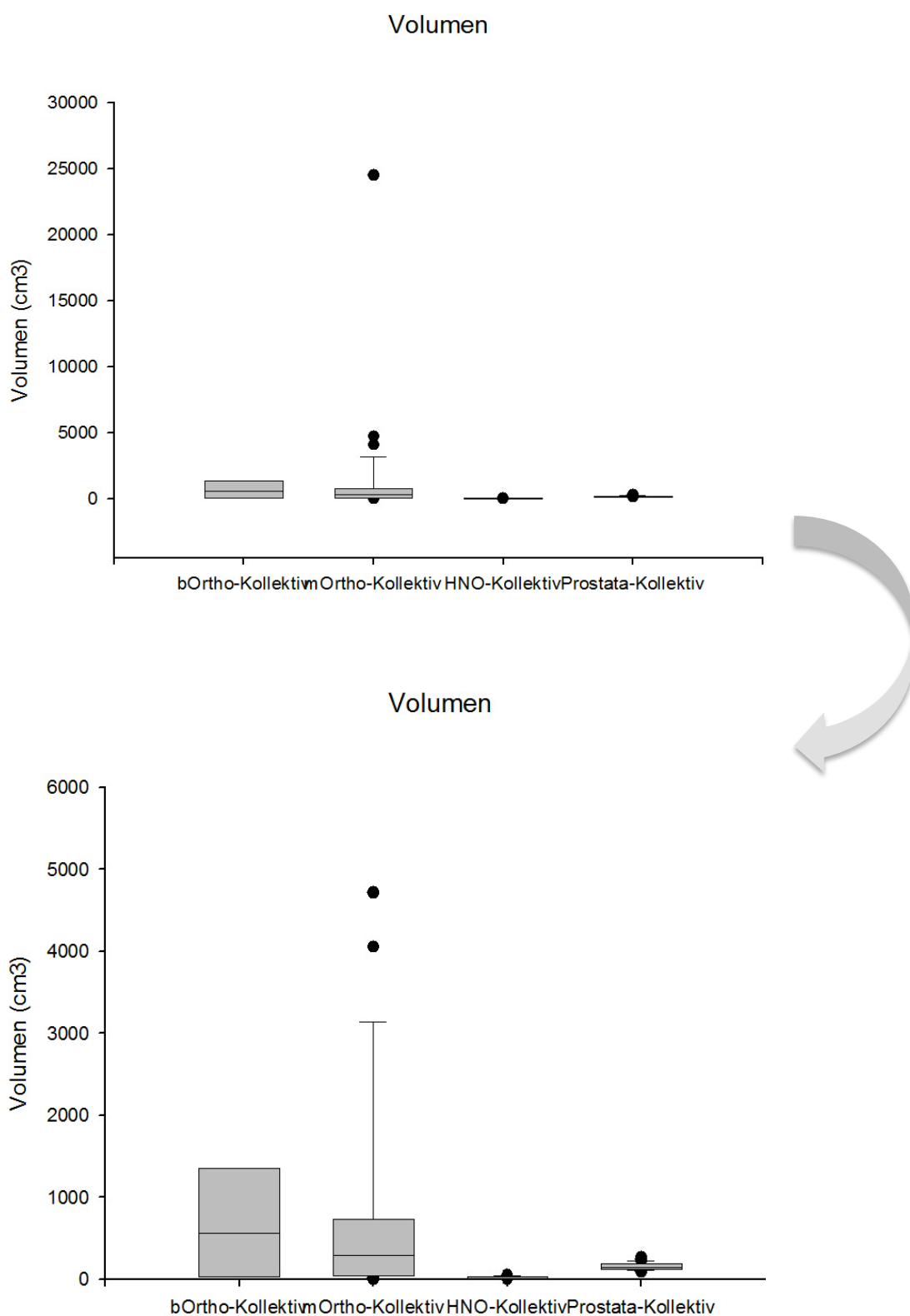


Abbildung 54 **Boxplot Übersicht Tumolvolumen aller Kollektive**. Auf der y-Achse aufgetragen wurden die Tumolvolumina in cm^3 (verschiedene Skalierungen). Auf der x-Achse aufgetragen sind die Kollektive (Normalkollektiv, Ortho- maligne/ HNO-/ Prostatakollektiv). Alle Werte können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden. Das Tumolvolumen wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Orthopädie und der Abteilung für Strahlentherapie, durch Analyse der initialen CT Bilder, erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

	Ortho-Kollektiv (benigne)	Ortho-Kollektiv (maligne)	HNO-Kollektiv	Prostatakollektiv
Mean (cm ³)	651,8	1.332,7	16,8	157,5
SD Dev	666,3	4.168,4	14,3	42,9
SD Err	384,6	704,5	4,1	5,9
95%Conf	1.651,7	1.431,9	9,1	11,9
99%Conf	3.762,6	1.922,5	12,8	15,9
Size	3	35	12	54
Total	1.955,6	46.644,7	202,4	8.195
min	32,9	6,3	3,4	91
max	1.357,1	2.4504,4	46,1	270

Tabelle 42 Werte für Boxplot Übersicht Tumorvolumen aller Kollektive

Die Boxplots in Abbildung 54 zeigen, dass das Ortho-Kollektiv maligne die größte Streuung aufweist (min 6,3cm³, max 24.504,4cm³). Gleichzeitig weist dieses Kollektiv mit 1.332cm³ auch das größte Durchschnittsvolumen auf, gefolgt vom Ortho-Kollektiv benigne mit 651cm³ Tumorzvolumen. Das Prostatakollektiv hat ein Tumor-Durchschnittsvolumen von 157,5cm³. Das Tumorzvolumen des HNO-Kollektivs beträgt 16,8cm³.

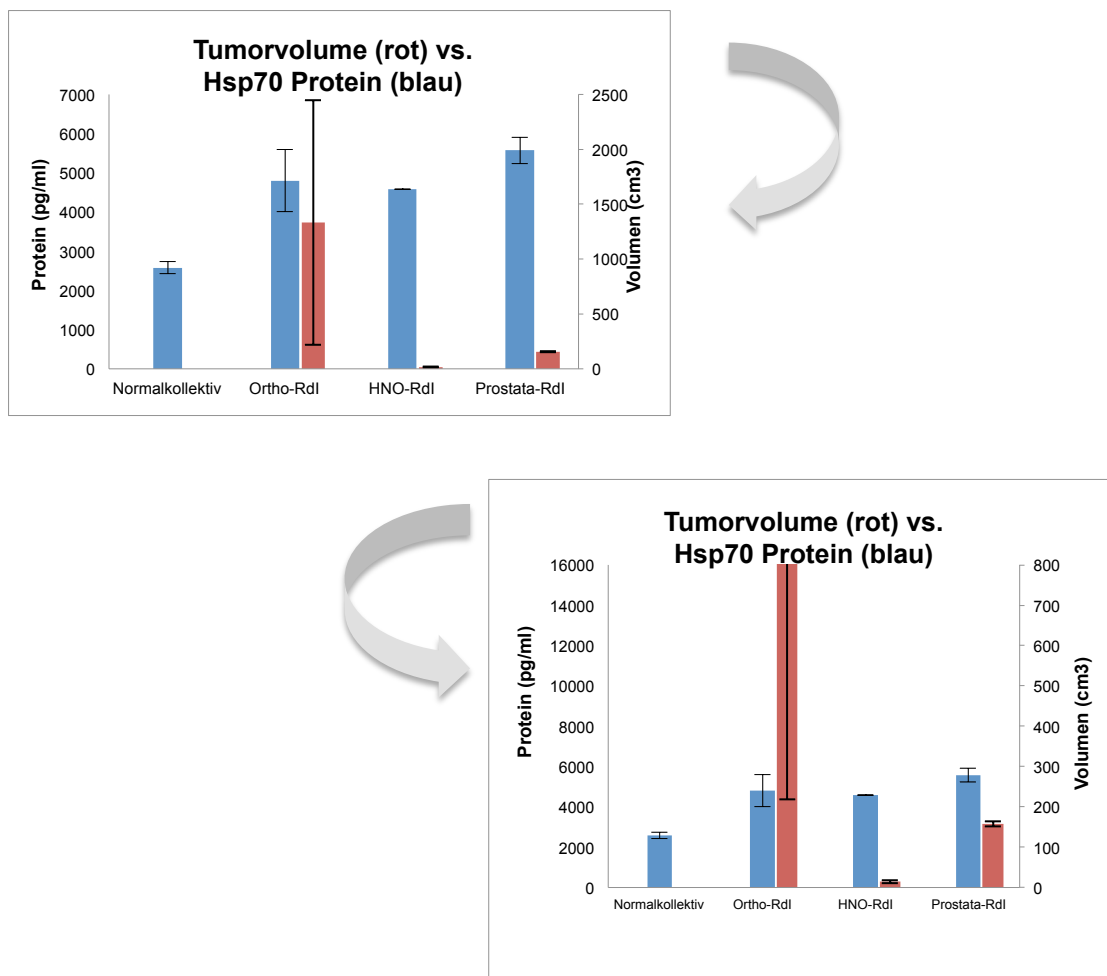


Abbildung 55 **Balkendiagramm Übersicht Tumorvolumen und Hsp70 Protein aller Tumorkollektive.** Es wurden die Serumproben auf Hsp70 Protein mittels R&D Systems Hsp70 Protein ELISA untersucht. Es handelt sich hierbei um die Serumwerte aller Patienten vor Therapie. Zu beachten ist die verschieden skalierte y1 und 2 – Achse. Auf der y2-Achse aufgetragen die Tumor Volumina in cm³. Auf der y1-Achse aufgetragen das Hsp70 Protein in pg/ml. Auf der x-Achse sind die Kollektive (Normalkollektiv, Ortho- mailgne/ HNO-/ Prostatakollektiv) aufgetragen. Alle Werte können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

	Mean Protein (pg/ml)	SEM	Mean Tumorvolumen (cm ³)	SEM
Normalkollektiv	2.579,65	150,8		
Ortho-maligne	4.797,0	793,4	1.332,7	1.114,06
HNO	4.584,9	4,1	14,4	3,56
Prostata	5.573,8	340,1	157,6	5,96

Tabelle 43 Werte **Balkendiagramm Übersicht Tumorvolumen und Hsp70 Protein aller Tumorkollektive**

Der Vergleich Hsp70 Protein im Serum vor Therapie zum Tumorvolumen in allen Karzinomkollektiven (Ortho- maligne/ HNO-/ Prostatakollektiv) zeigt, dass das Tumorvolumen und die Konzentration des Hsp70 Proteins im Serum vor Therapie weder positiv noch negativ korrelieren. Es lässt sich kein Zusammenhang der Tumorgroße und des Hsp70 Proteinlevels im Serum in den untersuchten Tumorkollektiven aufweisen.

4 Diskussion

4.1 Hsp70 Protein im Serum - ein potentiell prognostischer Parameter bei Tumorpatienten?

In zentrale Prozesse wie die Proteinhomöostase involviert, spielt das Chaperon Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) in der Zelle eine zentrale Rolle. Es reguliert antiapoptotische Wirkmechanismen, um so seine intrazellulär protektive Funktion zu erfüllen. Hsp70 Expression kann durch mannigfaltige exogene und endogene Stimuli induziert werden, wie oxidativer Stress, Hitze, Hypoxie, etc. (Hartl et al., 2002; Multhoff, 2007). Neben seiner intrazellulären Lokalisation konnte das Hsp70 auch auf der Plasmamembran von Tumorzellen, sowie auf der Membran von Virus und Bakterien befallenen Zellen und im Extrazellularraum nachgewiesen werden. Je nach Lokalisation des Hsp70 (intra- oder extrazellulär) erfüllt es zytoprotektive Funktionen oder greift immunregulatorisch ein. Vor allem die immunregulatorische Funktion ist mit zentralen Prozessen in Tumorzellen vergesellschaftet. Beispielsweise konnte man zeigen, dass das membrangebundene Hsp70 auf Tumorzellen, nicht jedoch auf Referenzgewebe, von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) spezifisch erkannt wird (Sherman et al., 2007). Es gelang bereits mehrfach, erhöhte intrazelluläre Hsp70 Expression in Zellen solider Tumore nachzuweisen (Sherman et al., 2007). Zusätzlich konnte bei vielen Tumorarten (Melanome, Kopf-Hals-Karzinome, Sarkome, Leukämien) eine Membranexpression von Hsp70 nachgewiesen werden. Niemals gelang dies bei gesunden Zellen (Farkas et al., 2003; Gehrmann et al., 2003; Kleinjung et al., 2003; Lehnerer, 2012; Multhoff et al., 1995; Multhoff et al., 2011). Vielfältige Interaktionen zwischen Hsp70 und der Tumorbiologie konnten gezeigt werden, so korreliert eine erhöhte Hsp70 Expression mit schlechtem Ansprechen auf Chemotherapie (Therapieresistenz) und niedrigen Überlebensraten (Calderwood et al., 2006; Didelot et al., 2007; Jaattela, 1999; Shu et al., 2008).

Bisher wurde verstärkt das Feld der Tumorzellbiologie beforscht. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse stellte sich die Frage, ob Patienten mit membranpositiven Tumoren auch ein erhöhtes Hsp70 (Protein und Antikörper) im Blut im Vergleich

zu gesunden Patienten aufweisen. Es gilt zu klären, ob dem gelösten Hsp70 im Serum ähnliche prognostische Eigenschaften zugeschrieben werden können, wie bereits für die membrangebundene Hsp70 Expression in Tumorzellen gezeigt wurde. Kurzgefasst: *Bestimmung der Hsp70 Protein- und Antikörpergehalte im Blut von Tumorpatienten als potentiell prognostischer Marker.*

Für die klinische Anwendung wäre es von großem Vorteil, einen minimal-invasiven, blutbasierenden Test zu haben, um Diagnostik, Screening und Monitoring von Tumorerkrankungen zu verbessern (Hanash et al., 2011). Mit dieser Zielsetzung wurde zwei Jahre lang im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Hsp70 Antikörper ELISA entwickelt und der Hsp70 Protein ELISA der Firma R&D Systems modifiziert, bis der Hsp70 Gehalt bzgl. Protein und Antikörper im Serum valide, zuverlässig und reproduzierbar bestimmt werden konnte.

In unterschiedlichen Versuchsanordnungen wurde die bestmögliche Versuchsanordnung ermittelt, um Hsp70 Protein und Antikörper im Serum von Menschen zu bestimmen. Im Folgenden werden die wichtigsten Schritte in der Etablierung und Modifikation dargestellt, diese wurden in mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen (n=3) getestet.

Zunächst wurde mit der Etablierung des Hsp70 Antikörper ELISA begonnen. Hierzu wurden verschiedene Typen und Konzentrationen des Coating und Detection Antikörpers getestet (MAB 1663 1:2.000; AF 16631:5.000; 1:2.000; 1:2.500, anti rabbit IgG 1:10.000, anti mouse IgG1:10.000, anti human IgG1:10.000). Anhand einer vorher bestimmten Menge Hsp70 Antikörper, die auf die Platte als Messmuster gegeben wurden und der Eichkurve unseres Standards, konnte eine Antikörperkonzentration von 1:2.000 für das Coating in 0,1M Carbonatpuffer bestimmt werden. Zur Detektion wurde humanes IgG-HRP in einer Konzentration von 1:10.000 eingesetzt. Ebenfalls musste die Konzentration des Waschpuffers (Tween®20 in PBS 0,00%, 0,05% und 1,00%) optimiert werden. Als großer Störfaktor des Hsp70 Protein ELISAs stellte sich das zum Blocken verwendete BSA (siehe 2.1.1 BSA A 9647 96% Reinheitsstufe; BSA A 7030 98% Reinheitsstufe) heraus. Je unreiner die Reinheit von BSA war (laut Herstellerangaben), desto mehr unspezifische Bindungen und desto mehr Störeinflüsse zeigten sich im Hsp70 Protein ELISA. Bei Verwendung des BSA A 9647 mit 96% iger Reinheitsstufe im Vergleich zur Verwendung des BSA A 7030 mit 98% iger Reinheitsstufe wurden bis zu 120% Abweichung im Blank

gemessen. Schlussendlich wurde das BSA A 7030 verwendet. Die Arbeitsgruppe Rober V. Vogt analysierte das unspezifische Bindeverhalten verschiedener zum Blocken verwendeter Proteine. Sie postulierten, dass letztlich für jedes Versuchsprotokoll die Blocksubstanz empirisch ausgetestet werden muss (Vogt et al., 1987). Neben der genauen Selektion und Konzentration der verwendeten Chemikalien musste auch die Wahl der verwendeten Materialien genauestens ausgetestet werden. Die 96 Well Platten der Firma Costar (siehe 2.1.3 Costar EIA/ RIA Platten; Nunc immuno Plate Thermo Fisher Scientific) waren für den Hsp70 Protein ELISA besser geeignet. Von besonderer Bedeutung war auch die Etablierung der Inkubationsbedingungen. Alle Reaktionen des ELISA unterliegen der van't Hoff'schen Regel, diese besagt, dass chemische Reaktionen bei einer Erhöhung der Temperatur um 10 Kelvin doppelt bis viermal so schnell ablaufen (Holleman et al., 1995). Um die Reaktion während der verschiedenen Versuche immer gleichbleibend zu halten, wurde standardmäßig die ELISA Platte immer mit einem Sealer verschlossen und in einer Box bei 27°C inkubiert. Durch die Verwendung von Sealern konnte der Verlust von Flüssigkeit durch Verdunstung reduziert werden (siehe Abbildung 10). Die Inkubationszeiten sind (Kapitel 2.2.4) je nach Inkubationsschritt unterschiedlich. Nur so konnte gewährleistet werden, dass keine Variabilität in der OD durch verschieden schnell ablaufende Reaktionen erhalten wurde. Um die Vergleichbarkeit der Testergebnisse von Platte zu Platte zu verbessern, wurde eine parallel mitgemessene Vergleichsprobe für den Hsp70-Protein-ELISA (Hsp70 Protein 1,6mg/ml recombinant human von Assay Design; 2500pg/ml) etabliert. Grobe und systematische Messfehler können so schnell und effizient erkannt werden. Auch das Auftauverfahren der Serumproben wurde standardisiert. Eine Lagerung bei zu hohen Temperaturen und zweifaches oder mehrmaliges Auftauen und Einfrieren stehen im Verdacht, mit Ausreißerwerten assoziiert zu sein. Serumproben wurden deshalb schnellstmöglich verarbeitet und bei -20°C gelagert. Der Auftauprozess vor Verdünnung der Probe wurde auf Eis durchgeführt (siehe auch Abbildung 11). Mehrfach aufgetaute Serumproben wurden nicht mehr für ELISA Zwecke verwendet. Die Etablierung des Hsp70 Antikörper ELISA zeigte eine Inter-ELISA-SEM% und eine ELISA zu ELISA-SEM% von zumeist unter 30%, die Modifikation des Hsp70 Protein ELISA erbrachte eine Intra-

ELISA-SEM% von unter 15% und eine ELISA zu ELISA-SEM% von unter 10%. Werte die über diesem Bereich lagen wurden erneut (n=3) gemessen.

Nachdem zuverlässige und hochsensitive Hsp70 Protein und Hsp70 Antikörper ELISA als Arbeitsmethode zur Verfügung standen, wurde ein Kontrollkollektiv vermessen, um einen Schwellenwert (Normal-Range oder Threshold) festlegen zu können. Initial wurden 21 Probanden in die Untersuchung eingeschlossen. Die Einschlusskriterien waren vollständige Gesundheit und keine regelmäßige Medikamenteneinnahme. Gesundheit wurde deshalb als Einschlusskriterium gewählt, da bei Inflammation und Fieber die intrazelluläre Hsp70-Transkription erhöht wird (De Maio, 1999), um die Proteinaggregation zu verhindern und protektiv auf die Zellhomöostase zu wirken (Multhoff, 2007). Die Verteilung der Geschlechter im Normalkollektiv lag bei 68% Frauen und 32% Männern. Es wurden dreimal 5ml Blut entnommen. Initial zum Start der Vermessung sowie nach 4 und 8 Wochen. Bei 3 Probanden floss additiv ein zusätzlicher Jahreswert ein. Es konnten keine signifikanten Schwankungen bei den gesunden Probanden im Verlauf beobachtet werden. Ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Als Mittelwert des Hsp70 Proteins im Normalkollektiv errechnet sich der Wert 2.575,7 pg/ml Hsp70 Protein im Serum. Dieser Wert wurde als Referenz und Schwellenwert festgelegt. Ebenfalls wurde ein Schwellenwert für den Hsp70 Antikörper Gehalt im Blut festgelegt. Er lag bei 139,8 ng/ml.

Untersuchungen der Arbeitsgruppen Attila Molvarec zeigten 0,28 (0,03-0,59) ng/ml Serum Hsp70 Level in der Kontrollgruppe (n=70) (Molvarec et al., 2009). Die Arbeitsgruppe um Yeh beschreibt einen Hsp70 Plasma Spiegel in der Kontrollgruppe von 4,93 ng/ml (1,75-24,68) (n=95) (Yeh et al., 2009). Die Arbeitsgruppe Dutta legt die Kontrolle bei 0,04ng/ml (n=10) fest (Dutta et al., 2012). Es lässt sich somit festhalten, dass die Hsp70 Level im Serum kontrovers in der Literatur diskutiert werden.

Nachdem der Hsp70 Gehalt bei gesunden Patienten mit unserem ELISA bestimmt wurde, konzentrierte sich diese Arbeit auf 3 weitere Patientenkollektive mit soliden Tumoren. Nach histopathologischer Diagnosestellung wurden (n=44) Patienten mit Tumoren des Binde- und Stützgewebes, Patienten mit

Kopf- Hals-Tumoren (n=15) sowie Patienten (n=58) mit einem Prostatakarzinom hinsichtlich ihres Hsp70 Serum Spiegels untersucht.

Das Tumorkollektiv der Patienten mit Tumoren des Binde- und Stützgewebes umfasst im „malignen Ortho-Kollektiv“ die Entitäten Osteosarkom, Liposarkom und Chondrosarkome, im „benignen Ortho-Kollektiv“ die Entität der Lipome und Enchondrome. Das Kollektiv der Kopf-Hals-Tumore setzt sich aus Larynxkarzinomen, Oropharynx-/ Hypopharynxkarzinomen, Tonsillenkarzinomen, Zungenkarzinomen und Nasennebenhöhlenkarzinomen zusammen. Das dritte Kollektiv der soliden Tumore umfasst Prostatakarzinome. Um Aussagen über den Hsp70 Verlauf zu erlangen, wurden Blutabnahmen im Zeitraum vor, während und nach der Therapie gewählt. Die genauen Abnahmezeitpunkte lassen sich dem Kapitel 3.3 entnehmen. Es wurde abermals der vorher etablierte und modifizierte Hsp70 Protein ELISA und der Hsp70 Antikörper ELISA verwendet, um die Serumproben zu vermessen. Im Folgenden werde ich zunächst die Tumorkollektive im Vergleich zum Normalkollektiv diskutieren und danach auf die einzelnen Kollektive nochmals im Detail eingehen und besondere klinische Merkmale herausarbeiten.

Betrachtet man die Hsp70 Protein Serum Level der Patienten mit malignen Tumoren vor Therapie, so findet sich im Kollektiv der Tumore des Stütz- und Bindegewebes ein Durchschnittswert von 4.464,0pg/ml, im Kollektiv der Kopf-Hals-Tumore ein Durchschnittswert von 5.348,9pg/ml und im Prostatakarzinomkollektiv ein Durchschnittswert von 5.558,2pg/ml (siehe auch 3.3.1 Tabelle 40). Somit liegen alle eben erwähnten Tumorkollektive über dem Range des Normalkollektivs mit 2.579,6pg/ml Hsp70 Protein im Serum. Als eine Kernaussage dieser Arbeit lässt sich zusammenfassen, dass alle malignen Tumorkollektive in ihrem Hsp70 Proteinlevel vor Therapie signifikant über dem Level des Normalkollektivs liegen. Für das Kollektiv der Tumore des Binde- und Stützgewebe und der Kopf-Hals-Tumore beträgt der p-Wert 0,01 für das Kollektiv des Prostatakarzinompatienten beträgt das p-Wert $2,04E^{-11}$. Abe beschreibt erhöhte Plasma Hsp70 Werte für Patienten mit lokalisierten unbehandelten Prostatakarzinomen (n=68;0,8ng/ml) im Vergleich zu seiner Kontrollgruppe (n=45;0,5ng/ml), dies bestätigt nicht die von uns gemessenen Werte (Abe et al., 2004). Untersuchungen der Arbeitsgruppen Attila Molvarec zeigten 0,28 (0,03-0,59) ng/ml Se-

rum Hsp70 Level in der Kontrollgruppe (n=70), sowie 0,58 (0,15-3,47) ng/ml Hsp70 im Serum von Patienten mit einer Präeklampsie (Molvarec et al., 2009). Die Arbeitsgruppe um Yeh beschreibt einen Hsp70 Plasma Spiegel in der Kontrollgruppe von 4,93ng/ml (1,75-24,68) (n=95). Das Hsp70 Level von Patienten in der chronischen Phase einer chronischen myeloischen Leukämie setzen sie bei Durchschnittlich 38,34 (3,89-128,17) ng/ml Hsp70 Plasmaspiegel an (Yeh et al., 2009). Die Arbeitsgruppe Dutta legt die Kontrolle bei 0,04ng/ml (n=10) fest, die Gruppe der Pankreaskarzinome in der gleichen Studie liegt bei 1,68ng/ml (n=23) (Dutta et al., 2012). Es lässt sich somit festhalten, dass die Hsp70 Level im Serum erhöht sind in verschiedenen Krankheitskollektiven im Vergleich zum jeweiligen Normalkollektiv. Es besteht jedoch keine Einigkeit in der Literatur bzgl. der letztendlich Hsp70 Menge im Serum (ng/ml).

In ihrer Arbeit „Hsp70- Membranexpression auf Sarkomen- eine tumorspezifische Zielstruktur“ konnte Lehnerer Gewebeproben maligner Tumore des Binde- und Stützgewebes in über 78% als membranpositiv für Hsp70 detektieren. In der Vergleichsgruppe tumorfreier Patienten konnten keine Hsp70 membranpositiven Tumore gefunden werden (Lehnerer, 2012). Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv der Patienten des Binde- und Stützgewebes umfasst einen Teil des Kollektivs, das von Lehnerer untersucht wurde. Somit kann als eine weitere Kernaussage festgehalten werden, dass das Kollektiv der Patienten mit malignen Tumoren des Binde- Stützgewebes membranpositive Gewebeproben (Lehnerer, 2012) und einen erhöhten Hsp70 Serum Durchschnittswert vor Therapie aufweist. Eine Vielzahl von Studien weisen membrangebundenes Hsp70 auf verschiedenen Tumorentitäten wie kolorektalen Tumoren, Lungentumoren, Pankreastumoren, Hals-Kopf-Tumoren und Prostatakarzinomen nach (Dakappagari et al., 2010; Dutta et al., 2012; Kocsis et al., 2010; Zimmermann et al., 2012) .

Stellt man diesen Ergebnissen das Kollektiv „Ortho benigne“ mit einem Durchschnitt Hsp70 Serumwerte vor Therapie von 2.828,83pg/ml (Lipom 1.688,46pg/ml, Enchondrome 3715,78pg/ml) gegenüber, so erkennt man, dass Patienten mit benignen Tumoren keinen erhöhten Hsp70 Protein Spiegel im Serum aufweisen. Es zeigt sich, dass die Hsp70 Proteinwerte der Patienten mit einem Lipom im Bereich der Werte des Normalkollektivs liegen. Die Patienten-

gruppe der Enchondrome zeigt einen erhöhten Mean Wert, jedoch auch eine erhöhte Standardabweichung (siehe Tabelle 28). Hier verweise ich auf die Literatur, in der beschrieben wird, dass sich bei Enchondromen oftmals die Dignität nicht einfach bestimmen lässt (Freyschmidt et al., 2010). Diese Inhomogenität im Bereich der Enchondrome kann in Bezug auf ihre Dignität den höheren Hsp70 Protein Wert mancher Patienten erklären, sowie die dadurch verursachte größere Streuung der Werte. Es wäre von großem Interesse in zukünftigen Studien zu klären, ob Hsp70 im Serum mit der Dignität im long-term Follow-up der Enchondrome erhöht ist. Lehnerer konnte in ihrer Arbeit zeigen, dass Enchondrome in ihrer Hsp70 Expression membranpositiv waren (Lehnerer, 2012). Somit gehen wiederum erhöhte Hsp70 Serumwerte mit einer Hsp70 Membranpositivität einher.

Aktuell wird in der Literatur diskutiert, ob Hsp70 Serum Werte mit dem Tumorumfang korrelieren. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe (C. Bayer) zeigen, dass Hsp70 Serumlevel in Mäusen mit Tumoren signifikant über denen von Gesunden der Kontrollgruppe lagen. Es konnte eine Korrelation vom Hsp70 Level im Serum zum Tumorumfang ($0,01-0,66\text{cm}^3$) gefunden werden. Der Durchschnittswert des Tumorumfanges der malignen Tumore des Bindegewebes dieser Arbeit lag bei $1.332,7\text{cm}^3$ ($6,3-24.504,4\text{cm}^3$), für das Kollektiv der Kopf-Hals-Karzinome bei $16,8\text{cm}^3$ ($3,4-46,1\text{cm}^3$) und für die Prostatakarzinome bei $157,5\text{cm}^3$ ($91-270\text{cm}^3$). Der Vergleich des Hsp70 Protein im Serum vor Therapie zum Tumorumfang in allen Karzinomkollektiven (Orthomaligne/ HNO-/ Prostatakollektiv) zeigt, dass das Tumorumfang und die Konzentration des Hsp70 Protein im Serum vor Therapie nicht korrelieren. Es lässt sich kein Zusammenhang der Tumogröße und des Hsp70 Proteinlevels im Serum in den von mir untersuchten Tumorkollektiven nachweisen. Dennoch ist eine Korrelation zwischen Tumorumfang und Hsp70 Serumwerten nicht zwingend ausgeschlossen. Die große Streuung der Tumorumfänge innerhalb unserer Kollektive und das Zusammenfassen verschiedenster Entitäten könnten unter der aktuellen niedrigen n-Zahl der Bias Faktor sein. In künftigen Studien sollte dies nochmals näher mit erhöhter Fallzahl untersucht werden.

Im Folgenden wird nochmals näher auf die einzelnen Kollektive (Orthomaligne/ HNO-/ Prostatakollektiv) und deren Untergruppen eingegangen, um erste Zusammenhänge zwischen dem Hsp70 Serumspiegel und der Klinik von Tumoren

darzulegen. Im Kollektiv der Tumore des Binde- Stützgewebes wurde den Patienten vor der Operation sowie 3 und 6 Monate nach der Operation Blut entnommen. Betrachtet man den Verlauf des Hsp70 Proteins über diesen Zeitraum, so kann man für die Patienten, bei denen ein vollständiger Verlauf vorlag, festhalten, dass Hsp70 im Serum vor der Operation mit einem Wert von 6.626pg/ml im Vergleich zu 3 Monaten 4.843pg/ml und 6 Monaten 3.398pg/ml nach Operation erhöht ist. Der Serum Hsp70 Wert halbiert sich postoperativ innerhalb eines Jahres. Dies unterstützt die These, dass das von uns detektierte Hsp70 im Serum mit der Anwesenheit eines Tumors in Verbindung steht, da nach operativer Entfernung des Tumors die Werte fallen. In den Kollektiven der Kopf-Hals-Tumore sowie der Prostatakarzinome kann aufgrund einer zu kleinen n-Zahl in den Verlaufsgruppen diese Aussage nicht getroffen werden.

Eine weitere klinische Komponente der Onkologie ist das Grading. Grading bedeutet die histologische und/ oder zytologische Charakterisierung maligner Tumore. Hierbei gehen vor allem Kernatypien, Mitosezahlen und die Differenzierung des Gewebes in die Beurteilung ein. Numerisch werden den histologischen und/ oder zytologischen Differenzierungsgraden G1 bis G4 zugewiesen. G0 bedeutet hierbei benigne, G1 geht mit hochdifferenziert und damit niedrigmaligne einher. G4 deutet auf niedrigdifferenziertes Gewebe hin und gilt damit als hochmaligne (Böcker et al., 2004). Das Kollektiv der Kopf-Hals-Tumore zeigt in der Zusammenfassung aller Entitäten (n=6) G2 und (n=6) G3 Tumore. Das Tumolvolumen der G2 Tumore entsprach im Durchschnitt $7,5\text{cm}^3$ mit einem Hsp70 Serumwert vor Therapie von 5.436,9pg/ml. Im Vergleich hierzu lag sowohl das Tumolvolumen der G3 Kopf-Hals-Tumore mit durchschnittlich $23,2\text{cm}^3$ als auch der Serum Hsp70 Wert vor Therapie mit 6.145,9pg/ml höher (siehe auch Abbildung 38). Zusammenfassend kann man in diesem Beispiel von einer nicht signifikanten Zunahme des Hsp70 Serum Proteinwertes bei steigendem Differenzierungsgrad der Kopf-Hals-Tumore sprechen.

Im Kollektiv der Prostata Tumore wurde den Patienten vor der Therapie, 4 und 8 Wochen während der Therapie sowie ein Jahr danach Blut entnommen. Betrachtet man den Verlauf des Hsp70 Proteins über diesen Zeitraum, so kann man festhalten, dass Hsp70 im Serum vor der Therapie mit einem Wert von 5.484,0pg/ml im Vergleich zu 4 Wochen 5.392,4pg/ml und 8 Wochen

5.074,5pg/ml während der Therapie keinen Unterschied im Level aufweist (siehe Abbildung 41). Radiotherapie hat in unserem Kollektiv keinen Einfluss auf den Hsp70 Protein Serumwerte der Prostatakarzinompatienten. Es konnten des Weiteren keine Unterschiede bzgl. des Hsp70 Serumwertes über alle Blutabnahmezeitpunkte in Bezug auf primäre oder adjuvante Strahlentherapie gefunden werden (siehe auch Abbildung 44 und Tabelle 37). Diese Daten zeigen das Potential des Hsp70 als Parameter für Therapieerfolg/ Prognose. Diese Daten decken sich nicht mit einer Untersuchung der Arbeitsgruppe Hurwitz, diese fanden in einer klinischen Feldstudie (n=13) erhöhte Hsp72 Serumwerte bei Patienten mit Prostatakarzinomen unter Radiotherapie (Hurwitz et al., 2010).

Parallel zu den Hsp70 Protein Messungen im Prostatakarzinomkollektiv vor Therapie, 4 und 8 Wochen während der Therapie sowie ein Jahr nach Therapiebeginn, wurde auch das Serum auf anti-Hsp70 Antikörper untersucht. Der durchschnittliche Antikörperwert der anti-Hsp70 Antikörperkonzentration vor Therapie liegt bei 395,4ng/ml, der 4 Wochenwert bei 459,2ng/ml, der 8 Wochenwert bei 407,2ng/ml sowie der Wert ein Jahr nach der Therapie bei 465,7ng/ml (siehe auch Tabelle 36). Somit liegen alle Messungen des Antikörpers im Serum der Prostatakarzinompatienten über dem des Normallevels von 139,8ng/ml. Es konnte keine Korrelation zwischen anti-Hsp70 Antikörper im Serum und Hsp70 Protein im Serum hergestellt werden, es ließen sich auch keine Trends ablesen. Zusammenfassend heißt dies, dass Hsp70 Protein im Serum und anti-Hsp70 Antikörper im Serum im Kollektiv der Prostatakarzinome in keinem Bezug zueinander stehen.

Analysiert man das Studiendesign bzgl. des Hsp70 Serumwerts, so wird oftmals untersucht, ob das Alter der Probanden und die Hsp70 Serum Konzentration in Zusammenhang stehen (Kocsis et al., 2010). In unserem größten Kollektiv der Prostatakarzinom Patienten (n=58) konnte keine Korrelation zwischen dem Alter und dem Hsp70 Serum Level vor Therapie detektiert werden (siehe auch Abbildung 40). Das Alter der Patienten ist somit in diesem Falle ein unabhängiger Parameter.

Das prostataspezifische Antigen (PSA) ist ein Parameter, der im Blut gemessen wird und zum Screening, der Tumorausdehnungsbestimmung und vor allem der Verlaufskontrolle dient. Es handelt sich um eine von den Epithelzellen der Pros-

tata produzierte Serinprotease, welche die Koagulation des Ejakulats verhindert. Der Wert kann durch rektale Untersuchung, lokale Manipulation zum Beispiel durch eine Biopsieentnahme, sowie durch Zelluntergang und durch Entzündung beeinflusst werden. Aufgrund dieser Befunde kann es zu falsch positiven PSA Werten kommen, der PSA Wert eignet sich jedoch als spezifischer Verlaufsparemeter. In der klinischen Routine wird ab einem Wert von $>4\text{ng/ml}$ PSA im Serum eine Folgediagnostik eingeleitet (Bamberg et al., 2009; Cotic et al., 2009). Der durchschnittliche PSA Wert in unserem Prostatakarzinomkollektiv vor Therapie lag bei $15,2\text{ng/ml}$ ($0,4\text{-}90,2\text{pg/ml}$) und ist damit epidemiologische repräsentativ (Bamberg et al., 2009). Aufgrund unserer Datenlage und Betrachtung einzelner individueller Verläufe des PSA und des Hsp70 Proteinwerts konnte kein Zusammenhang zwischen Hsp70 Protein Werten und dem PSA Level im Serum gefunden werden. Hsp70 Protein und PSA Level im Prostatakarzinom korrelieren in dieser Arbeit nicht. Dies deckt sich mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe M. Abe (Abe et al., 2004). Die Gruppe konnte keine Korrelation zwischen Hsp70 Protein im Plasma und den PSA Werten herstellen. Es konnte durch die Hsp70 Bestimmung im Plasma kein zusätzlicher Informationsgewinn bezüglich Prognose oder Klassifizierung erhalten werden. Ebenfalls zeigten ihre Untersuchungen, dass bei einer Gruppe von lokalisierten unbehandelten Prostatakarzinompatienten ein erhöhter Hsp70 Level, nicht aber ein erhöhter PSA Wert im Serum gefunden wurde (Abe et al., 2004). Hier wäre eine genaue Untersuchung der klinischen Parameter interessant, um eine Aussage darüber zu erhalten, ob die Hsp70 Erhöhungen vor dem PSA Anstieg mit einer Tumorprogredienz o.ä. in Verbindung gebracht werden kann.

Zur Therapie des Prostatakarzinoms wird neben der operativen Therapie häufig eine Strahlentherapie (Radiotherapie/RT) eingesetzt. Die perkutane Strahlentherapie erfolgt mit Hilfe eines Linearbeschleunigers. Hierbei werden vorher CT basiert Planungsvolumina angefertigt, um umliegende Strukturen zu schonen. Für eine bessere Planungssicherheit wird manchmal ein Ballon während der Bestrahlung ins Rektum eingeführt (Bamberg et al., 2009; Cotic et al., 2009). Es stellte sich die Frage, ob der Hsp70 Serumlevel gleichermaßen wie der PSA Spiegel durch lokale Manipulation beeinflusst wird. In dem von uns untersuchten Prostatakarzinomkollektiv zeigte sich im Verlauf kein Einfluss einer Balloneinlage bei der Bestrahlung. Es zeigten sich keine Unterschiede bei Patienten

im Hsp70 Proteinlevel mit und ohne Balloneinlage (siehe auch Abbildung 44 und Tabelle 37). Hsp70 Serumwerte unterliegen somit keiner Schwankung durch die rektale Einführung eines Ballons.

Der Gleason-Score dient der histologischen Beurteilung des Prostatakarzinoms und damit der Einteilung und Prognosebewertung des Prostatakarzinoms. Dabei wird der so genannte Entdifferenzierungsgrad der häufigsten und der zweithäufigsten Zellpopulation des Tumors bewertet (Definition und Klassifizierung in gute und schlechte Prognosegruppe des Score, siehe Kapitel 1.3.9) (Bamberg et al., 2009). Der Gleason-Score unseres Kollektivs verteilt sich wie folgt. Er wird angegeben in prozentualem Anteil am Gesamtkollektiv der Prostatakarzinompatienten: Gleason 3 (n=1) mit 2%, Gleason 4 (n=3) mit 6%, Gleason 5 (n=5) mit 9%, Gleason 6 (n=15) mit 28%, Gleason 7 (n=17) mit 32%, Gleason 8 mit (n=6) mit 11%, Gleason 9 (n=7) mit 13% und Gleason 10 nicht vorhanden. Als gute Prognosegruppe gilt ein Gleason-Score von 2 bis 6 (n=24 und 44%), als schlechte Prognosegruppe alle Gleason-Scores ab 7 (n=30 und 56%). Die gute Prognosegruppe hat einen Mittelwert von 5.684pg/ml (3.056pg/ml bis 12.161pg/ml) Hsp70 Protein im Serum vor Radiotherapie. Die schlechte Prognosegruppe hat einen Mittelwert von 5.457pg/ml (1.186pg/ml bis 14.414pg/ml) Hsp70 Protein im Serum vor Radiotherapie (RT). Weder in der differenzierten Betrachtung der einzelnen Gleason Gruppen, noch in der groben Unterteilung in eine gute und schlechte Prognosegruppe, lässt sich eine Korrelation mit dem Hsp70 Protein vor Therapie herausarbeiten. Im Folgenden wird die TNM-Klassifikation in Zusammenhang mit den Hsp70 Protein Werten vor RT erläutert. Die Verteilung der T-Stadien unseres Prostatakarzinomkollektivs stellt sich wie folgt da: T1 mit n=3 und 6%, T2 mit n=28 und 52%, T3 mit n=21 und 39% sowie T4 mit n=2 und 4%. Wie in Abbildung 50 und 51 sowie der Tabelle 38 zusammengefasst, zeigt sich ein Anstieg des Hsp70 Proteinlevels im Serum von Prostatakarzinompatienten mit steigendem T-Stadium. Je höher das T-Stadium desto höher die Hsp70 Proteinlevel im Serum der Prostatakarzinompatienten. Im T1 Stadium liegt der Hsp70 Proteinspiegel vor Therapie bei 3.529pg/ml und damit wesentlich niedriger als im T4 Stadium mit 6.777pg/ml. Das T2 Stadium mit 5.539,2pg/ml und das T3 Stadium mit 5.757,2pg/ml Hsp70 Protein im Serum vor Therapie folgen ebenfalls dem ansteigenden Trend. Aufgrund der geringen n-Zahl der T1 und T4 Gruppe lässt sich aufgrund aktueller

Datenlage keine Signifikanz errechnen, die Tendenz einer Signifikanz zeichnet sich jedoch ab. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für das Prostatakarzinom mit steigendem T-Stadium ein erhöhter Hsp70 Protein Wert gefunden werden konnte, jedoch keine Assoziation mit dem Grading der Karzinome.

Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kocsis bestätigen, dass Hsp70 als ein stadienunabhängiger Prognosefaktor bei kolorektalen Karzinomen darstellt (Kocsis et al., 2010). Die Arbeitsgruppe Zimmermann konnte hingegen einen signifikanten Anstieg von Hsp70 im Serum von NSCLC (non-small cell lung cancer) Stadium I-II zu Stadium IIIA-IV detektieren. Hsp70 ein Stadien abhängiger oder unabhängiger Prognoseparameter gilt daher als aktuell kontrovers diskutiert. Ein weiteres Beforschen der genaueren Interaktionen zwischen membrangebundenem Hsp70, Hsp70 im Serum und der komplexen Tumorbioogie ist deshalb notwendig.

Obwohl in vielen Studien diverse Biomarker für Tumorerkrankungen beschrieben werden, ist es noch nicht gelungen für jede Tumorerkrankung den optimalen Biomarker zu finden. Bereits klinisch etablierte Tumormarker sind beispielsweise das PSA für Prostatakarzinome (Bamberg et al., 2009) oder CA-19-9 bei Pankreaskarzinomen (Ni et al., 2005). Tumormarker können das Wachstum der Tumore monitoren und Therapieerfolge überwachen (CO et al., 2010). Um einen Marker zu etablieren, gilt es mehrere Phasen der Entwicklung zu durchlaufen. Zunächst die Phase 1 der präklinischen Studien, danach folgt Phase 2 mit der Etablierung einer Messmethode. Phase 3 beinhaltet retrospektive longitudinale Studien bezüglich der Tumorerkrankung und dem zu untersuchenden Marker. In Phase 4 werden prospektiv Screeningmethoden eingesetzt, um die in Phase 3 etablierten Tendenzen oder Korrelationen zu untermauern. Erst in der Phase 5 kommt der Marker zur Anwendung im klinischen Alltag und hilft, Leiden zu lindern durch verbesserte Diagnosemöglichkeiten (Sullivan Pepe et al., 2001).

Die Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit gilt als Grundlage nun in die Phase 4 der Biomarkerentwicklung des Hsp70 Proteins im Serum einzusteigen.

4.2 Ausblick

Erkenntnisse dieser Arbeit werden in Zukunft helfen, optimierte Studiendesigns zu etablieren. In Bezug auf zukünftige Studien sollte eine Erhöhung der Fallzahl der Kollektive angestrebt werden, um einzelne Entitäten und Subgruppen der Tumorpatienten mit einer ausreichenden n-Zahl untersuchen zu können. So kann man Ausreißer besser von der Normalverteilung unterscheiden und Einzelverläufe besser beurteilen. Durch Erweitern des Entitätenspektrums der Tumore, beispielsweise durch gynäkologische Tumore oder cerebrale Tumore, könnten neue Erkenntnisse erlangt werden und Thesen dieser Arbeit verifiziert und ergänzt werden. Des Weiteren sollte die Frequenz der Blutabnahmen (1, 2, 3 jährlich) nach Therapieende erhöht werden, um long-term Effekte auf den Serum Hsp70 Protein Spiegel besser abzubilden. Gutes Dokumentieren von klinischen Parametern, Medikamenteneinnahme, Rezidiven und Metastasen zu jedem Zeitpunkt der Blutabnahme anhand eines standardisierten eigens für die Studie entworfen Fragenbogens und einer additiven standardisierten klinischen Untersuchung (ebenfalls eigens für die Studien entworfen), könnten Erkenntnisse über die Vorhersagekraft des Hsp70 Protein als Biomarker verbessern. Additiv sollte im Falle von soliden Tumoren die Hsp70 Membranpositivität des Tumors, der Metastase oder des Rezidives analysiert werden. Von großem Interesse wären Informationen, die eine Aussage darüber zulassen, inwieweit das lösliche Hsp70 im Serum die Hsp70 Membranexpression widerspiegelt.

Dieser prospektive Zukunftsstudienalgorithmus ist in Abbildung 56 skizziert.

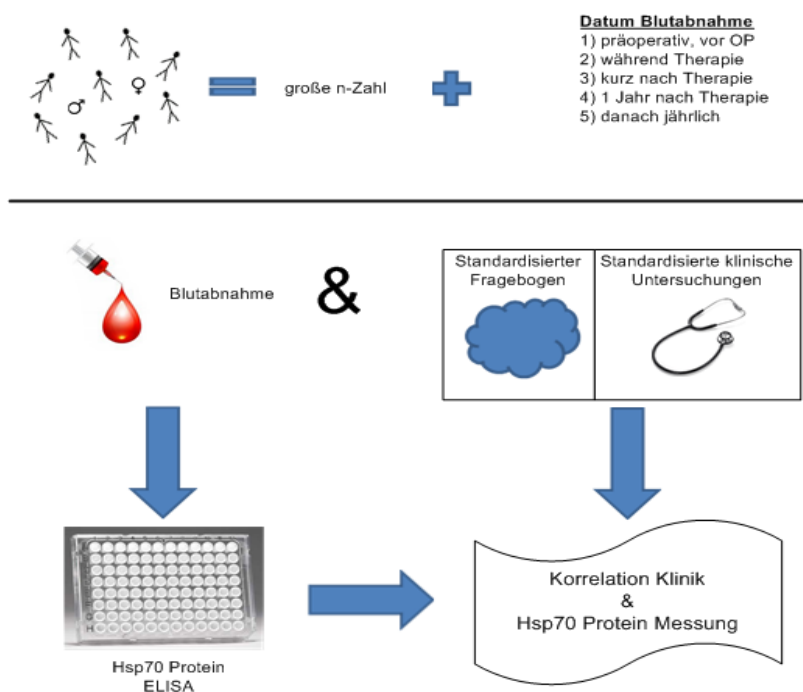


Abbildung 56 **Behandlungsalgorithmus der Zukunftsstudien** (eigene Zusammenstellung).

Durch ein intensiviertes, studienstandardisiertes Dokumentieren klinischer Parameter kann in Zukunft geklärt werden, ob eventuell Medikamenteneinnahmen, Begleiterkrankungen oder Lebensstilkomponenten bei Tumorerkrankten Einfluss auf den initialen Hsp70 Serumwert oder seinen Verlauf haben. Somit können diese Komponenten für Patienten mit Tumorerkrankungen in prospektiven Studien als Bias verifiziert oder falsifiziert werden.

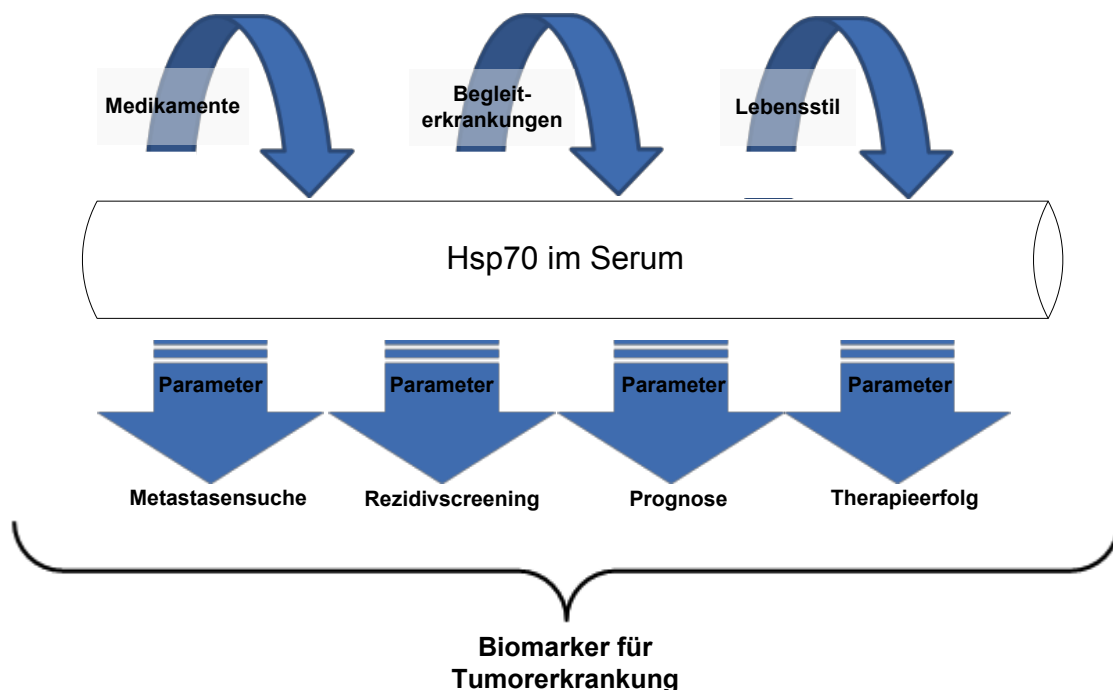


Abbildung 57 **Hsp70 Protein im Serum als Biomarker - Hoffnung und Fragen** (eigene Zusammenstellung). Mittels quantitativer Hsp70 Protein Bestimmung im Serum durch ELISA Technik erfolgt ein Therapie-Monitoring. Es können Fragen bzgl. evtl. Bias effizient beantwortet werden. Hoffentlich kann Hsp70 Protein im Serum in Zukunft Therapieerfolg und Prognose monitoren und Hilfe beim Metastasenscreening und bei der Rezidivsuche bieten, sowie sich als Biomarker bewähren.

Für das Jahr 2012 erwarten Schätzungen und Hochrechnungen rund 486.000 neue Krebserkrankungen in Deutschland laut dem Zentrum für Krebsregisterdaten am Robert-Koch-Institut und der Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregisters in Deutschland (GEKID, 2012; Robert Koch Institut Zentrum für Krebsregisterdaten Kaatsch, 2012). Von besonderem Interesse ist es, den in dieser Arbeit etablierten Hsp70 Protein- und Antikörper ELISA in klinische Studien einzuschließen, da er als minimal-invasiver Parameter zukünftig das Tumormonitoring verbessern könnte.

Hsp70 Protein- und Antikörpergehalte im Blut von Tumorpatienten als potentiell prognostischer Parameter – „ das ist ein weites Feld.“

Theodor Fontane „Effi Briest“ 1894

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

Abw.	Abweichung
adjuvRT	Adjuvante Radiotherapie
ADP	Adenosindiphosphat
AICC	American Joint Committee on Cancer
AIF	Apoptosis inducing factor
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine serum albumin
Bsp.	Beispiel
C	Celsius
C-terminal	Carboxy Terminus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ca.	Circa
CD	Cluster of Differentiation
CHIP	Carboxy-terminus of Hsc70-interacting protein
Conf.	Konfidenzintervall
CT	Computertomogramm
d.h.	Das heißt
DD	Differentialdiagnose
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRU	Digital rectale Untersuchung
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked immunosobent assay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
G1-4	Gradingstadium

GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
Ggf.	Gegebenenfalls
gr	Gramm
Gy	Gray
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Hip	Hsp70 interacting protein
HNO	Hals-Nasen-Ohren
Hop	Hsp70 organizing protein
HPV	Humane-Papilloma-Viren
HRP	Horseradish-peroxidase
Hsc	Konstitutives Hitzeschockprotein
HSF	Hitzeschockfaktoren
HSP	Hitzeschockprotein
Hsp70	Hitzeschockprotein 70 = HSP1A
ICD	International Statistical Classification of Diseases
ID	Identifikation
Ig	Immunglobuline
kDa	KiloDalton
KT	Knochentumor
LHRH	Luteinisierungs-Hormon-Releasing-Hormon
LJ	Lebensjahr
max	Maximum
mg	Miligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minimum
min.Pos.	Minimum Position
Mio.	Million
MKG	Mund-Kiefer-Gesichts
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomografie
µg/ µl	Mikrogramm/ Mikroliter
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer

OD	Optische Dichte
Ortho	Orthopädie
PBS/ T	Phosphate buffered saline/ Tween
PEG	Perkutane endoskopische Gastrostomie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pg	Picogramm
prim RT	Primäre Radiotherapie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RdI/ RDI	Rechts der Isar
rpm	Rotations per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Radiotherapie
S.	Seite
SEM	Standard error of the mean
SD	Standardabweichung
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM-Klassifikation	Tumor-Lymphknoten-Metastasen-Klassifikation
TRUS	Transrektale Ultraschalluntersuchung
UICC	Union for International Cancer Control
üN	Über Nacht
uvm.	Und vieles mehr
vgl.	Vergleiche
vs.	Versus
WHO	World Health Organization

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Typische Lokalisation von Knochentumoren (Duale Reihe Orthopädie S.228; Niethard et al., 2005).	14
Abbildung 2 Operative Therapie maligner Knochentumore und Rezidivraten (Duale Reihe Orthopädie S.232; Niethard et al., 2005).	18
Abbildung 3 Etagengliederung der Schlundhöhle (Cavitas pharynx) (Prometheus Hals und Innerer Organe S. 36; Schünke et al., 2005).....	20
Abbildung 4 Aufbau und Lage der Prostata (Basics Urologie S. 56; Lippert, 2003).	28
Abbildung 5 Diagnostikalgorithmus des Prostatakarzinoms (Basics Urologie S. 58; Cotic et al., 2009).....	32
Abbildung 6 a-c Histologischer Überblick des Gradings des Prostatakarzinoms (Pathologie S. 893-898; Böcker et al., 2004)	37
Abbildung 7 schematische Struktur von Hsp70 Protein (eigene Zusammenstellung; Kiang et al., 1998; Nollen et al., 2002).....	43
Abbildung 8 Butterfly-Kanüle, Serumröhrchen (www.apparatgemeinschaft.de/07_r02.jpeg)	54
Abbildung 9 Zusammensetzung Blutserum (Abbildung modifiziert Quelle siehe Abbildung)	55
Abbildung 10 ELISAplatten mit Sealer; Inkubator mit Inkubationsbox (eigenes Foto)	56
Abbildung 11 Tubes zur Probenverdünnung; Proben verdünnt auf Eis; Pipettierschritt Proben (eigenes Foto)	57
Abbildung 12 Pipettierschritt Stoppvorgang (eigenes Foto)	57
Abbildung 13 ELISAreader; Computer (eigenes Foto)	58
Abbildung 14 Arbeitsschritte des Hsp70 Antikörper ELISAs (eigene Zusammenstellung).....	59
Abbildung 15 Übersicht Hsp70 Ak ELISA (modifizierte Abbildung http://exploreable.files.wordpress.com/2011/05/ch4f35.jpg)	60
Abbildung 16 Übersicht Hsp70 Protein ELISA (modifizierte Abbildung R&D Sytem).	61
Abbildung 17 Arbeitsschritte Hsp70 Protein ELISA (eigene Zusammenstellung).....	62
Abbildung 18 Arbeitsschritte Hsp70 Protein ELISA (modifizierte Abbildung R&D Systems).....	63
Abbildung 19 Beispiel Versuchslayout Hsp70 Ak ELISA 2008 (eigene Abbildung)	67
Abbildung 20 Hsp70 Ak ELISA Kurve nach Optimierung (eigene Abbildung)	68

Abbildung 21 Testmessung Hsp70 Protein humane Probe AB (eigene Abbildung)	71
Abbildung 22 Testmessung Hsp70 Protein humane Probe KH (eigene Abbildung)	71
Abbildung 23 Testmessung Hsp70 Protein Standardreihe (eigene Abbildung)	72
Abbildung 24 Altersverteilung des Vergleichskollektiv (eigene Abbildung).	73
Abbildung 25 a-c Werte für die Hsp70 Antikörpergehalte bei Normalspendern (eigene Abbildung)	76
Abbildung 26 a-c Hsp70 Protein Werte im Normalspenderkollektiv (eigene Abbildung)	77
Abbildung 27 Altersverteilung Tumorpatienten des Binde- und Stützgewebe (eigene Abbildung)	78
Abbildung 28 Hsp70 Protein Meanwerte benignen Tumoren des Binde-/ Stützgewebes (eigene Abbildung)	79
Abbildung 29 Hsp70 Protein bei Patienten mit malignen mesenchymalen Tumoren des Binde- und Stützgewebes (eigene Abbildung).....	80
Abbildung 30 Hsp70 Protein bei Patienten mit malignen mesenchymalen Tumoren des Binde- und Stützgewebes mit vollständigem Verlauf (eigene Abbildung).....	82
Abbildung 31 Hsp70 Protein im Serum vor der Operation von Patienten mit einem Chondrosarkom vs. Hsp70 im Serum des Vergleichskollektivs (eigene Abbildung)	84
Abbildung 32 Hsp70 Protein in Bezug zum Tumolvolumen von Patienten mit mesenchymalen Tumoren (eigene Abbildung)	85
Abbildung 33 Altersverteilung der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (eigene Abbildung)	86
Abbildung 34 a-b Hsp70 Proteinlevel im Serum von Kopf und Hals- Karzinompatienten (eigene Abbildung).....	88
Abbildung 35 Prozentualer Anteil der T-Stadien am Gesamtkollektiv HNO- Tumore (eigene Abbildung).....	90
Abbildung 36 Tumolvolumen der verschiedenen T-Stadien HNO Tumore Gesamtkollektiv (eigene Abbildung)	91
Abbildung 37 Hsp70 Protein im Serum vor Therapie in den T-Stadien der HNO Tumore Gesamtkollektiv (eigene Abbildung)	92
Abbildung 38 a-c Hsp70 Protein im Serum vor Therapie und Tumolvolumen, aufgeteilt in die Gradingstufen der HNO Tumore (eigene Abbildung)	94

Abbildung 39 Altersverteilung Tumorpatienten mit Prostatatumoren (eigene Abbildung)	96
Abbildung 40 Hsp70 Protein vor Therapie (01) im Bezug zum Lebensjahr (eigene Abbildung)	97
Abbildung 41 Übersicht Prostatakarzinomkollektiv aller Messungen Hsp70 Protein und Hsp70 Ak (eigene Abbildung).....	98
Abbildung 42 a-d Übersicht über Hsp70 Protein aller Patienten des Prostatakollektivs dargestellt als Einzelwert (eigene Abbildung)..	100
Abbildung 43 a-d Zusammenhang des Hsp70 Proteins und des Hsp70 Antikörpers im Gesamtverlauf des Prostatakarzinomkollektivs (eigene Abbildung)	102
Abbildung 44 Hsp70 Protein Werte der Prostatakarzinom Patienten unter primärer RT vs. adjuvanter RT und Ballonkollektiv (eigene Abbildung)	103
Abbildung 45 PSA des Prostatakarzinomkollektivs in ng/ml vor Therapie (eigene Abbildung)	105
Abbildung 46 a-b Gleason-Score Prostatakarzinomkollektiv (eigene Abbildung)	106
Abbildung 47 Gleason-Score vs. Hsp70 Protein (eigene Abbildung).....	107
Abbildung 48 Gleason-Score Prognosegruppe vs. Hsp70 Protein vor RT (eigene Abbildung)	108
Abbildung 49 T-Stadien Prostatakarzinomkollektiv vor Therapie (eigene Abbildung)	109
Abbildung 50 Hsp70 Protein Einzelwerte wurden den Stadien T1-T4 des Prostatakarzinoms zugeordnet (eigene Abbildung)	110
Abbildung 51 Hsp70 Protein Meanwerte wurden den Stadien T1-T4 des Prostatakarzinoms zugeordnet (eigene Abbildung)	110
Abbildung 52 Boxplot Übersicht Initialwerte vor Therapie aller Kollektive im Vergleich zum Normalkollektiv (eigene Abbildung).....	112
Abbildung 53 Balkendiagramm Übersicht Initialwerte vor Therapie aller Kollektive im Vergleich zum Normalkollektiv (eigene Abbildung).....	113
Abbildung 54 Boxplot Übersicht Tumolvolumen aller Kollektive (eigene Abbildung)	115
Abbildung 55 Balkendiagramm Übersicht Tumolvolumen und Hsp70 Protein aller Tumorkollektiv (eigene Abbildung).....	117
Abbildung 56 Behandlungsalgorithmus der Zukunftsstudien (eigene Zusammenstellung).....	132
Abbildung 57 Hsp70 Protein im Serum als Biomarker - Hoffnung und Fragen (eigene Zusammenstellung).....	133

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 WHO-Klassifikation der Knochentumore, Lyon 2002 (eigene Zusammenstellung Freyschmidt et al., 2010)	9
Tabelle 2 Definition (WHO-Klassifikation) ausgewählter Entitäten mesenchymaler Tumore (eigene Zusammenstellung aus Freyschmidt et al., 2010; Grivas et al., 2008)	10
Tabelle 3 Epidemiologische Daten Knochentumore ausgewählter Entitäten (Zusammenstellung aus Böcker et al., 2004; DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie Schütte, 2006; Freyschmidt et al., 2010; Walden et al., 2008)	12
Tabelle 4 Lokalisation der Tumore des Binde- und Stützgewebes (eigene Zusammenstellung DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie Schütte, 2006; Freyschmidt et al., 2010; Niethard et al., 2005) 14	
Tabelle 5 TNM-Klassifikation der mesenchymalen Tumore (eigene Zusammenstellung nach UICC/ AJCC 2002).....	16
Tabelle 6 Stadieneinteilung benigner Knochentumore (eigene Zusammenstellung nach Enneking 1985).....	16
Tabelle 7 Stadieneinteilung maligner Knochentumore (eigene Zusammenstellung nach Enneking 1985).....	17
Tabelle 8 Klassifikation maligner Knochentumore (eigene Zusammenstellung nach UICC/ AJCC 2002).....	17
Tabelle 9 Übersicht Klinik der verschiedenen Entitäten der Kopf-Hals-Tumore (eigene Zusammenstellung Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde S. 1-215)	22
Tabelle 10 TNM-Klassifikation der Larynxkarzinome (Behrbohm et al., 2009)	24
Tabelle 11 T-Klassifikation der Oropharynxkarzinome (Behrbohm et al., 2009)	25
Tabelle 12 T-Klassifikation der Hypopharynxkarzinome (Behrbohm et al., 2009)	25
Tabelle 13 Therapieoptionen der verschiedenen Entitäten der Kopf-Hals-Tumore (eigene Zusammenstellung Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde S. 1-215, Behrbohm et al., 2009)	27
Tabelle 14 TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (eigene Zusammenstellung nach UICC 2002)	34
Tabelle 15 Stadieneinteilung Prostatakarzinom (eigene Zusammenstellung nach AJCC 2002).....	35
Tabelle 16 Stadieneinteilung Prostatakarzinom (eigene Zusammenstellung nach UICC 2002)	35

Tabelle 17 Intra- und extrazelluläre Lokalisation von Mitgliedern der HSP70 Familie (eigene Zusammenstellung siehe Referenzen in der Tabelle)	42
Tabelle 18 Chemikalien und Reagenzien Hsp70 Protein und Antikörper ELISA (eigene Zusammenstellung).....	49
Tabelle 19 Verwendetes Kit Hsp70 Protein ELISA (eigene Zusammenstellung)	49
Tabelle 20 Kitlösungen und Herstellung Hsp70 Protein und Antikörper ELISA (eigene Zusammenstellung).....	50
Tabelle 21 Puffer Hsp70 Protein und Antikörper ELISA (eigene Zusammenstellung).....	50
Tabelle 22 Antikörper und Protein Hsp70 Protein und Antikörper ELISA (eigene Zusammenstellung).....	51
Tabelle 23 Plastikmaterial (eigene Zusammenstellung).....	51
Tabelle 24 Geräte und Hersteller (eigene Zusammenstellung)	52
Tabelle 25 Patientenkollektive (eigene Zusammenstellung)	52
Tabelle 26 Testmessung humaner Proben Hsp70 Ak (eigene Analyse).	69
Tabelle 27 Versuchslayout Hsp70 Protein ELISA 31-10-2008 (eigene Zusammenstellung)	70
Tabelle 28 Übersicht Vergleichskollektiv (eigene Zusammenstellung).....	75
Tabelle 29 Hsp70 Proteingehalt im Serum von Patienten mit benignen mesenchymalen Tumoren (eigene Zusammenstellung)	79
Tabelle 30 Proteinwert Hsp70 Protein im Serum bei Patienten mit malignen mesenchymalen Tumoren (eigene Zusammenstellung)	81
Tabelle 31 Hsp70 Proteingehalt von Patienten mit malignen mesenchymalen Tumoren (eigene Zusammenstellung)	83
Tabelle 32 Hsp70 Protein und Tumolvolumen mesenchymaler Tumore (eigene Zusammenstellung).....	85
Tabelle 33 Hsp70 Protein Serumwerte vor Therapie und Tumolvolumen der HNO Tumore (eigene Zusammenstellung)	89
Tabelle 34 Tumolvolumen und T-Stadien HNO Tumore Gesamtkollektiv (eigene Zusammenstellung).....	91
Tabelle 35 Hsp70 Protein im Serum vor Therapie in den T-Stadien der HNO Tumore Gesamtkollektiv (eigene Zusammenstellung).....	92
Tabelle 36 HNO Tumore Grading und Hsp70 Protein und Tumolvolumen (eigene Zusammenstellung).....	95
Tabelle 37 Übersicht Prostatakarzinomkollektiv alle Messungen Hsp70 Protein und Hsp70 Ak (eigene Zusammenstellung)	99
Tabelle 38 Übersicht Hsp70 Protein Werte prim RT, adjuv RT und Ballonkollektiv (eigene Zusammenstellung)	104

Tabelle 39 Hsp70 Protein Meanwerte (Stadien T1-T4 des Prostatakarzinoms) (eigene Zusammenstellung)	111
Tabelle 40 Werte für Boxplot Übersicht Initialwerte vor Therapie aller Kollektive im Vergleich zum Normalkollektiv (eigene Zusammenstellung).....	112
Tabelle 41 Werte für Balkendiagramm Übersicht Hsp70 Protein Initialwerte aller Kollektive (eigene Zusammenstellung)	114
Tabelle 42 Werte für Boxplot Übersicht Tumorzvolumen aller Kollektive (eigene Zusammenstellung).....	116
Tabelle 43 Werte Balkendiagramm Übersicht Tumorzvolumen und Hsp70 Protein aller Tumorkollektive (eigene Zusammenstellung)	118

5.4 Danksagung

Diese Dissertation ist ein Auszug aus vielen Jahren Forschungsarbeit, in denen ich durch sehr viele Menschen begleitet wurde. Mein Dank gilt allen, auch den nicht namentlich erwähnten, da ohne alle „Puzzleteile“ das Projekt nicht möglich geworden wäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gabriele Multhoff, Leiterin der Experimentellen Radioonkologie und Strahlentherapie des Klinikums Rdl, für die Überlassung des interessanten Themas, die Einführung ins wissenschaftliche Arbeiten sowie die ständige Unterstützung beim Durchführen neuer Ideen. Danke, dass Sie mich in Ihr Team aufgenommen und Vertrauen in mich gesteckt haben. Vielen Dank, dass Sie mir jahrelang mühsam gesammeltes Material zur Verfügung gestellt haben. Danken möchte ich auch dem gesamte Forschungsteam der Experimentellen Radioonkologie des Klinikums Rdl. Vielen Dank für das Lehren von Methoden und Beisteuern konstruktiver Ideen; ich habe immer sehr gerne in diesem Team gearbeitet. Ebenso danke ich dem gesamten Team der UCSD unter der Leitung von Antonio de Maio. Der Forschungsaufenthalt in San Diego hat mein wissenschaftliches Denken geschult, meine technischen Fähigkeiten erweitert und nicht zuletzt mir einen Erfahrungsschatz an die Hand gegeben von dem ich noch Jahre zehren werde.

Ein Danke geht auch an Sophie Lehnerer, Kristin Kuhs und Katharina Roth. Es ist von großem Wert, in Stunden der Arbeit und nicht nur in Stunden der Freude Freunde neben sich zu haben. Danke, dass eure Freundschaft mich immer weiter trägt.

Ein weiterer Dank gilt meiner Familie und Freunden, die mich auf meinen Wegen begleiten und mir stetig bei der Verwirklichung meiner Ziele zur Seite stehen.

Mein allergrößter Dank gilt an dieser Stelle meiner Mutter Karin. Ihre uneingeschränkte Liebe und Ihr stetiger Glaube an mich waren mein größter Halt. Interesse an meiner Forschungsarbeit, grenzenlose Unterstützung im Studium sowie permanente Unterstützung, vor allem in Sackgassen dieses Projektes haben mir den Mut gegeben zu kämpfen und niemals aufzugeben. Deshalb möchte ich Ihr diese Doktorarbeit widmen.

5.5 Anhang Patienteninformation



Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Radiologische Onkologie der
Technischen Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls



Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München

Briefanschrift Ismaninger Straße 22
81675 München
Direktion: +49 89 4140-4501 oder -4502
Telefax: +49 89 4140-4882
Internet: www.radonc.med.tu-muenchen.de

– Patienteninformation –

Gewinnung von Tumormaterial und Blut für die Erforschung der HSP70-Expression als Tumormarker

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bitte lesen Sie diese Information über die geplanten Untersuchungen im Rahmen des oben genannten Vorhabens sorgfältig durch. Für weitere Fragen stehen Ihnen die Prüfarzte gerne zur Verfügung.

Wir bitten Sie, an diesem Vorhaben teilzunehmen. Sie selbst haben davon keinen unmittelbaren Nutzen, helfen aber möglicherweise mit, ein Verfahren zu entwickeln, auf dessen Grundlage kranken Patienten eine innovative Therapieoption angeboten werden könnte.

Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, frisches Tumormaterial von Patienten auf das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein 70 (HSP70) zu untersuchen. Das Blut des Tumorpatienten wird funktionell und phänotypisch charakterisiert.

Einleitung

Es hat sich gezeigt, dass Tumorzelllinien häufig das HSP70 auf ihrer Zellmembran präsentieren. In der vorliegenden Studie soll überprüft werden, ob HSP70 auch auf soliden Tumoren von Patienten präsentiert wird.

Natürliche Killerzellen stellen eine Untergruppe der weißen Blutkörperchen dar und leisten einen wichtigen Beitrag in der körpereigenen Immunabwehr gegen Tumorerkrankungen. Die natürliche Funktion dieser Zellen ist leider nicht immer ausreichend, um die Ausbreitung einer Tumorerkrankung zu verhindern. Deshalb soll die Funktionalität Ihrer Immunabwehrzellen in einem etablierten Laborverfahren untersucht werden.

Patienteninformation und Einwilligungserklärung
HSP70 Version 0.2 v. 18.05.09

Seite 1 von 5

Ablauf der Studie

1. Tumoruntersuchung: Bei dem klinisch notwendigen operativen Eingriff (definitive Tumorresektion, ohne oder mit vorangegangener Therapie) wird eine Tumorprobe von maximal $0,5 \text{ cm}^3$ (etwa erbsengroß) entnommen. Dies beeinträchtigt in keinem Fall die weitere Diagnostik oder Therapie. Außerdem wird auch eine kleine Menge Referenzgewebe (Bindegewebe von maximal $0,5 \text{ cm}^3$) entnommen. Das erbsengroße Tumormaterial und Referenzgewebe wird in unserem Labor (Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie) auf das Vorhandensein von HSP70 untersucht. Völlig unabhängig davon wird das übrige entnommene Tumormaterial durch einen Pathologen (Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologie Anatomie am Klinikum rechts der Isar der TU München) im Rahmen der Routinediagnostik feingeweblich untersucht.
2. Blutuntersuchungen: Wir benötigen von Ihnen 3 x 15 ml Ihres Blutes (entspricht der Menge von jeweils 3 Esslöffeln). Die Blutentnahme wird im Rahmen der allgemein notwendigen Therapievorbereitung und im Verlauf der Therapie erfolgen. Allgemein kann es bei der Blutentnahme (z.B. Armvenenblut) zu Schmerzen an der Einstichstelle, Entzündungen und Nachblutungen kommen. Manche Patienten können mit Übelkeit oder Schwindel auf eine Blutentnahme reagieren.

Abschließende Hinweise:

Um an dieser Studie teilzunehmen, ist Ihre Zustimmung notwendig. Stimmen Sie jedoch einer Teilnahme an dieser Studie nicht zu, wird Ihnen daraus in keiner Weise ein Nachteil entstehen. Auch zu einem späteren Zeitpunkt können Sie die Teilnahme jederzeit beenden.

Weitere ergänzend besprochene Punkte:

Vertraulichkeit der Daten und Einblicknahme in die Krankenakte

Im Rahmen dieser Studie werden personenbezogene Daten erhoben, gespeichert und ausgewertet. Die Verwendung der Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen. Nur wenn Sie die beiliegende Datenschutzerklärung unterschreiben, können sie an der Studie teilnehmen.

Weitere ergänzend besprochene Punkte:

Drucken



Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Radiologische Onkologie der
Technischen Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Molls



Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie
Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München

Briefanschrift Ismaninger Straße 22
81675 München
Direktion: +49 89 4140-4501 oder -4502
Telefax: +49 89 4140-4882
Internet: www.radonc.med.tu-muenchen.de

– Datenschutzerklärung und Patienteneinwilligungserklärung –

**Gewinnung von Tumormaterial und Blut für die Erforschung der HSP70-Expression
als Tumormarker**

Hiermit erkläre ich, _____

dass ich durch Frau/Herrn _____

über das Ziel, das Wesen, die Bedeutung und die Tragweite des oben erwähnten Studienvorhabens aufgeklärt wurde.

Mein Arzt hat mich über die mit der Teilnahme an der Studie verbundenen Risiken informiert.

Informationen und Einwilligungserklärung zum Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet werden und namentlich (nichtanonymisiert) unabhängig von der Studie zurück an den betreuenden Arzt gehen.
Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten anonymisiert (ohne Namensnennung) weitergegeben werden.
2. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der Studie beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen.
3. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche oder satzungsmäßige Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit meine Einwilligung zur Studienteilnahme ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile erwachsen.

Die oben genannten Punkte habe ich verstanden, alle von mir gestellten Fragen wurden mir beantwortet. Ich hatte Gelegenheit und ausreichend Zeit, mich für die Teilnahme an der Studie zu entscheiden. Dabei wurde ich nicht von meinem behandelnden Arzt oder einem anderen Klinikangehörigen beeinflusst.

Ich bin bereit, an der oben dargestellten HSP70-Screening-Studie teilzunehmen und willige in die Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten unter Wahrung des Datenschutzes ein.

Eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung wurde mir ausgehändigt.

Name der Patientin / des Patienten in Blockschrift ; Geburtsdatum

Unterschrift der Patientin/des Patienten

Unterschrift des Arztes

5.6 Anhang R&D ELISAKit Information des Herstellers

<http://www.rndsystems.com/pdf/DYC1663.pdf>

DuoSet[®] IC

Human/Mouse/Rat Total HSP70

Catalog Number DYC1663-2
DYC1663-5

For the development of sandwich ELISAs to measure Heat Shock Protein 70 (HSP70) in cell lysates.

This package insert must be read in its entirety before using this product.

**FOR RESEARCH USE ONLY.
NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.**

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This DuoSet[®] IC ELISA contains the basic components required for the development of sandwich ELISAs to measure HSP70 in cell lysates. An immobilized capture antibody specifically binds HSP70. After washing away unbound material, a biotinylated detection antibody specific for HSP70 is used to detect the protein, utilizing a standard Streptavidin-HRP format.

MATERIALS PROVIDED

Store the unopened kit at 2 - 8° C. Do not use past kit expiration date.

Description	Part #	Storage Conditions	Vials Provided	
			Cat. # DYC1663-2	Cat. # DYC1663-5
Total HSP70 Capture Antibody	841680	2 - 8° C	1	2
Total HSP70 Detection Antibody	841681	2 - 8° C	1	2
Total HSP70 Standard	841682	2 - 8° C	3	5
Streptavidin-HRP	890803	2 - 8° C	1	1

DYC1663-2 contains sufficient materials to run ELISAs on at least two 96 well plates.*

DYC1663-5 contains sufficient materials to run ELISAs on at least five 96 well plates.*

*Provided the following conditions are met:

- The reagents are prepared as described in this package insert.
- The assay is run as described in the General ELISA Protocol on page 5.
- The recommended microplates, buffers, diluents, substrates, and solutions are used.

OTHER MATERIALS REQUIRED

- Aprotinin (Sigma # A6279)
- Leupeptin (Sigma # L8511)
- Pepstatin (Sigma # P4265)
- Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (Sigma # P7626)
- Sodium azide (NaN₃) (Sigma # S2002)
- Triton[®] X-100 (Sigma # T9284)
- Pipettes and pipette tips
- Deionized or distilled water
- 96 well microplates [Costar EIA Plates (Catalog # 2592 or R&D Systems' Catalog # DY990) are suggested]
- Plate sealers (R&D Systems, Catalog # DY992)
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer

Triton is a registered trademark of Union Carbide.

SOLUTIONS REQUIRED

PBS - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtered.

Wash Buffer - 0.05% Tween[®] 20 in PBS, pH 7.2 - 7.4 (R&D Systems, Catalog # WA126).

Block Buffer - 1% BSA,* 0.05% NaN₃, in PBS, pH 7.2 - 7.4.

IC Diluent #1 - 1% BSA* in PBS, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtered.

IC Diluent #4** - 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100 in PBS, pH 7.2 - 7.4.

Note: *Approximately 50 mL of this diluent is required to run the assay on one plate.*

Lysis Buffer #12** - 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 10 µg/mL Leupeptin, 10 µg/mL Pepstatin, 100 µM PMSF, 3 µg/mL Aprotinin in PBS, pH 7.2 - 7.4.

Substrate Solution - 1:1 mixture of Color Reagent A (H₂O₂) and Color Reagent B (Tetramethylbenzidine) (R&D Systems, Catalog # DY999).

Stop Solution - 2 N H₂SO₄ (R&D Systems, Catalog # DY994).

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature before use.

Total HSP70 Capture Antibody (Part 841680) - Each vial contains 360 µg/mL of mouse anti-human HSP70 when reconstituted with 200 µL of PBS. After reconstitution, store at 2 - 8° C for up to 30 days or aliquot and store at ≤ -20° C in a manual defrost freezer or at ≤ -70° C for up to 3 months.***

Total HSP70 Detection Antibody (Part 841681) - Each vial contains 3.6 µg/mL of biotinylated rabbit anti-human HSP70 when reconstituted with 1.0 mL of IC Diluent #1. After reconstitution, store at 2 - 8° C for up to 30 days or aliquot and store at ≤ -20° C in a manual defrost freezer or at ≤ -70° C for up to 3 months.***

Total HSP70 Standard (Part 841682) - Each vial contains 150 ng/mL of recombinant human HSP70 when reconstituted with 500 µL of IC Diluent #4. **Use within one hour of reconstitution. A fresh standard should be used for each assay.** A seven point standard curve using 2-fold serial dilutions and a high standard of 10,000 pg/mL is recommended.

Streptavidin-HRP (Part 890803) - 1.0 mL of streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase. Store at 2 - 8° C. **DO NOT FREEZE.**

*The use of R&D Systems Reagent Diluent Concentrate 2 (Catalog # DY995) or Millipore Bovine Serum Albumin, Fraction V, Protease free (Catalog # 82-045) is recommended. All buffers containing BSA must be stored at 2 - 8° C.

**Sample Diluent Concentrate 1 (5X) (R&D Systems, Catalog # DYC001), prepared as described in the DYC001 insert.

***Provided this is within the expiration date of the kit.

Tween is a registered trademark of ICI Americas.

PREPARATION OF SAMPLES

Cell Lysates - Rinse cells two times with PBS, making sure to remove any remaining PBS after the second rinse. Solubilize cells at 1×10^7 cells/mL in Lysis Buffer #12 and allow samples to sit on ice for 15 minutes. Assay immediately or store at $\leq -70^\circ \text{C}$. Before use, centrifuge samples at $2000 \times g$ for 5 minutes and transfer the supernate to a clean test tube. Sample protein concentration may be quantified using a total protein assay. If needed, further dilutions should be made in IC Diluent #4.

PRECAUTION

The Stop Solution suggested for use with this kit is an acidic solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.

TECHNICAL HINTS AND LIMITATIONS

- This DuoSet IC ELISA should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Individual results may vary due to differences in technique, plasticware and water sources.
- It is important that the diluents selected for reconstitution and for dilution of the standard reflect the environment of the samples being measured. The diluent suggested in this protocol should be suitable for most cell lysates.
- The type of enzyme and substrate and the concentrations of capture/detection antibodies used can be varied to create an immunoassay with a different sensitivity and dynamic range. A basic understanding of immunoassay development is required for the successful use of these reagents in immunoassays.
- A thorough and consistent wash technique is essential for proper assay performance. Wash Buffer should be dispensed forcefully and removed completely from the wells by aspiration or decanting. Remove any remaining Wash Buffer by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
- Use a fresh reagent reservoir and pipette tips for each step.
- It is recommended that all standards and samples be assayed in duplicate.
- Avoid microbial contamination of reagents and buffers. This may interfere with the sensitivity of the assay. Buffers containing protein should be made under aseptic conditions and stored at $2 - 8^\circ \text{C}$ or be prepared fresh daily.

GENERAL ELISA PROTOCOL

A plate layout is provided to record controls and samples assayed.

Plate Preparation

1. Dilute the Capture Antibody to a working concentration of 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS, without carrier protein. Immediately coat a 96 well microplate with 100 μL per well of the diluted Capture Antibody. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate each well and wash with Wash Buffer, repeating the process two times for a total of 3 washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential for good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or by inverting the plate and blotting it against clean paper towels.
3. Block plates by adding 300 μL of Block Buffer to each well. Incubate at room temperature for 1 - 2 hours.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2. The plates are now ready for sample addition.

Assay Procedure

1. Add 100 μL of sample or standards in IC Diluent #4 per well. Use IC Diluent #4 as the zero standard. Cover with a plate sealer and incubate 2 hours at room temperature.
Note: *A seven point standard curve using 2-fold serial dilutions and a high standard of 10,000 pg/mL is recommended.*
2. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
3. Dilute the Detection Antibody to a working concentration of 100 ng/mL in IC Diluent #1 before use. Add 100 μL of the diluted Detection Antibody to each well. Cover with a new plate sealer and incubate 2 hours at room temperature.
4. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of Plate Preparation.
5. Immediately before use, dilute the Streptavidin-HRP to the working concentration specified on the vial label using IC Diluent #1. Add 100 μL of the diluted Streptavidin-HRP to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
6. Repeat the aspiration/wash as in step 2 of the Plate Preparation.
7. Add 100 μL of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Avoid placing the plate in direct light.
8. Add 50 μL of Stop Solution to each well. Gently tap the plate to ensure thorough mixing.
9. Determine the optical density of each well immediately, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

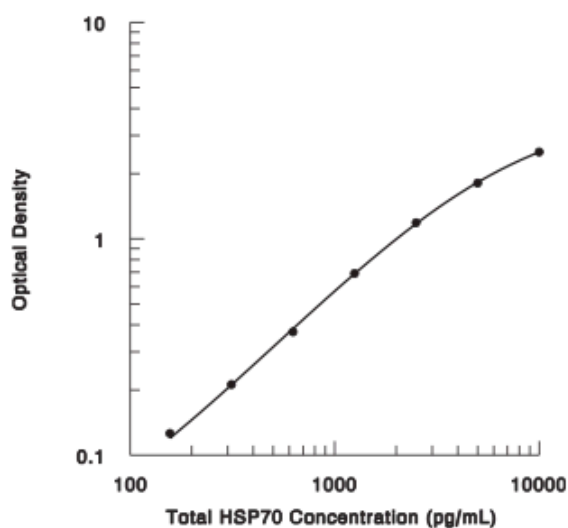
CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard and sample then subtract the average zero standard optical density. Results may be normalized to total protein or cell number.

Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the HSP70 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.

TYPICAL DATA

A standard curve should be generated for each set of samples assayed. The graph below represents typical data generated when using this Human/Mouse/Rat Total HSP70 DuoSet IC ELISA. The standard curve was calculated using a computer generated 4-PL curve-fit. This standard curve is for demonstration purposes only.



CALIBRATION

This DuoSet IC ELISA is calibrated against a highly purified *E. coli*-expressed recombinant human HSP70 produced at R&D Systems.

SPECIFICITY

The Human/Mouse/Rat Total HSP70 DuoSet IC ELISA specifically recognizes HSP70. Specificity was demonstrated by Western blot analysis of the protein bound by the capture antibody supplied in the kit.

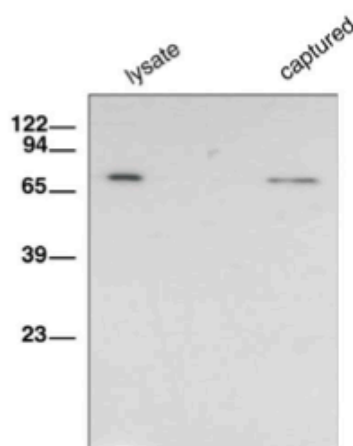


Figure 1: Lysates prepared from heat-shocked, human Jurkat cells were incubated in wells coated with Total HSP70 Capture Antibody. Unbound material was removed by washing and bound material was solubilized in SDS gel sample buffer. The same lysate and captured proteins were electrophoresed, transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore) and immunoblotted with Total HSP70 Detection Antibody. Only a single band corresponding to HSP70 was detected.

To further determine specificity, recombinant human HSP27 was assayed at 100 ng/mL and measured 6294 pg/mL (6.3% cross-reactivity). Recombinant human (rh) HSP60, rhHSPA8, and rhGRP78/HSPA5 were assayed at 100 ng/mL and exhibited no cross-reactivity or interference in the assay.

QUANTIFICATION

Amounts of human HSP70, as measured by the Human/Mouse/Rat Total HSP70 DuoSet IC ELISA, are consistent with the amounts of HSP70 determined by qualitative Western blot analysis.

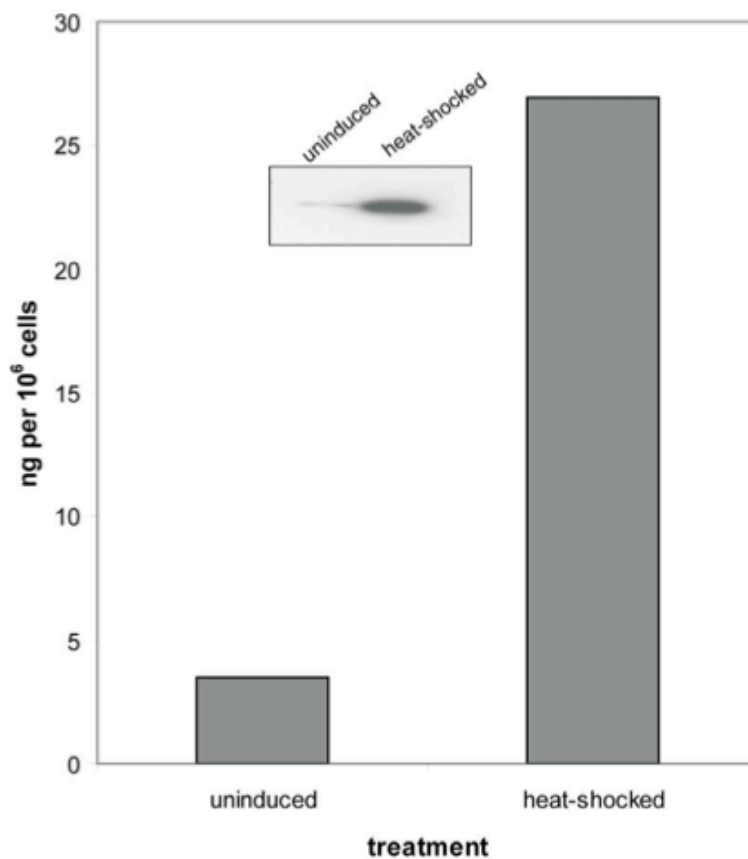


Figure 2: Jurkat cells were heat-shocked at 44° C for 30 minutes and allowed to recover for 4 hours at 37° C. Following cell lysis, HSP70 was quantified with this DuoSet IC ELISA. The same lysates were also immunoblotted (inset) with rabbit anti-HSP70 antibody (R&D Systems, Catalog # AF1663). The DuoSet IC ELISA results correlate well with the amounts of HSP70 detected by Western blot.

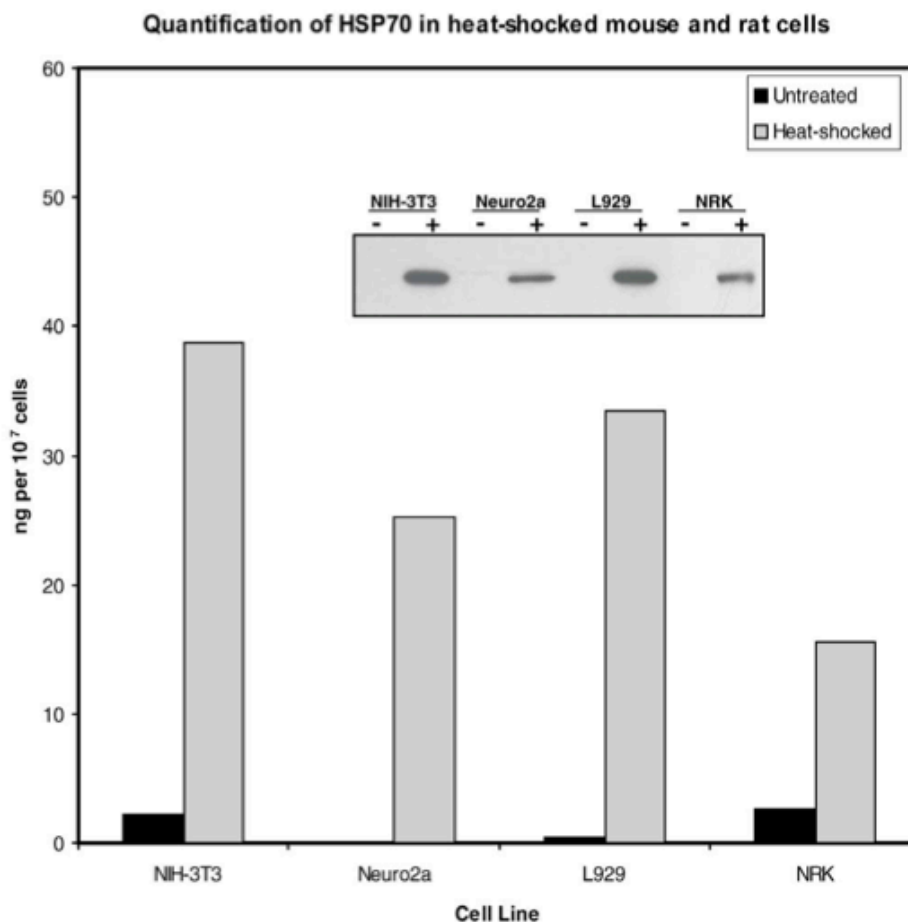


Figure 3: Mouse NIH-3T3, Neuro2a, L929 cells, and rat NRK cells were heat-shocked at 44° C for 30 minutes and allowed to recover for 4 hours at 37° C. Following cell lysis, HSP70 was quantified with this DuoSet IC ELISA. The same lysates were also immunoblotted (inset) with rabbit anti-human HSP70 antibody (R&D Systems, Catalog # AF1663). The DuoSet IC ELISA results correlate well with the amounts of HSP70 detected by Western blot.

PLATE LAYOUT

Use this plate layout as a record of standards and samples assayed.

12									
11									
10									
9									
8									
7									
6									
5									
4									
3									
2									
1									
	A	B	C	D	E	F	G	H	

5.7 Literaturverzeichnis

Abe, M., Manola, J. B., Oh, W. K., Parslow, D. L., George, D. J., Austin, C. L., Kantoff, P. W.

Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer.

Clin Prostate Cancer 3 (2004) 49-53

Arnold-Schild, D., Hanau, D., Spehner, D., Schmid, C., Rammensee, H. G., de la Salle, H., Schild, H.

Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells.

J Immunol 162 (1999) 3757-3760

Asea, A., Kraeft, S. K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., Calderwood, S. K.

HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine.

Nat Med 6 (2000) 435-442

Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A., Calderwood, S. K.

Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4.

J Biol Chem 277 (2002) 15028-15034

Bacci, G., Briccoli, A., Ferrari, S., Longhi, A., Mercuri, M., Capanna, R., Donati, D., Lari, S., Forni, C., DePaolis, M.

Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremity: long-term results of the Rizzoli's 4th protocol.

Eur J Cancer 37 (2001) 2030-2039

Bamberg, M., Molls, M., Sack, H.

Radioonkologie

W. Zuckerschwerdt, Internet/Download, 2009, 1. Auflage, 1-1142 (1496-1535)

Basu, S., Srivastava, P. K.

Heat shock proteins: the fountainhead of innate and adaptive immune responses.

Cell Stress Chaperones 5 (2000) 443-451

- Behrbohm, H., Kaschke, O., Nawka, T.
Kurzlehrbuch Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
Georg Thieme Verlag Stuttgart & New York 2009, 1. Auflage, 1-295
- Berchthold, R., Bruch, H.-P. H., Trezn, O. H.
Chirurgie
Urban & Fischer München-Jena, 2008, 6. Auflage 1-1280
- Bill-Axelsson A., Holmber L., Filen F.
Radical prostatectomie versus watchfull waiting in localized prostate cancer: the
scandinavian prostate cancer group-4 randomized trail.
J Natl Cancer Inst 100 (2008) 1144-1154
- Björnsson, J., McLeod, R. A., Unni, K. K., Ilstrup, D. M., Pritchard, D. J.
Primary chondrosarcoma of long bones and limb girdles
Cancer 83 (1998) 2105-2119
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U. H.
Pathologie
Urban& Fischer München, 2004, 3. Auflage, 1-1290
- Botzler, C., Ellwart, J., Gunther, W., Eissner, G., Multhoff, G.
Synergistic effects of heat and ET-18-OCH3 on membrane expression of hsp70
and lysis of leukemic K562 cells.
Exp Hematol 27 (1999) 470-478
- Botzler, C., Issels, R., Multhoff, G.
Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells in
associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent
natural killer cells.
Cancer Immunol Immunother 43 (1996) 226-230
- Botzler, C., Li, G., Issels, R. D., Multhoff, G.
Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune
response.
Cell Stress Chaperones 3 (1998) 6-11

Calderwood, S. K., Khaleque, M. A., Sawyer, D. B., Ciocca, D. R.
Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis.
Trends Biochem Sci 31 (2006) 164-172

CO, M., Lu, Y.
Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer.
J Cancer 1 (2010) 150-177

Cotic, C., Hammes, C., Lingenfelder, T.
Basic Urologie
Urban&Fischer, München, 2009, 1. Auflage, 1-103

Csermely, P.
A nonconventional role of molecular chaperones: involvement in the
cytoarchitecture.
News Physiol Sci 16 (2001) 123-126

Dakappagari, N., Neely, L., Tangri, S., Lundgren, K., Hipolito, L., Estrellado, A.,
Burrows, F., Zhang, H.
An investigation into the potential use of serum Hsp70 as a novel tumour
biomarker for Hsp90 inhibitors.
Biomarkers 15 (2010) 31-38

De Maio, A.
Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams.
Shock 11 (1999) 1-12

De Maio, A.
Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress
Observation System: a form of communication during injury, infection,
and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go!
Dedicated to Ferruccio Ritossa.
Cell Stress Chaperones 16 (2011) 235-249

DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie Schütte, J.
(2006)

Weichteilsarkome des Erwachsenen

(http://medizin.uni-tuebingen.de/uktmedia/Einrichtung/Zentren/Tumorzentrum/PDF_Archiv-p-765/Therapieempfehlung/TLL_WEichteilsarkom_DGHO_2006_06_28.pdf)

Stand: 12.01.2012

Dickey, I. D., Rose, P. S., Fuchs, B., Wold, L. E., Okuno, S. H., Sim, F. H., Scully, S. P.

Dedifferentiated chondrosarcoma: the role of chemotherapy with updated outcomes.

J Bone Joint Surg Am 86-A (2004) 2412-2418

Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Joly, A. L., De Thonel, A., Chiosis, G., Garrido, C.

Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins.

Curr Med Chem 14 (2007) 2839-2847

Dutta, S. K., Girotra, M., Singla, M., Dutta, A., Otis, S. F. e. a.

Serum HSP70: a novel biomarker for early detection of pancreatic cancer.

Pancreas 41 (2012) 530-534

Engvall, E., Perlmann, P.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.

Immunochemistry 8 (1971) 871-874

Farkas, B., Hantschel, M., Magyarlaki, M., Becker, B., Scherer, K., Landthaler, M., Pfister, K., Gehrman, M., Gross, C., Mackensen, A., Multhoff, G.

Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma.

Melanoma Res 13 (2003) 147-152

Feige, U., Polla, B. S.

Hsp70--a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications.

Experientia 50 (1994) 979-986

Freyschmidt, J., Ostertag, H., Jundt, G.

Knochentumore

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2010, 3. Auflage, 1-1055

Frydman, J., Hohfeld, J.

Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection.

Trends Biochem Sci 22 (1997) 87-92

Gabai, V. L., Meriin, A. B., Yaglom, J. A., Volloch, V. Z., Sherman, M. Y.

Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging.

FEBS Lett 438 (1998) 1-4

Gehrmann, M., Schmetzer, H., Eissner, G., Haferlach, T., Hiddemann, W., Multhoff, G.

Membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) in acute myeloid leukemia: a tumor specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous NK cells.

Haematologica 88 (2003) 474-476

GEKID, G. d. e. K. i. D. e. V. (2012)

Krebsneuerkrankungen (Inzidenz), alterstandartisierte Rate (Europastandard)

(http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Atlas/CurrentVersion/Tabellen/Tabellen_D.php)

Stand: 01.02.2012

Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, H. B., Kuby, J.

Enzym-Linked Immunosorbent Assay in Immunology

W.H. Freeman, New York, 2003, 5. Auflage, 148-150

Grivas, T. B., Savvidou, O. D., Psarakis, S. A., Liapi, G., Triantafyllopoulos, G., Kovanis, I., Alexandropoulos, P., Katsiva, V.

Forefoot plantar multilobular noninfiltrating angioliopoma: a case report and review of the literature.

World J Surg Oncol 6 (2008) 11

Gröneberg, H.

Prostate cancer epidemiology

Lancet 361 (2003) 859-864

Gunther, E., Walter, L.

Genetic aspect of the hsp70 multigene family in vertebrates

Experientia 50 (1994) 987-1001

Gupta, R. S., Ramachandra, N. B., Bowes, T., Singh, B.

Unusual cellular disposition of the mitochondrial molecular chaperones Hsp60, Hsp70 and Hsp10.

Novartis Found Symp 291 (2008) 59-68, 69-73, 137-140

Haas, I. G.

BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum.

Experientia 50 (1994) 1012-1020

Hanash, S. M., Baik, C. S., Kallioniemi, O.

Emerging molecular biomarkers--blood-based strategies to detect and monitor cancer.

Nat Rev Clin Oncol 8 (2011) 142-150

Hantschel, M., Pfister, K., Jordan, A., Scholz, R., Andreesen, R., Schmitz, G., Schmetzer, H., Hiddemann, W., Multhoff, G.

Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients.

Cell Stress Chaperones 5 (2000) 438-442

Hartl, F. U., Hayer-Hartl, M.

Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.

Science 295 (2002) 1852-1858

Heidenreich, A., Bolla, M., al., e.

EAU guidelines on prostate cancer.

Eur Uro 53 (2008) 68-80

Helmbrecht, K., Zeise, E., Rensing, L.

Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review.

Cell Prolif 33 (2000) 341-365

Helpap, B., Egevad, L.

Die Wertigkeit des 2005 modifizierten Gleason-Gradings in der urologischen Diagnostik von Prostatakarzinomen.

Urologe 46 (2007) 59-62

Höhfeld, J., Cyr, D. M., Patterson, C.

From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation.

EMBO Rep 2 (2001) 885-890

Höhfeld, J., Jentsch, S.

GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1.

EMBO J 16 (1997) 6209-6216

Höhfeld, J., Minami, Y., Hartl, F. U.

Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle.

Cell 83 (1995) 589-598

Holleman, A. F., Wiberg, E.

Lehrbuch der Anorganischen Chemie

deGruyter, Berlin, 1995, 101. Auflage, 198

Hurwitz, M. D., Kaur, P., Nagaraja, G. M., Bausero, M. A., Manola, J., Asea, A.

Radiation therapy induces circulating serum Hsp72 in patients with prostate cancer.

Radiother Oncol 95 (2010) 350-358

Iversen, P., Madsen, P. O., Corde, D. K.

Radical prostatectomy versus expectant treatment for early carcinoma of the prostate. Twenty-three years follow-up of a prospective randomized study. .

Scand J Urol Nephrol Suppl 172 (1995) 65-72

Jaattela, M.

Escaping cell death: survival proteins in cancer.

Exp Cell Res 248 (1999) 30-43

Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., Egeblad, M.

Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases.

EMBO J 17 (1998) 6124-6134

Jemal, A., Siegel, R., Ward, W., al., e.

Cancer Statistics 2007

Cancer 57 (2007) 43-66

Jolly, C., Konecny, L., Grady, D. L., Kutsikova, Y. A., Cotto, J. J., Morimoto, R. I., Vourc'h, C.

In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress.

J Cell Biol 156 (2002) 775-781

Jundt, G. (1997)

Knochtumoren-Ursachen, Symptome, Diagnose, Behandlung, Heilungschancen-Eine Information der Krebsliga

(<http://www.krebsliga.info/assets/pdf/knochehtumore.pdf>)

Stand: 12.01.2012

Kampinga, H. H., Hageman, J., Vos, M. J., Kubota, H., Tanguay, R. M., Bruford, E. A., Cheetham, M. E., Chen, B., Hightower, L. E.

Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins.

Cell Stress Chaperones 14 (2009) 105-111

Kiang, J. G., Tsokos, G. C.

Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology.

Pharmacol Ther 80 (1998) 183-201

Kleinjung, T., Arndt, O., Feldmann, H. J., Bockmuhl, U., Gehrman, M., Zilch, T., Pfister, K., Schonberger, J., Marienhagen, J., Eilles, C., Rossbacher, L., Multhoff, G.

Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy-a target for natural killer (NK) cells.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 57 (2003) 820-826

Kocsis, J., Madaras, B., Toth, E. K., Fust, G., Prohaszka, Z.

Serum level of soluble 70-kD heat shock protein is associated with high mortality in patients with colorectal cancer without distant metastasis.

Cell Stress Chaperones 15 (2010) 143-151

Lehnerer, S.

Hsp70-Membranexpression auf Sarkomen - eine tumorspezifische Zielstruktur.

Dissertation Fakultät für Medizin TU-München 2012) 1-120

Lippert, H.

Lehrbuch Anatomie

Urban&Fischer, München, 2003, 6. Auflage, 1-884

Löffler, G., Petrides, E. P.

Biochemie und Pathobiochemie

Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1998, 1-1267

Mambula, S. S., Calderwood, S. K.

Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes.

J Immunol 177 (2006) 7849-7857

Mathew, A., Mathur, S. K., Jolly, C., Fox, S. G., Kim, S., Morimoto, R. I.

Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2.

Mol Cell Biol 21 (2001) 7163-7171

Mathew, A., Mathur, S. K., Morimoto, R. I.

Heat shock response and protein degradation: regulation of HSF2 by the ubiquitin-proteasome pathway.

Mol Cell Biol 18 (1998) 5091-5098

Meacham, G. C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J. M., Cyr, D. M.

The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation.

Nat Cell Biol 3 (2001) 100-105

Molvarec, A., Rigo, J., Jr., Lazar, L., Balogh, K., Mako, V., Cervenak, L., Mezes, M., Prohaszka, Z.

Increased serum heat-shock protein 70 levels reflect systemic inflammation, oxidative stress and hepatocellular injury in preeclampsia.

Cell Stress Chaperones 14 (2009) 151-159

Morimoto, R. I.

Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators.

Genes Dev 12 (1998) 3788-3796

Mostofi, F. K., Davis, J. C., Sesternhenn, I. A.

Pathology of carcinoma of the prostate.

Cancer 70 (1992) 235-253

Mukherji, D., Pezaro, C. J., De-Bono, J. S.

MDV3100 for the treatment of prostate cancer.

Expert Opin Investig Drugs 21 (2012) 227-233

Multhoff, G.

Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance.

Methods 43 (2007) 229-237

- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Eissner, G., Issels, R.
CD3- large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kD heat shock protein on human sarcoma cells.
Blood 86 (1995) 1374-1382
- Multhoff, G., Hightower, L. E.
Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies.
Cell Stress Chaperones 16 (2011) 251-255
- Multhoff, G., Botzler, C., Jennen, L., Schmidt, J., Ellwart, J., Issels, R.
Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells.
J Immunol 158 (1997) 4341-4350
- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Muller, E., Meier, T., Wilmanns, W., Issels, R. D.
A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells.
Int J Cancer 61 (1995) 272-279
- Multhoff, G., Hightower, L. E.
Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies.
Cell Stress Chaperones 16 (2011) 251-255
- Multhoff, G., Pfister, K., Botzler, C., Jordan, A., Scholz, R., Schmetzer, H., Burgstahler, R., Hiddemann, W.
Adoptive transfer of human natural killer cells in mice with severe combined immunodeficiency inhibits growth of Hsp70-expressing tumors.
Int J Cancer 88 (2000) 791-797
- Multhoff, G., Pfister, K., Gehrman, M., Hantschel, M., Gross, C., Hafner, M., Hiddemann, W.
A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity.
Cell Stress Chaperones 6 (2001) 337-344

Ni, X. G., Bai, X. F., Mao, Y. L., Shao, Y. F., Wu, J. X., Shan, Y., Wang, C. F., Wang, J., Tian, Y. T., Liu, Q., Xu, D. K., Zhao, P.

The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer.

Eur J Surg Oncol 31 (2005) 164-169

Niethard, F. U., Pfeil, J.

Duale Reihe Orthopädie

Thieme Verlag, Stuttgart, 2005, 5. Auflage, 1-598

Nishikawa, S., Brodsky, J. L., Nakatsukasa, K.

Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD).

J Biochem 137 (2005) 551-555

Nollen, E. A., Morimoto, R. I.

Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins.

J Cell Sci 115 (2002) 2809-2816

Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A., Lindquist, S.

Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104.

Nature 372 (1994) 475-478

Pfister, K., Radons, J., Busch, R., Tidball, J. G., Pfeifer, M., Freitag, L., Feldmann, H. J., Milani, V., Issels, R., Multhoff, G.

Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis.

Cancer 110 (2007) 926-935

Pockley, A. G., Multhoff, G.

Cell stress proteins in extracellular fluids: friends or foe?

Novartis Found Symp. 291 (2008) 86-95

Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maise, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J. M., Garrido, C., Kroemer, G.

Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor.

Nat Cell Biol 3 (2001) 839-843

Ritossa, F. M.

A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*.

Experientia 18 (1962) 571-573

Roach, M. R., Lu, J., Pilepiche, M. V., al., e.

Long-term survival after radiotherapy alone: radiation therapy oncology group prostate cancer trials

Urology 161 (1999) 864-868

Robert Koch Institut Zentrum für Krebsregisterdaten Kaatsch, P. (2012)

Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe

(http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2012/krebs_in_deutschland_2012.pdf;jsessionid=F07E231F88EE49A64DD502FCC9CE353D.2_cid390?_blob=publicationFile)

Stand: 01.06.2013

Roigas, J., Wallen, E. S., Loening, S. A., Moseley, P. L.

Effects of combined treatment of chemotherapeutics and hyperthermia on survival and the regulation of heat shock proteins in Dunning R3327 prostate carcinoma cells.

Prostate 34 (1998) 195-202

Schiebler, T. H.

Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie

Springer, Heidelberg, 2004, 9. Auflage, 1-900 (624ff.)

Schild, H., Arnold-Schild, D., Lammert, E., Rammensee, H. G.

Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes.

Curr Opin Immunol 11 (1999) 109-113

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K.

Prometheus Hals und Innere Organe

Thieme Stuttgart & New York, 2005, 1. Auflage, 1-371

Sherman, M., Multhoff, G.

Heat shock proteins in cancer.

Ann N Y Acad Sci 1113 (2007) 192-201

Shu, C. W., Huang, C. M.

HSP70s: From Tumor Transformation to Cancer Therapy.

Clin Med Oncol 2 (2008) 335-345

Singh-Jasuja, H., Toes, R. E., Spee, P., Munz, C., Hilf, N., Schoenberger, S. P., Ricciardi-Castagnoli, P., Neefjes, J., Rammensee, H. G., Arnold-Schild, D., Schild, H.

Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis.

J Exp Med 191 (2000) 1965-1974

Srivastava, P. K.

Heat shock proteins in immun response to cance:the fourth paradigm.

Experientia 50 (1994) 1054-1060

Stuart, R. A., Cyr, D. M., Neupert, W.

Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation.

Experientia 50 (1994) 1002-1011

Sullivan Pepe, M., Etzioni, R., Feng, Z., Potter, J. D., Thomson, M. L.

Phase of Biomarker Development for Early Detection of Cancer.

Journal of National Cancer Institut-Commentary 93 (2001) 1054-1061

Terlecky, S. R.

Hsp70s and lysosomal proteolysis.

Experientia 50 (1994) 1021-1025

Todryk, S. M., Gough, M. J., Pockley, A. G.

Facets of heat shock protein 70 show immunotherapeutic potential.

Immunology 110 (2003) 1-9

Udono, H., Srivastava, P. K.

Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70.

J Immunol 152 (1994) 5398-5403

- Van Weemen, B. K., Schuurs, A. H.
Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.
FEBS Lett 15 (1971) 232-236
- Vega, V. L., Rodriguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., De Maio, A.
Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages.
J Immunol 180 (2008) 4299-4307
- Vogt, R. F., Jr., Phillips, D. L., Henderson, L. O., Whitfield, W., Spierto, F. W.
Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates.
J Immunol Methods 101 (1987) 43-50
- Walden, M. J., Murphey, M. D., Vidal, J. A.
Incidental enchondromas of the knee.
AJR Am J Roentgenol 190 (2008) 1611-1615
- Wei, Y. Q., Zhao, X., Kariya, Y., Teshigawara, K., Uchida, A.
Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells.
Cancer Immunol Immunother 40 (1995) 73-78
- Welsch, U.
Lehrbuch Histologie
Elsevier, München-Jena, 2006, 2. Auflage 1-676
- Yeh, C. H., Tseng, R., Zhang, Z., Cortes, J., O'Brien, S., Giles, F., Hannah, A., Estrov, Z., Keating, M., Kantarjian, H., Albitar, M.
Circulating heat shock protein 70 and progression in patients with chronic myeloid leukemia.
Leuk Res 33 (2009) 212-217

Zimmermann, M., Nickl, S., Lambers, C., Mittelebauer, A., Hoetzenecker, K., Rozsasa, A., Ostoros, G., Laszio, V. e. a.

Discrimination of clinical stages in non-small cell lung cancer patients by serum HSP27 and HSP70: a multi-institutional case-control study.

Clin Chim Acta 413 (2012) 1115-1120

Zylicz, M., King, F. W., Wawrzynow, A.

Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein.

EMBO J 20 (2001) 4634-4638